

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina Interna**



**NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN NEOPLASIAS  
MIELOPROLIFERATIVAS PHILADELPHIA NEGATIVAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Santiago Barrio García**

Bajo la dirección de los doctores

Joaquín Martínez-López  
Florinda Gilsanz Rodríguez

**Madrid, 2013**

© Santiago Barrio García, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de medicina interna**



**NUEVAS DIANAS TERAPEUTICAS EN  
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS  
PHILADELPHIA NEGATIVAS**

**Memoria para optar al grado de doctor presentada por:**

**Santiago Barrio García**

Bajo la dirección de los doctores:

Joaquín Martínez-López

Florinda Gilsanz Rodríguez

Madrid, 2012







D. Joaquín Martínez López, profesor asociado de medicina en la Universidad Complutense de Madrid y jefe del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Hospital 12 de Octubre de Madrid,

y

Dña. Florinda Gilsanz Rodríguez, Catedrática de Hematología del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y jefa de Servicio de Hematología del Hospital 12 de Octubre de Madrid,

CERTIFICAN:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D. Santiago Barrio García titulado: "NUEVAS DIANAS TERAPEUTICAS EN NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS PHILADELPHIA NEGATIVAS", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente certificado en Madrid a 20 de agosto de 2012.



Fdo.: Joaquín Martínez López



Fdo.: Florinda Gilsanz Rodríguez



*A mis padres y mi hermana Clarita.*



*En el presente documento se reflejan los resultados más importantes a nivel científico obtenidos durante mis cuatro años de trabajo en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Sin embargo considero que los resultados a nivel personal son si cabe más importantes. Durante este periodo he sido formado como profesional y como persona, he aprendido a enfrentarme a retos cada vez mayores y a asumir algunos fracasos. Esto ha sido posible gracias a la ayuda y apoyo de todos los profesionales del Servicio de Hematología de dicho hospital, a los que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.*

*Además quiero dedicar este trabajo a mi familia, en especial a todos los que ya no están. Por ser una fuente continúa de inspiración, ejemplo y sobretodo de disfrute. Esta tesis la firmo en vuestro nombre.*

*Por último no puedo evitar acordarme de todos los amigos y compañeros que me han acompañado hasta este punto del camino, porque amigos, a partir de ahora el mundo es nuestro, en nuestra mano esta decidir que hacemos con el.*



***Aquel que cree tener todo bajo control o bien no sabe lo que hace o no hace todo lo que puede.***



## ÍNDICE

ABSTRACT .....	21
<i>I. INTRODUCCIÓN</i> .....	25
1. HEMATOPOYESIS .....	27
1.1. Células madre hematopoyéticas .....	27
1.2. Regulación de la hematopoyesis .....	27
1.2.1. Eritropoyesis.....	28
1.2.2. Megacariopoyesis.....	29
2. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.....	30
2.1. Policitemia Vera.....	31
2.1.1. Características clínicas.....	31
2.1.2. Diagnóstico .....	32
2.1.3. Tratamiento.....	32
2.2. Trombocitemia Esencial.....	34
2.2.1. Características clínicas.....	34
2.2.2. Diagnóstico .....	34
2.2.3. Tratamiento: .....	35
3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN HEMATOPOYETICAS.....	36
3.1. Señalización mediada por la vía JAK-STAT .....	37
3.1.1. Familia Janus quinasa.....	37
3.1.2. Stats .....	38
3.1.3. Vía de señalización JAK/STAT.....	38
3.1.4. Regulación JAK STAT .....	40

3.1.5.	Alteraciones de JAK2 y fisiopatogenia de NMP .....	40
3.2.	Descripción de la vía MAPK .....	41
3.3.	Descripción de la vía PI3K/AKT .....	43
3.4.	Descripción de las quinasas SRC .....	44
3.5.	Proteínas de choque térmico.....	46
3.6.	Inhibidores de tirosina quinasa.....	46
3.7.	Plataformas de cribado génico y proteómico.....	47
3.8.	Efectos sinérgicos entre fármacos.....	48
<i>II.</i>	<i>FUNDAMENTOS</i> .....	49
<i>III.</i>	<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i> .....	53
	Objetivos .....	55
<i>IV.</i>	<i>PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	57
1.	PACIENTES.....	59
1.1.	Análisis epigenético de metilación.....	59
1.2.	Análisis de expresión génica.....	59
1.3.	Análisis del perfil proteómico .....	60
1.4.	Análisis funcionales.....	61
2.	MATERIAL Y METODOS .....	62
2.1.	Extracción de células, ácidos nucleídos y proteínas.....	62
2.2.	Microarray de metilación.....	63
2.3.	Microarray de expresión.....	65
2.4.	PCR cuantitativa en tiempo real.....	65
2.5.	Geles 2D DIGE y espectrometría de masas.....	66

2.6.	Cultivos celulares.....	67
2.6.1.	Reactivos.....	67
a.	Sorafenib.....	67
b.	Perifosine.....	68
c.	Dasatinib.....	68
d.	KNK437.....	69
e.	Ruxolitinib.....	69
2.6.2.	Líneas celulares.....	69
a.	Líneas HEL.....	69
b.	Líneas derivadas de BAF3.....	70
c.	Línea HL60.....	70
d.	Línea K562.....	70
e.	Línea WAHI.....	70
2.6.3.	Mantenimiento y congelación de las células.....	70
2.7.	Ensayos de inhibición.....	71
2.7.1.	Ensayos con ARNi ZNF577.....	71
2.8.	Cultivo de colonias en metilcelulosa.....	71
2.9.	Citometric Bead Arrays.....	72
2.10.	Cultivo de células madre hematopoyéticas.....	72
2.11.	Western blot.....	72
2.11.1.	Anticuerpos.....	73
2.12.	Citometría de flujo.....	73
2.13.	Análisis Estadístico de los datos.....	74

<i>V. RESULTADOS</i> .....	77
1. ANÁLISIS DE METILACIÓN.....	79
1.1. Análisis Global.....	79
1.2. Metilación en genes SOCS.....	80
1.3. Hipermetilación del gen ZNF577.....	81
2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN.....	83
2.1. Resultados del microarray de expresión.....	83
2.2. Cuantificación de la carga alélica de JAK2.....	84
3. GELES 2D DIGE Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	87
4. ANALISIS FUNCIONALES.....	87
4.1. Ruxolitinib.....	87
4.2. Sorafenib.....	90
4.3. KNK 437.....	97
4.4. Perifosine.....	99
4.5. Dasatinib.....	102
<i>VI. DISCUSIÓN</i> .....	111
1. Análisis de Metilación.....	113
2. Análisis de expresión.....	116
3. Ensayos funcionales.....	118
<i>VII. CONCLUSIONES</i> .....	129
<i>VIII. BIBLIOGRAFIA</i> .....	133
<i>ANEXOS</i> .....	143
INDICE DE FIGURAS.....	145

INDICE DE TABLAS.....	149
LISTADO DE PUBLICACIONES.....	151
COMUNICACIONES EN CONGRESOS.....	153
Oral.....	153
Poster (selección) .....	153



## ***ABREVIATURAS***

AAS: Acido acetil salicílico	ECL: Enzymatic Chemiluminescence
ADN: Acido desoxirribonucleico	EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid.
AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog	ELN: European Leukemia Net
ASXL1: additional sex combs like 1	EPO: Erythropoyetina
BFU-E: Burst formation Unit-Erythroid	ERK: MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1
BTK: Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	ET: Essential thrombocythemia
CBA: Cytometric Bead Array	FCER1G: Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
CCE: Crecimiento de colonias endógenas	FDR: False Discovery Rate
CD34: Cluster differentiation 34	FITC: fluorescein isothiocyanate
CD41a: Cluster diferenciación 41a	GATA-1: GATA binding protein 1
CD44: Cluster differentiation 44	HEL: Línea celular de eritroleucemia
CD45: Cluster differentiation 45	HSP70: heat shock 70kDa protein 1A
CD71: Cluster differentiation 71	HU: Hidroxiurea
cDNA: DNA codificante	IDH1: isocitrate dehydrogenase 1
CISH: cytokine inducible SH2-containing protein	IFN-a: Interferon alfa
CMF: Citometría de flujo	IKAROS: IKZF1, IKAROS family zinc finger 1
CpG: Cytosine phosphate Guanine	IL-3: Interleukina 3
cRNA: RNA complementario	JAK2: Janus kinase 2
Ct: Cycle threshold	LDA/TLD: Tarjeta microfluidica
CXCL12: chemokine (C-X-C motif) ligand 12	LMA: Leucemia mieloide aguda
Cy3: Cianina 3	LMC: Leucemia mieloide crónica
Cy5: Cianina 5	LYN: -yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
DIGE: Differential in gel electrophoresis	MAP2K1: MEK, mitogen-activated protein kinase kinase 1
DMSO: Dimethyl sulfoxide	

MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MFP: Mielofibrosis primaria  
MMP14: matrix metallopeptidase 14  
MO: Médula osea  
MPL: Myeloproliferative leukemia virus oncogene  
MPN: Myeloproliferative neoplasms  
NMP/NMPc: Neoplasias mieloproliferativas cronicas  
P38: MAPK14, mitogen-activated protein kinase 14  
PBS: Phosphate buffer saline  
PCR: Polymerase Chain reaction  
PDGF: platelet-derived growth factor  
PE: Phycoerythrin  
PerCP: Peridinin chlorophyll protein  
PI3K: phosphoinositide-3-kinase  
PIAS: Proteínas Reguladoras de STAT activado  
PV: Policitemia Vera  
ARN: Acido ribonucleico  
RT-PCR: Real-time PCR  
SCF: Stem cell factor

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SERPINB1: serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1  
SKAP2: src kinase associated phosphoprotein 2  
SMD: Sindromes mielodisplasicos  
SOCS: suppressor of cytokine signaling  
Src: v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) family  
STAT: signal transducer and activator of transcription  
TE: Trombocitemia Esencial  
TET2: tet oncogene family member 2  
TIMP2: TIMP metallopeptidase inhibitor 2  
TNF-alpha: tumor necrosis factor alpha  
TPO: Trombopoietina  
TS: Trombocitosis secundaria  
WT: Wild-Type  
ZNF577: zinc finger protein 577

## ***ABSTRACT***

JAK2 is a non-receptor tyrosine kinase that acts as an important signal transducer in cytokine signalling, promoting growth, survival and differentiation of various cell types. A somatic point mutation in *JAK2* leading to the expression of the JAK2 V617F mutant occurs with high frequency in myeloproliferative neoplasm (MPN) patients (>95 % in polycythemia vera (PV), >50 % in essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF)).

While clinical trials treating MPN patients with JAK inhibitors have shown positive results, success has primarily been due to improved patient symptomatology with one clinical trial also showing an increased survival rate but a limited reduction of the tumour clone. Therefore additional advances in understanding MPN cell biology could be utilized to further improve clinical outcomes and treatment optimization.

The aim of this work was to investigate genes and proteins involved in the physiopathogenic events and phenotype divergence between PV and ET, in order to obtain a better knowledge of MPN and for a future application as diagnostic tools or therapeutic targets.

To this end, we performed a gene and protein screening looking for differences between ET and PV at different levels: gene expression microarray epigenetic profile (methylation microarray) and protein expression (by GEL 2D-DIGE/MS). This approach has shown several genes with a differential expression rate that allow us to select several inhibitors targeted against their product proteins.

Then, we determine in cell models and primary cells of patients diagnosed with Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPN), the antitumor effects, mechanisms of action at the molecular level and potential synergies with Ruxolitinib of the tyrosine kinase inhibitors selected: Dasatinib, Sorafenib, perifodine and KNK437, HSP70 inhibitor

The cytotoxic and cytostatic effects of these different compounds were identified in JAK2V617F positive cell lines, in methylcellulose cultures of mononuclear cells and in stem cell (CD34 positive) cells cultures from bone marrow.

Ruxolitinib, Sorafenib, and KNK437 were able to inhibit proliferation in cell line models and in cells from patients NMP. Furthermore, the cytotoxic effect on CD34 positive cells from patients was significantly higher than the presented by CD34 control culture. Dasatinib, Sorafenib and KNK437 showed a strong synergistic effect in combination with Ruxolitinib. By western blot we confirmed that Sorafenib inhibits activation of ERK and p38, and consequently, STAT5, Ruxolitinib blocks the activation of ERK and STAT5 and Dasatinib inhibits the activation of SRC and STAT5.





## *I. INTRODUCCIÓN*



## **1. HEMATOPOYESIS**

### **1.1. Células madre hematopoyéticas**

La hematopoyesis es el proceso por el cual se forman las células sanguíneas y se regula la homeostasis[1]. Este proceso altamente orquestado, es llevado a cabo por las células madre hematopoyéticas (CMH). Las CMH, localizadas en el individuo adulto en la médula ósea (MO) y en menor medida en la sangre periférica, son células madre multipotenciales: pueden diferenciarse en todos los linajes de células presentes en la sangre. Además poseen la capacidad de auto-renovarse para evitar el agotamiento de la población.

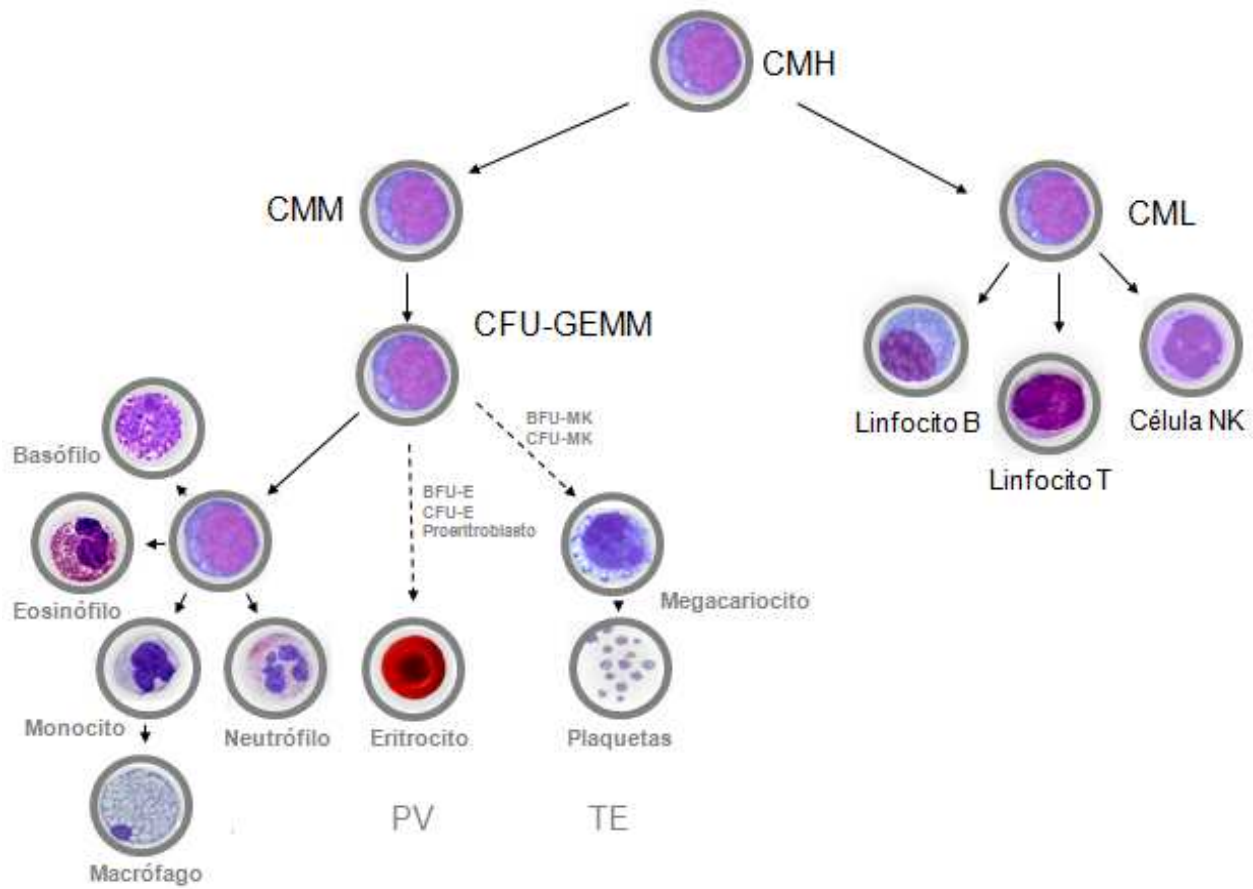
La diferenciación celular desde CMH hasta células completamente diferenciadas posee un orden jerárquico (Figura 1). Se inicia con células madre con capacidad total de autorregeneración y diferenciación que son caracterizadas, en humanos, principalmente por la expresión del antígeno de superficie CD34 y la ausencia de antígenos específicos de linaje como CD3, CD4, CD45, CD71. Durante el proceso de diferenciación se pierde la capacidad de autorregeneración y aparecen diversos marcadores de superficie que definen grupos celulares con funciones biológicas específicas.

Una vez que las células madre comienzan a diferenciarse se generan progenitores oligopotentes; linfoides, y mieloides. Estos progenitores mieloides a su vez, además de generar los progenitores de granulocitos y macrófagos, dan lugar a los progenitores megacariocíticos y eritroides, que desembocan finalmente en células maduras o diferenciadas. Se estima que de todas las células nucleadas presentes en la médula ósea, el total de células CD34 positivas esta entorno al 1%. Sin embargo solo el 0,01% corresponden a CMH.

### **1.2.Regulación de la hematopoyesis**

La vida media de las células sanguíneas maduras es bastante corta. Por ejemplo, la masa eritrocitaria se renueva totalmente cada 120 días. Se estima que cada día hasta  $10^{12}$  células sanguíneas deben ser producidas en adultos normales para mantener la homeostasis. Este proceso está principalmente regulado por tres mecanismos: Los factores de crecimiento y citoquinas (EPO, TPO, PDGF) los factores de transcripción específicos del linaje (PU.1, HOX, GATA1, GATA2) y la

interacción entre las células hematopoyéticas y las células del nicho de la médula ósea[2].

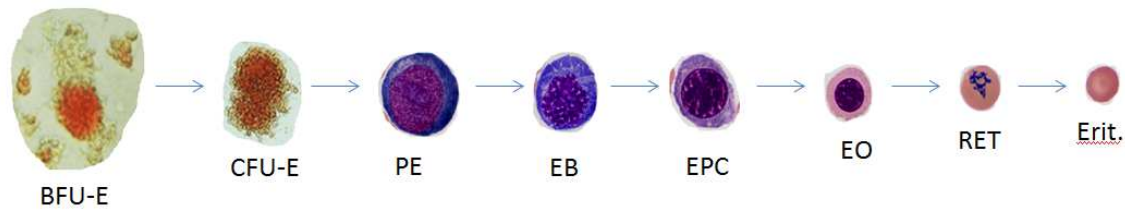


**Figura 1: Hematopoyesis.** La célula madre totipotencial hematopoyética (CMH) puede diferenciarse a células madre mieloides y linfoides (CMM y CML respectivamente). La CMM a su vez produce progenitores de granulocitos, eritrocitos y megacariocitos (CFU-GEMM) de los que desciende el resto del linaje mieloide.

### 1.2.1. Eritropoyesis

Los progenitores eritroides tienen diferente potencial proliferativo, los más primitivos son denominados unidades formadoras de brotes eritroides (del inglés BFU-E). Estos, mantienen una alta tasa de proliferación en respuesta a citoquinas, mientras que los progenitores eritroides más maduros, denominados unidades formadoras de colonias eritroides (del inglés CFU-E) tienen un limitado potencial de proliferación. Las CFU-E dan lugar al resto del linaje eritroide; proeritroblastos (PE), eritroblastos basófilos (EB), eritroblastos policromatófilos (EPC),

eritroblastos orocromáticos (EO), y reticulocitos (RET), que tras la completa expulsión del núcleo celular, se transforman en eritrocitos maduros (Figura 2).



**Figura 2:** Diferenciación Eritroide.

El principal factor regulador de la eritropoyesis es la EPO, producida en células renales y en menor medida en células hepáticas. La EPO realiza un mecanismo de regulación positivo sobre las células eritroides. Su presencia promueve la proliferación de los progenitores tempranos (BFU-E) y la supervivencia y diferenciación de progenitores eritroides tardíos (CFU-E).

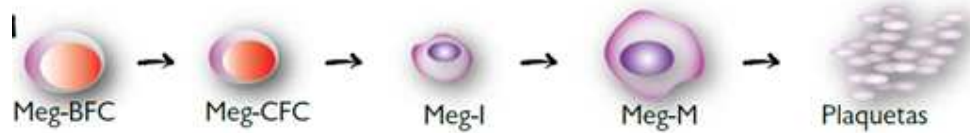
Además de la EPO, otras citoquinas participan también de la modulación de la eritropoyesis, como la interleucina 3 (IL-3), trombopoyetina (TPO), el ligando de la tirosina fetal 3 (FLT-3) y el factor de crecimiento de células madre (SCF).

### 1.2.2. Megacariopoyesis

La megacariopoyesis también deviene de una cascada de diferentes productos celulares intermedios. Éstos, además de a nivel fenotípico, se diferencian por el grado de expresión del receptor de TPO (c-MPL) y en la disminución del potencial proliferativo. Además de la TPO, la megacariopoyesis está regulada por otras citoquinas como la IL-3, IL-6 o la IL-11[3].

Los progenitores tempranos de esta cascada proliferativa son las células formadoras de brotes megacariocíticos (BFU-MK), capaces de amplificar hasta 100 veces tras 21 días de cultivo. Los BFU-MK dan lugar a las células formadoras de colonias megacariocíticas (CFU-MK), que representan los progenitores tardíos capaces de formar pequeñas colonias después de 12 días de cultivo. A diferencia de los progenitores tardíos eritroides, que continúan con la proliferación y división celular, los CFU-MK maduran por endomitosis, formando precursores poliploides

inmaduros que tras un proceso de maduración en la médula dan lugar a megacariocitos maduros. Estos, al activarse eventualmente por citoquinas como la TPO, producen las plaquetas (Figura 3).



**Figura 3:** Diferenciación Megacariocítica.

## **2. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

Las Neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP), son un grupo heterogéneo de enfermedades hematopoyéticas clonales que tienen como característica común una médula ósea hipercelular. Esta hematopoyesis descontrolada da lugar a un aumento de las células maduras de una o más líneas mieloides, provocando a su vez un incremento del número de elementos correspondientes en la sangre periférica.

Las NMP clásicas comprenden cuatro entidades: La leucemia mieloide crónica (LMC), la mielofibrosis primaria (MFP), la Policitemia vera (PV) y la Trombocitemia esencial (TE). La agrupación de estas enfermedades en una única categoría respondió inicialmente a un sentido clínico. Se trata de procesos de evolución crónica que habitualmente presentan esplenomegalia, cursan con recuentos hematimétricos aumentados (eritrocitosis, leucocitosis y trombocitosis) y en proporción variable, en función de la enfermedad, pueden presentar eosinofilia y basofilia. Las principales complicaciones de estas patologías son de tipo trombótico y hemorrágico, fibrosis medular y, a largo plazo, un mayor riesgo de evolución a leucemia mieloide aguda (LMA).

Este grupo de enfermedades pudo disgregarse gracias al descubrimiento de la translocación 9-22, o cromosoma philadelphia, que genera un gen quimera cuyo producto es la proteína BCR-ABL, causa etiológica de la LMC [4]. Así, se pudo diferenciar la LMC de las NMP philadelphia-negativas (en el resto del presente

documento, NMP se referirá a neoplasias mieloproliferativas philadelphia negativas). Estas patologías, caracterizadas por un aumento de la masa eritrocitaria en la PV, la trombocitosis en la TE y la fibrosis medular en la MFP, fueron finalmente relacionadas a nivel molecular gracias al descubrimiento de la mutación V617F del gen *JAK2* en el 95% de los pacientes con PV y un 50% de las TE y MFP [5-9].

## 2.1. Policitemia Vera

La PV se caracteriza por un incremento de la serie roja de forma independiente a los mecanismos comunes de regulación eritropoyética descritos anteriormente. Además, la proliferación de otras líneas como la mieloide y megacariocítica es común en el desarrollo de esta patología. A nivel molecular, los únicos marcadores comunes de la enfermedad son las alteraciones del gen *JAK2*, como la mutación V617F, presente en un 95% de los casos o las del exón 12 (que representa un 3% de los casos). La evolución clínica de la PV presenta dos fases bien diferenciadas: una primera pre-policitémica y una segunda policitémica asociada a un incremento de masa eritrocitaria. Esta última fase puede desembocar en una tercera fase post-policitémica mielofibrótica, que se caracteriza por el desarrollo de citopenias, fibrosis de la médula ósea, una hematopoyesis ineficaz (en ocasiones extramedular) y esplenomegalia. Aproximadamente un 2% de las PV pueden progresar hacia fase mielodisplásica/pre-leucémica o LMA[10].

### 2.1.1. Características clínicas

La incidencia de la PV en Europa es de entre 0.7 y 2.6 por 100.000 habitantes. La posibilidad de desarrollo de la enfermedad se incrementa según avanza la edad del individuo, siendo 60 años la edad media del diagnóstico y poco frecuente encontrar pacientes menores de 20 años. Existe una predominancia de varones sobre mujeres de aproximadamente 1,5 frente a 1. Aproximadamente un 20% de los pacientes presentan eventos trombóticos o isquemia cardiaca. El sangrado también es frecuente, en especial el digestivo. Los síntomas más comunes son: dolor de cabeza, vértigo, parestesia, eritromealgia y prurito.

En sangre, a parte de la eritrocitosis, suele aparecer neutrofilia y más raramente basofilia. En escasas ocasiones se pueden encontrar granulocitos inmaduros, pero generalmente no se observan blastos. El 15% de las PV presentan además

trombocitosis. Se observa una médula ósea hipercelular, con un alto número de precursores eritrocíticos y megacariocíticos. Además del exceso de megacariocitos, éstos presentan caracteres anormales como núcleos hiperlobulados en la fase temprana de la enfermedad.

### 2.1.2. Diagnóstico

Según estableció la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008, para el diagnóstico de la PV, el paciente debe presentar los dos criterios mayores y uno menor, o uno de los criterios mayores y dos menores descritos en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Criterios diagnósticos de la PV según la OMS 2008.

Criterios	Definición
Mayores	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Evidencia de un incremento de la masa eritrocitaria definida mediante uno de los siguientes métodos:                             <ol style="list-style-type: none"> <li>a. HB &gt; 18,5 g/dl en hombres, 16,5 en mujeres (masa eritrocitaria &gt; 25% del valor normal).</li> <li>b. HB o Hcto &gt; percentil 99 según rango por edad, sexo, altitud.</li> <li>c. HB &gt;17 gr/dl en hombres, 15 g/dl en mujeres, si se asocia a un incremento mantenido y documentado de al menos 2 gr/dl del valor individual basal que no sea atribuible a una corrección de déficit de hierro.</li> <li>d. Elevación de la masa eritrocitaria &gt; 25% por encima de la media del valor predictivo normal.</li> </ol> </li> <li>2. Presencia de JAK2V617F u otra mutación funcionalmente similar como la mutación de JAK2 en el exón 12.</li> </ol>
Menores	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Biopsia de médula ósea hipercelular para la edad con proliferación trilineal (panmielosis) y proliferación prominente eritroide, granulocítica y megacariocítica.</li> <li>2. Niveles de EPO en suero por debajo de los valores de referencia.</li> <li>3. Formación de colonias eritroides endógenas in vitro</li> </ol>

HB: Hemoglobina. Hcto: Hematocrito

### 2.1.3. Tratamiento

Dado que los dos principales factores de riesgo en los pacientes con PV son las complicaciones trombóticas, el tratamiento de esta neoplasia se ha dirigido a evitarlas, ya sea con flebotomías para reducir el número de hematíes y/o con la administración de antiagregantes como el ácido acetil salicílico (AAS).

Los pacientes de alto riesgo trombótico, definido principalmente por la edad y eventos trombóticos previos, deben recibir también tratamiento citorreductor. El tratamiento de elección en estos casos es la Hidroxiurea (HU)[11].

EL mecanismo citorreductor y en especial la actividad mielosupresora de la HU no están completamente definidos, pero si se ha descrito que actúa a nivel de ciclo celular bloqueando la síntesis de ADN mediante la inhibición de la Ribonucleotido reductasa [12]. La HU se administra en dosis de 15-20 mg/kg/día hasta que el paciente presenta respuesta (**Tabla 2**). La tasa de resistencia e intolerancia a este fármaco en pacientes NMP es de un 20%[13, 14].

**Tabla 2:** Definición de la Respuesta Clínico hematológica en Policitemia Vera (PV) según el European Leukemia Net (ELN) 2009.

Grado de respuesta	Criterios
<b>Respuesta completa*</b>	Hematocrito < 45% sin flebotomías Cifra de plaquetas $\leq 400 \times 10^9/L$ , Cifra de leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ , Bazo normal, por pruebas de imagen No síntomas relacionados con la enfermedad
<b>Respuesta parcial**</b>	Hematocrito < 45% sin flebotomías ó respuesta en 3 o más de los otros criterios referidos en Respuesta completa
<b>No respuesta</b>	Cualquier tipo respuesta que no corresponda a los criterios de respuesta parcial.

\* debe reunir todos los criterios. \*\* En paciente que no cumplen todos los criterios de respuesta completa.

El tratamiento de segunda línea en los NMP sin respuesta o intolerancia a HU es el Interferon alfa (INF- $\alpha$ ). En la actualidad están apareciendo inhibidores de tirosina quinasa de segunda generación específicos contra JAK2, que si bien no son específicos contra JAK2 V617F, controlan la sintomatología. Estas nuevas aproximaciones terapéuticas se describirán más adelante.

La supervivencia media en pacientes tratados supera los 10 años, disminuyendo en relación a los factores de riesgo y la edad. A parte de trombosis y hemorragias, un 2-3% de los pacientes no tratados con agentes citotóxicos evolucionan a LMA. La incidencia del desarrollo de LMA aumenta hasta un 6% [15] en pacientes tratados.

## 2.2. Trombocitemia Esencial

La TE se caracteriza por un incremento de la serie megacariocítica, que produce trombocitosis en sangre periférica y un incremento de los megacariocitos maduros en la médula ósea. A nivel molecular no existen marcadores biológicos o genéticos específicos, pese a que la mutación JAK2 V617F aparece en un 50% de las mismas. La distinción de la PV (que también puede cursar con trombocitosis) y, en el caso de las TE JAK2 WT, la distinción de trombocitosis reactivas, suponen los mayores retos diagnósticos de esta enfermedad.

### 2.2.1. Características clínicas

La TE presenta una incidencia de 0.6 a 2.5 por cada 100.000 personas al año, con una prevalencia de 2-3casos/10.000 habitantes en la Unión Europea, lo que la encuadra en el campo de las enfermedades raras.

La edad media de presentación de la enfermedad está en torno a los 60 años, aunque por grupos de edad es más común en mujeres entre 25 y 50 años. Más de dos terceras partes de los pacientes se mantienen asintomáticos y solo son diagnosticados tras un contaje anormalmente alto de plaquetas en un análisis de sangre rutinario.

Los síntomas clínicos son bastante inespecíficos, especialmente al inicio. Entre ellos los más frecuentes son síntomas de origen vasomotor: cefalea, eritromelalgia y alteraciones visuales. También pueden aparecer debilidad, parestesias de manos y pies y vértigos. Las hemorragias más comunes son generalmente de carácter leve y se manifiestan habitualmente como epístaxis, equimosis o pequeñas hemorragias gastrointestinales. Pueden aparecer trombosis de grandes venas o arterias, siendo la TE la causa de la trombosis de la vena esplénica o hepática que desencadena el síndrome de Budd-Chiari. Es frecuente la aparición de isquemia en los dedos y en más de la mitad de los pacientes hay esplenomegalia, aunque, en general, no suele ser excesiva. Un 15-20% de los casos presentan además hepatomegalia.

### 2.2.2. Diagnóstico

Para la confirmación del diagnóstico de TE, los pacientes deben cumplir los criterios detallados en la Tabla 3:

**Tabla 3:** Criterios diagnósticos OMS 2008. Trombocitemia esencial

Criterios diagnósticos TE
1-Recuento plaquetario mantenido $> 450 \times 10^9/L$ (1)
2-Biopsia de médula ósea con proliferación del linaje de megacariocíticos e incremento de megacariocitos maduros en número y tamaño. No incremento significativo o desviación izquierda de granulopoyesis neutrofilica o eritropoyesis.
3- No evidencias de PV (2), MFP (3), LMC (4), SMD (5) u otra neoplasia mieloide.
4- Presencia de JAK2V617F u otro marcador clonal; o en ausencia de marcador clonal, no evidencia de trombocitosis reactiva (6).

(1): Durante el periodo de estudio/diagnóstico.(2): Requiere fallo de terapia sustitutiva de hierro con incremento de niveles de HB en el rango de PV con disminución de ferritina en suero. La exclusión de PV está basada en los niveles de HB y hematocrito. La medida de la masa eritrocitaria no es requerida. (3): Ausencia de fibrosis colágena y reticulínica, cuadro eritroblástico en sangre periférica, o marcada hiper celularidad de la médula ósea respecto a la edad, acompañado de morfología típica megacariocítica de mielofibrosis primaria: megacariocitos desde pequeños a grandes, con aberrante relación núcleo/citoplasma, nucleos hiper cromaticos, de contorno irregular y condensados. (4): Ausencia de cromosoma Philadelphia o del gen de fusión BCR/ABL. (5): Ausencia de diseritropoyesis y disgranulopoyesis.(6): Causas de trombocitosis reactiva incluyen: deficit de hierro, esplenectomia, cirugía, infección, inflamación, enfermedad del tejido conectivo, metástasis, desórdenes linfoproliferativos. Sin embargo, si hay datos de trombocitosis reactiva y se cumplen los 3 primeros criterios, no se excluye TE.

### 2.2.3. Tratamiento:

Al igual que en la PV, el tratamiento en la TE está orientado a controlar las posibles complicaciones trombóticas y hemorrágicas. En pacientes con alto riesgo trombótico está indicado el uso de tratamiento citorreductor con HU. En pacientes refractarios a HU (Tabla 4) el tratamiento de segunda línea es el Anagrelide, fármaco inhibidor de la maduración megacariopoyética. El INF- $\alpha$  solo está indicado en pacientes que no responden ni a HU ni a Anagrelide.

**Tabla 4:** Definición de respuesta clínico hematológica en trombocitemia esencial (TE) ELN 2009.

Grado de respuesta	Criterios
<b>Respuesta completa*</b>	1-Cifra de plaquetas $\leq 400 \times 10^9/L$ . 2.-No síntomas relacionados con la enfermedad. 3.-Bazo normal, por pruebas de imagen. 4-Cifra de leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ .
<b>Respuesta parcial**</b>	Cifra de plaquetas $\leq 600 \times 10^9/L$ , o descenso de la cifra de plaquetas en más del 50% respecto a la cifra basal.
<b>No respuesta</b>	Cualquier tipo de respuesta que no corresponda con los criterios de respuesta parcial.

\* debe reunir todos los criterios. \*\* En paciente que no cumplen todos los criterios de respuesta completa.

La supervivencia media de los pacientes con TE es de 10-15 años. Alrededor de un 2% de los casos pueden evolucionar a LMA, y menos de un 1% pueden terminar desarrollando fibrosis medular asociada a metaplasia mieloide [16].

### **3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN HEMATOPOYÉTICAS**

Las NMP se caracterizan por una expansión clonal descontrolada de ciertos precursores hematopoyéticos. Esta proliferación ha de ser producida por fallos en las cascadas de señalización proliferativas o en los mecanismos de control de las mismas. Ejemplo de ello es la mutación V617F en la tirosina quinasa JAK2. Esta mutación está presente en más de un 95% de las PV y en un 50% de las TE y MFP, siendo la aberración más común descrita en estas patologías hasta la fecha [9]. Otras alteraciones recurrentes en los NMP son las producidas en el Exón 12 de JAK2 y mutaciones en el receptor de trombopoyetina c-MPL.

En los siguientes apartados se describen las diferentes vías proliferativas relacionadas con la hematopoyesis, y su posible relación con la fisiopatogenia de estas enfermedades.

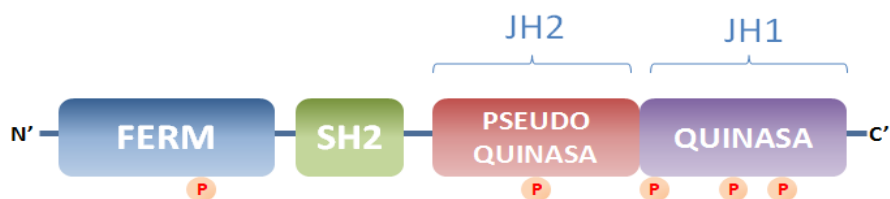
### 3.1. Señalización mediada por la vía JAK-STAT

El principal nexo de unión entre las diferentes NMP Phi negativas son las alteraciones del gen de *JAK2*. Este gen, perteneciente a la familia de las Janus quinasas, está involucrado en los procesos de transducción de señal mediado por citoquinas y es clave en la activación, proliferación y supervivencia de las células hematológicas.

#### 3.1.1. Familia Janus quinasa

En mamíferos existen 4 miembros de la familia Janus quinasa; JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 [17]. JAK1 se relaciona con la señalización mediada por IL6 y otras citoquinas[18, 19]. JAK3 está involucrado en la señalización mediada por receptores linfoides [20]. TYK2 forma parte de la cascada de activación de los genes relacionados con el INF- $\alpha$ . JAK2 por su parte, es activado en respuesta a la unión de un gran número de receptores de citoquinas con su ligando, entre ellos EPOR, c-MPL, G-CSF o IL3 e IL5. JAK2 a su vez, activa los efectores de las diferentes cascadas de señalización como STAT, MAPK, o AKT [17, 21].

Estas proteínas presentan 7 dominios conservados (Figura 4), ordenados de menor a mayor desde el C-terminal hasta el N-Terminal. Los dominios JH1 y JH2 también conocidos como dominio quinasa y pseudoquinasa respectivamente, son los encargados de la transducción y modulación de la señal captada por el receptor de citoquinas correspondiente. El dominio pseudoquinasa, tiene una alta homología con el dominio quinasa, pero carece de actividad catalítica. Este dominio actúa como modulador de la señal mediante la inhibición de la actividad de JH1[22].



**Figura 4:** Dominios comunes a las proteínas de la familia Janus quinasa.

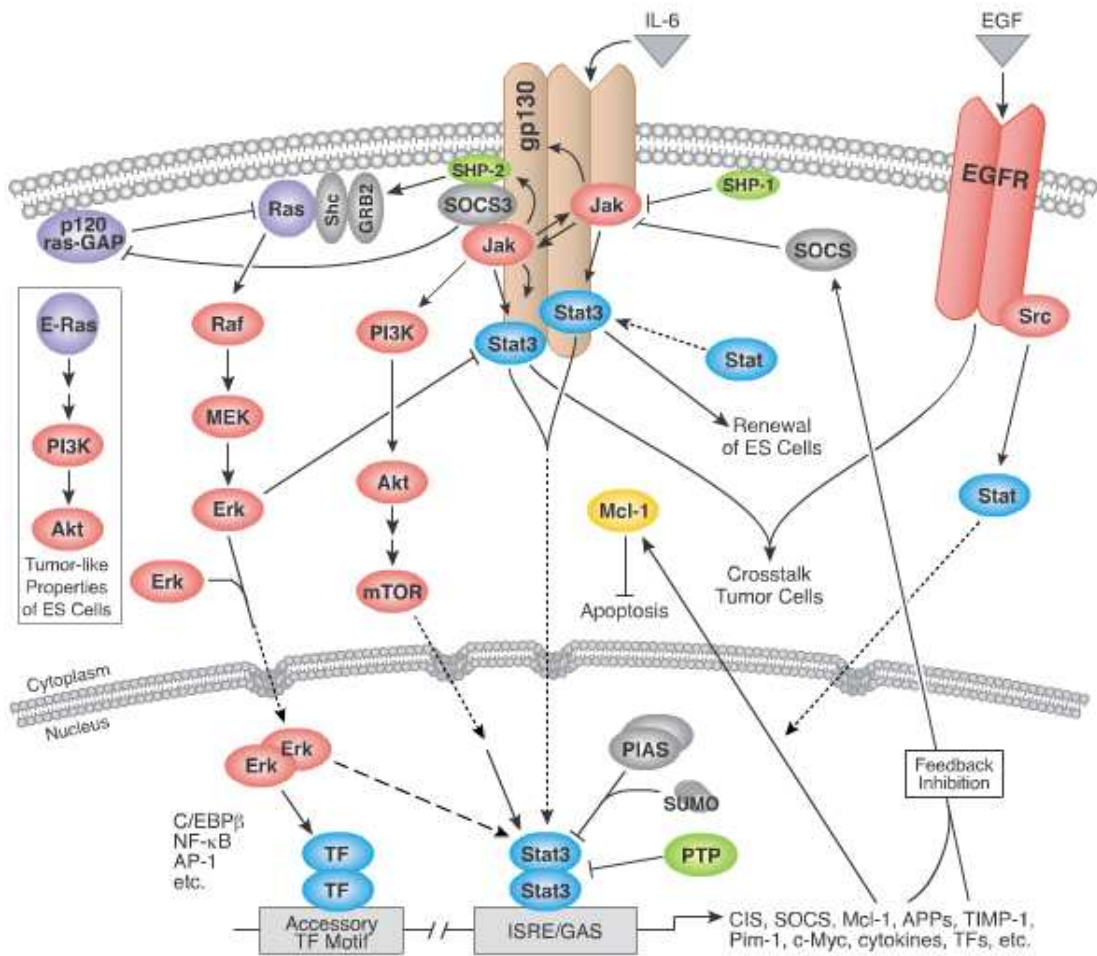
La región JH3-JH4 también conocida como SH-2, (Region homóloga al dominio 2 de SRC) se encarga de la unión a los efectores STAT y otros sustratos [23]. Por último, los dominios JH5-JH6-JH7 constituyen la región FERM (Four-point-one, Ezrin, Radxin, Moesin), que media la unión a los receptores de citoquinas y otras proteínas [24].

### 3.1.2. *Stats*

Todas las proteínas de la familia STAT (Signal transducers and activators of transcription), poseen en su estructura tres dominios conservados. El primero es un dominio SH2, encargado de la unión a los residuos fosforilados de tirosina quinasas y la dimerización de los propios STATs. El segundo es un dominio de unión a DNA, y el tercero se encarga de la activación transcripcional [25]. En mamíferos se han descrito 7 STATs diferentes. STAT1 y STAT2 se relacionan con las señales promovidas por INF. STAT4 y STAT6 son clave en el desarrollo de linfocitos Th1 y Th2 respectivamente. Dentro de esta familia, los genes más importantes para la hematopoyesis y que se relacionan con JAK2 son STAT5 [26] y en menor medida STAT3 [27]. La versatilidad de estas moléculas es mucho mayor de lo aquí expuesto ya que los diferentes STATs pueden dimerizar de forma heteróloga, formando por ejemplo dímeros STAT1/STAT5, STAT3/STAT2 que amplían enormemente la plasticidad de las señales mediadas por estas moléculas.

### 3.1.3. *Vía de señalización JAK/STAT*

La interacción entre el ligando y su receptor específico produce la dimerización del mismo, permitiendo que las moléculas de JAK2 ancladas a dicho receptor interaccionen entre sí, activándose mutuamente por fosforilación [28]. Esta activación permite el reclutamiento de las moléculas STAT, su fosforilación, dimerización, activación y posterior traslación al núcleo, (Figura 5) donde actúan como factor de transcripción de genes relacionados con la supervivencia y proliferación celular [27].



**Figura 5:** Principales vías de señalización relacionadas con JAK. Como se puede observar, la activación de JAK, desencadena la transducción de señal al núcleo mediada por las principales cascadas proliferativas, siendo el efector común de todas ellas las proteínas STAT.

La fosforilación de JAK2 permite a su vez la activación de las vías PI3K/AKT y MAPK induciendo a su vez los mecanismos del ciclo celular, de evasión de la apoptosis y de los diferentes factores de crecimiento.

Cabe destacar que tras la traducción, la proteína JAK2 se une a los diferentes receptores en el retículo endoplasmático. Esta unión es imprescindible para el correcto procesamiento del receptor en el aparato de Golgi y su posterior expresión en la superficie celular [29], por lo que no existen moléculas de JAK2 libres en el citoplasma. La eliminación del gen *JAK2* en modelos murinos causa la

completa desaparición de los progenitores eritropoyéticos, y la muerte a los 12 días de desarrollo embrionario [30].

#### 3.1.4. Regulación JAK STAT

La activación de la vía de señalización JAK-STAT es rápida pero de corta duración. Existen varios mecanismos de control negativo de la misma que la desconectan rápidamente. Uno de los mejor definidos son los supresores de la señalización por citoquinas (SOCS), proteínas de pequeño tamaño que también poseen un dominio SH2, el cual les permite competir con los STAT por la unión a JAK2 fosforilado [31]. Además, estos genes supresores de tumores pueden inhibir directamente JAK2 uniéndose a la región catalítica del mismo. Por último, Las proteínas de la familia SOCS tienen la capacidad de marcar las distintas enzimas involucradas en la señalización para su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma [32].

La regulación negativa de la vía JAK-STAT no solo está mediada por las proteínas de la familia SOCS. Otras proteínas implicadas en dicha regulación son las proteínas inhibidores de STAT activado (PIAS). Hasta el momento se han descrito 5 PIAS, todas ellas con un dominio de dedos de zinc en su estructura. Esto les permite bloquear de forma competitiva los sitios de unión de los diferentes STATs al ADN [33].

La última familia de proteínas con capacidad de inhibición de la vía JAK-STAT son las diferentes Tirosina fosfatasas (PTPs). Algunas de ellas, como las SHPs cuentan, al igual que las proteínas de la familia SOCS, con un dominio SH2 asociado al dominio fosfatasa, que les permite unirse a los residuos tirosina fosforilados de los diferentes transductores de señal [33]. El silenciamiento de las SHPs se ha encontrado en diferentes enfermedades hematológicas como la leucemia, linfomas y mieloma múltiple [34-36]. Además de las SHPs, otra tirosina fosfatasa, el ligando CD45, se ha definido como regulador clave de la vía JAK-STAT [37].

#### 3.1.5. Alteraciones de JAK2 y fisiopatogenia de NMP

Como se ha mostrado previamente, la activación de la vía JAK/STAT es clave en la hematopoyesis, y su regulación permite mantener la homeostasis. Esta regulación falla en los diferentes NMP.

El reemplazamiento de la guanina 1849 por una tirosina (G>T) en el gen *JAK2*, provoca el cambio de una valina por un fenilalanina en la posición 617 de la proteína final. Esta posición se encuentra en el dominio JH2 pseudoquinasa [9, 22], y la mutación impide que este dominio inhiba el dominio JH1 quinasa, produciéndose una activación constitutiva de la proteína *JAK2*. Esta activación se produce en ausencia de la unión de ligando a los diferentes receptores de citoquinas (EPO, G-CSF, c-MPL) y de forma independiente a los distintos mecanismos de regulación descritos, provocando la activación de las vías proliferativas como JAK-STAT, AKT y MAPK [9, 38, 39].

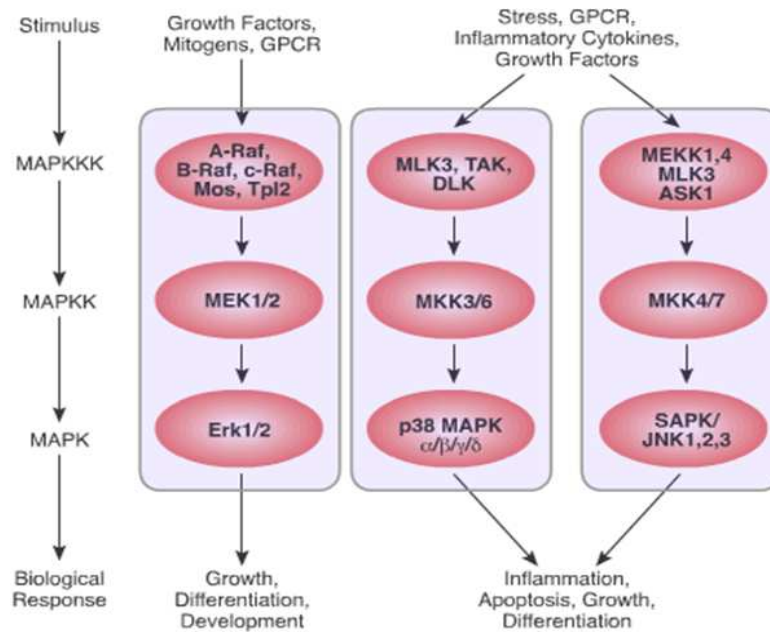
Otras alteraciones típicas relacionadas con la fisiopatogenia de las NMP son las mutaciones en el exón 12 de *JAK2*, encontrada en un 3% de las PV *JAK2* WT (del inglés “Wild Type”, tipo salvaje, no mutado) o la mutación del gen *MPL*, presente en entre un 5 % de las TE *JAK2* WT.

### **3.2. Descripción de la vía MAPK**

Como se ha comentado previamente, la señalización mediada por *JAK2* no solo se realiza a través de las moléculas STAT, sino que activa otros nodos dentro de las principales redes de señalización celular. En particular activa las vías MAPK y PI3K/AKT, que serán descritas a continuación.

Las “mitogen activated protein kinases” son tirosina quinasas citosólicas que median en procesos de proliferación, migración y supervivencia celular [40]. Estas proteínas no se engloban dentro de única vía lineal de señalización, sino en tres vías paralelas, que pueden estar interconectadas formando una red de señalización que pese a ser redundante, es mucho más robusta y modulable. Estas tres vías son la vía MAPK clásica (RAF/RAS/MEK/ERK) [21], la vía alternativa (P38) y la vía de JNK (Figura 6)

En función de su posición en la cascada de fosforilaciones, las MAP se clasifican como MAPKKK si son directamente activadas por los transductores de señal próximos al receptor, MAPKK a las serina treonina quinasas intermedias y MAPK a las proteínas finales de la vía, con capacidad de translocación al núcleo y posterior modulación de la transcripción génica [41, 42].



**Figura 6:** Proteínas pertenecientes a las vías MAPK. Extraído de [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)

Cada MAPKK se puede activar, en función del estímulo recibido, por más de una MAPKK quinasa (MAPKKK), y por quinasas pertenecientes a otras vías como AKT [21], incrementándose así la complejidad y diversidad de la señalización a través de estas vías.

La activación de las MAPKs requiere la fosforilación de residuos conservados de tirosina y treonina mediante las MAPKKs. La fosforilación de las MAPKs provoca la translocación al núcleo de éstas, donde activan factores de transcripción. Para entender la sutileza de la activación de estas redes, basta como ejemplo la MAPKKK RAF1. Esta proteína posee al menos trece sitios de regulación por fosforilación, siendo necesaria la fosforilación en S338, Y340 y Y341 para ser activa. A su vez RAF1 se une y activa específicamente a MEK1/2, pero puede actuar sobre numerosas otras dianas como factores de transcripción nucleares, proteínas presentes en el citoplasma y otras quinasas como AKT [43].

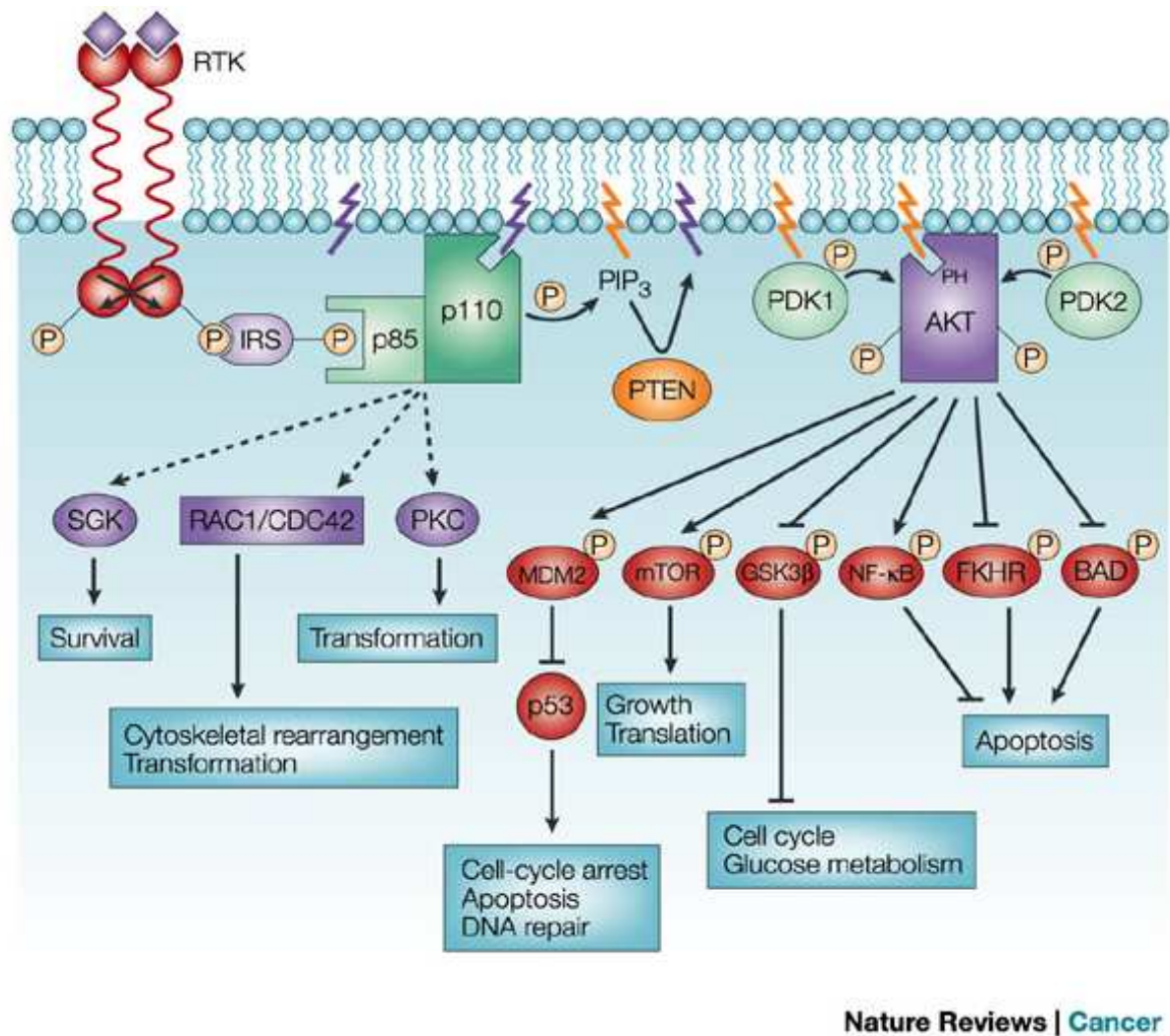
La activación y sobre-expresión de proteínas pertenecientes a esta familia como p38, RAF1 o MEK, ha sido relacionada previamente con la patogénesis de los NMP. [44-46]

### 3.3. Descripción de la vía PI3K/AKT

Otra de las vías clave en la red de señalización celular es la vía PI3K/AKT. Las fosfoinositol-3 quinasas (PI3K) son un grupo de proteínas que se caracterizan por fosforilar el grupo 3'-OH del anillo de inositol en fosfolípidos de membrana [47]. El sustrato principal de estas proteínas es el fosfoinositol 4, 5-bifosfato (PIP2). La activación de las PI3Ks se produce a través de los receptores de citoquinas, que una vez activados reclutan a PI3K uniéndose mediante los dominios SH2 de una proteína adaptadora (como JAK2) que actúa de enlace entre el receptor y la PI3K (Figura 7).

Tras la activación de PI3K se produce una cascada de modificaciones en ciertos fosfolípidos de la membrana que termina activando AKT. La proteína AKT/PKB es el homólogo celular del oncogén viral v-Akt que posee homología, a su vez, con las proteínas PKA y PKC. Existen tres isoformas de AKT en mamíferos: AKT1, AKT2 y AKT3. Tras activarse, AKT puede actuar a su vez sobre distintos sustratos relacionados con diversas funciones fisiológicas como la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la migración celular, la angiogénesis y el metabolismo de la glucosa [48].

La activación o sobre-expresión de PI3K/AKT se ha relacionado con diversas neoplasias como carcinomas pancreáticos, neuroblastoma y cáncer de ovario [49, 50]. También se ha encontrado una sobre activación y sobre-expresión del mismo en algunos modelos de NMP [9, 45, 51].



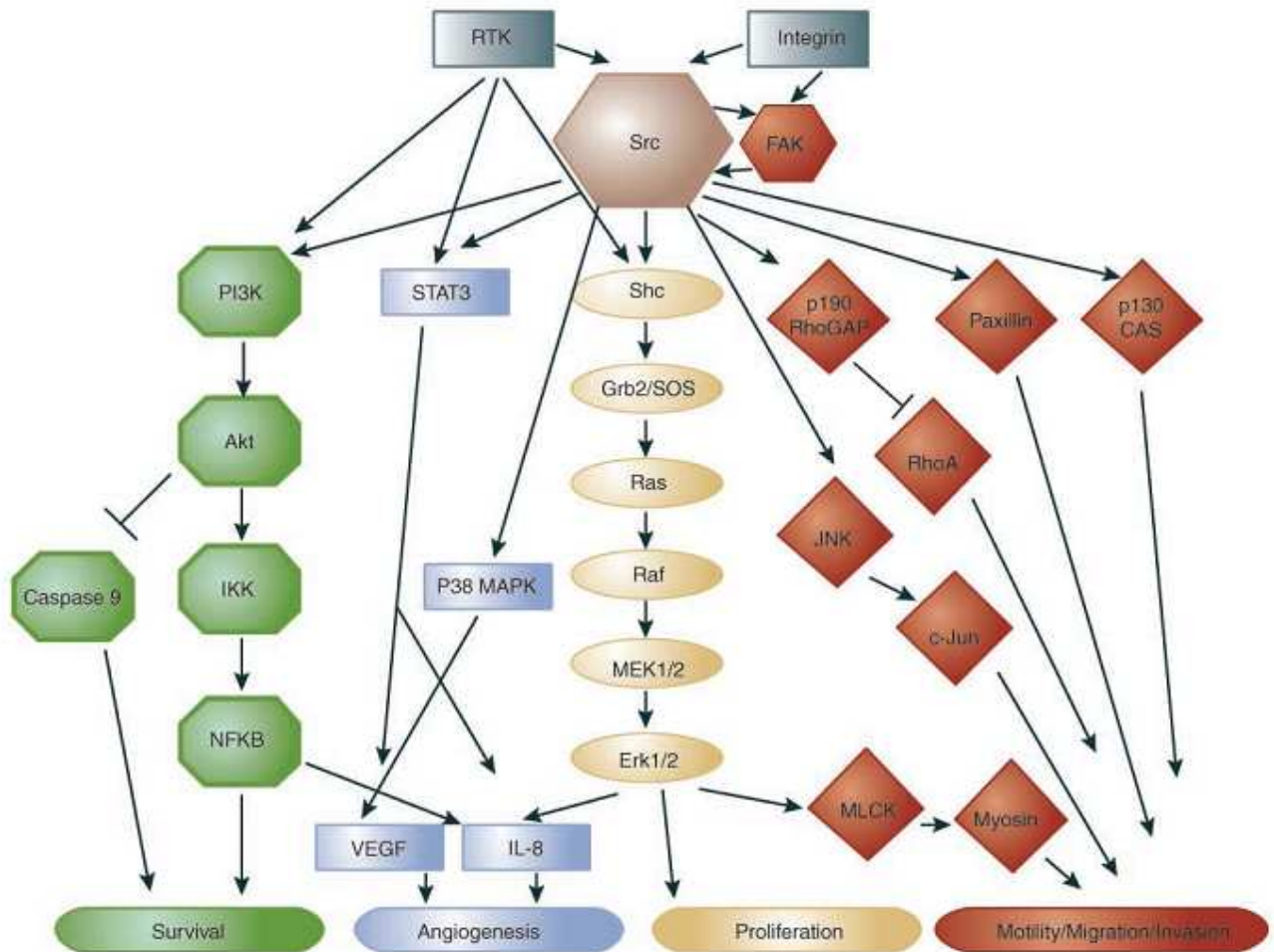
**Figura 7:** Señalización mediada por AKT. Se muestran la implicación de las proteínas PI3K (P85/P110) y AKT en las diferentes funciones celulares. RTK: Receptor unido a tirosina quinasa. Extraído de *Nature Reviews Cancer* 2, 489-501 (July 2010)

### 3.4. Descripción de las quinasas SRC

Como el resto de tirosina quinasas descritas, las proteínas de la familia SRC poseen un dominio SH2 que media las interacciones proteína proteína y un dominio quinasa efector. Estas proteínas actúan como crosslinker entre los receptores tirosina quinasa (RTKs) y las moléculas efectoras y factores de transcripción en multitud de procesos celulares como la proliferación, la adhesión o la migración celular [52]. Uno de sus efectores o dianas clave son las proteínas STATs [53], pero actúan sobre todas las vías proliferativas descritas anteriormente (Figura 8).

Niveles elevados de actividad de algunas proteínas de la familias SRC como Lyn y cSRC se han descrito en numerosos modelos celulares de cáncer [54, 55] Los

residuos de tirosina fosforilados en proteínas de esta familia son críticos en la activación de multitud de vías de señalización oncológicas. A la vista de estos resultados, se desarrolló el Dasatinib, originalmente contra estas dianas [56]. Posteriormente, esta molécula demostró un alto grado de eficacia contra el gen quimera BCR-ABL, hasta el punto que en la actualidad está siendo utilizado como tratamiento de primera línea en LMC.



**Figura 8:** Interacción de las SRC con las principales vías de señalización celular. Extraído de Justin, M y col. *Clinical Cancer Research* 2006.

Algunas de las proteínas de la familia SRC como LYN, pueden estar relacionadas con la señalización mediada por el receptor de la EPO y activar a STAT5, actuando de cross-linker en la trasducción de señales mieloproliferativas [57]. Más aun, algunas de las proteínas codificadas por genes de la familia SRC parecen no estar relacionadas con la cascada de señalización de JAK2. De hecho estas proteínas

tienen un rol similar a las proteínas de la familia JAK; se encuentran unidos a receptores sin actividad tirosina quinasa intrínseca, generando las primeras señales citosólicas [58]. Esto aumenta el interés del estudio en profundidad de estas dianas, ya que sus alteraciones en la expresión y activación serían independientes de las mutaciones en JAK2. De hecho, algunos grupos ya han ensayado Dasatinib, en líneas celulares y en pacientes con PV con cierto éxito [59, 60].

### **3.5. Proteínas de choque térmico**

Las “Heat Shock Proteins” (HSP) son chaperonas ATP dependientes que regulan el correcto plegamiento de sus proteínas diana y garantizan que éstas no pierden su estructura durante su vida útil, siendo ubiquitinadas y degradadas por el proteosoma, aquellas que pierden dicha estructura [61]. Además de regular la homeostasis de la célula, algunas HSP como la de 70KDa, se han relacionado con la evasión de la apoptosis y la supervivencia celular [62]. Otras como HSP90 han sido directamente relacionadas con proteínas clave en la fisiopatogenia de las NMP, como JAK2 [63, 64].

### **3.6. Inhibidores de tirosina quinasa**

Los inhibidores de tirosina quinasa son compuestos de pequeño tamaño diseñados para competir con el ATP por la unión al dominio quinasa [65], o con los sitios de control alostérico de estas proteínas [66]. El primer inhibidor de esta clase fue el mesilato de imatinib, dirigido contra la onco-proteína quinasa de fusión BCR-ABL, causa etiológica de la Leucemia Mieloide Crónica [67, 68].

Precisamente el análogo al imatinib, Dasatinib, además de inhibir BCR-ABL, actúa sobre otras tirosina quinasas como las pertenecientes a la familia SRC o c-KIT. Esta relativa inespecificidad puede ser una ventaja. Se ha comprobado que la presencia de otras tirosina quinasas activadas en el tumor, además de la diana, representan un mecanismo de resistencia importante para estos inhibidores [68-70]. Estas observaciones llevaron a la hipótesis de que la inhibición múltiple puede ser una estrategia terapéutica eficaz [71].

Aparte de mecanismos de resistencia, estos compuestos presentan una moderada toxicidad dosis dependiente, relacionada con la función de sus dianas. Para los

inhibidores de receptores implicados en la angiogénesis, como por ejemplo VEGFR, se ha descrito riesgo de hemorragia, trombosis e hipertensión. Para aquellos que inhiben EGFR, los principales síntomas de toxicidad son diarrea y erupción cutánea.

Sin embargo esta familia de compuestos representa una de las aproximaciones más novedosas para el manejo de multitud de neoplasias. El Ruxolitinib, por ejemplo, inhibidor de la familia Janus kinasa ha demostrado su eficacia en el manejo de la sintomatología de los casos mas graves de NMP [72].

### **3.7. Plataformas de cribado génico y proteómico**

Las técnicas de cribado génico como los microarrays de expresión han sido ampliamente utilizadas en los últimos años. Éstas permiten identificar patrones diferenciales de expresión génica entre las poblaciones a estudio. La bibliografía en este respecto en el campo de las NMP es amplia [44, 60, 73]. Sin embargo todos los autores coinciden en la necesidad de validar los datos obtenidos mediante técnicas mas precisas como la RT-PCR o incluso mediante estudios funcionales [69].

Por otro lado, la tecnología de microarrays de metilación, desarrollada recientemente, permite identificar los patrones de silenciamiento génico por metilación de islas CpG, fenómeno clave de regulación epigenética. La relativamente reciente aparición de esta técnica de análisis masivo, limita la bibliografía al respecto. Subero y col., encuentran una importante variabilidad entre los casos de pacientes con diferentes neoplasias hematológicas, sugiriendo que detrás de estos efectos pueden encontrarse errores en la maquinaria de regulación epigenética [74].

Por último, los análisis de expresión/activación proteica mediante geles 2D y espectrometría de masas permiten identificar diferencias de expresión, activación y modificación proteica. Esta aproximación se divide en dos partes a nivel experimental. En la primera se separan las proteínas de la muestra problema en función de su punto isoelectrico y su masa. El análisis bioinformático posterior permite la identificación de las proteínas (spots en el gel) diferencialmente expresadas entre las diferentes muestras. La extracción y análisis mediante espectrometría de masas permite la identificación de la secuencia, permitiendo así

obtener un mapa de la expresión diferencial a nivel proteico entre las poblaciones a estudio. No existen precedentes de este tipo de estudios en neoplasias hematológicas.

### **3.8.Efectos sinérgicos entre fármacos**

Dos fármacos que producen efectos similares, si se administran juntos, pueden mostrar una actividad superior, inferior o igual a la suma de sus efectos al ser administrados por separado. En el primer caso hablamos de efecto sinérgico. Si el efecto es menor a sus efectos por separado, estos compuestos se definen como antagonistas. Si su actividad en conjunto es similar a la suma de su actividades por separado, hablamos de efecto aditivo [75]. La aparición de este fenómeno, difícil de prever a nivel teórico, puede sin embargo ayudar a comprender los mecanismos de acción de los diferentes fármacos a nivel molecular [76].

A diferencia de las aproximaciones empíricas y estadísticas previas para cuantificar este fenómeno, Chow y Talalay, se valieron de la ley de acción de masas para derivar la ecuación del efecto medio, que permite calcular el índice de combinación [77], como se muestra en la sección de material y métodos.

## ***II. FUNDAMENTOS***



Las Neoplasias Mieloproliferativas Philadelphia negativas, son un conjunto heterogéneo de enfermedades, con una etiología muy compleja a nivel molecular. La alteración más frecuente es la mutación V617F de la proteína codificada por el gen *JAK2*. Esta mutación está presente en las tres NMP phi negativas, pero con diferente frecuencia. Por un lado, un 95% de las PV la presentan, sin embargo solo se encuentra en un 50% de las TE y MFP. Estas diferencias en la frecuencia de aparición, junto con el hecho de que una única mutación se relacione con tres fenotipos diferentes, sugieren que las mutaciones de *JAK2* no son alteraciones primarias en estas enfermedades, debiendo existir otras mutaciones que expliquen la aparición de las mismas.

Dado que las NMP se caracterizan por la expansión clonal adquirida de una célula madre hematopoyética con predominio de una línea celular específica, se puede establecer la hipótesis de que estas posibles alteraciones desconocidas deberan estar relacionadas con vías de señalización proliferativas o con eventos clave en la diferenciación específica de las distintas líneas mieloides.

Actualmente el tratamiento de los pacientes diagnosticados con NMP se basa en el control de la sintomatología mediante el uso de agentes anticoagulantes, antiagregantes, antiplaquetarios o citotóxicos como la hidroxiurea o el alfa interferón. Sin embargo estos tratamientos presentan importantes limitaciones, como el hecho de no eliminar el clon tumoral, la aparición de resistencia en un 20% de los casos o la necesidad de la supresión completa del mismo en otro 20% debido a efectos secundarios.

El desarrollo de nuevos fármacos, inhibidores de proteínas con actividad tirosina quinasa como Ruxolitinib diseñado contra *JAK2*, ofrece una potente nueva arma para tratar de forma específica las NMP. Sin embargo, pese a que los primeros estudios clínicos con este compuesto están mostrando una buena tolerancia y control de la sintomatología de la enfermedad, no elimina el clon patológico ya que no disminuye la carga tumoral de *JAK2* V617F. Tampoco disminuye la fibrosis medular y presenta ciertas complicaciones secundarias como el desarrollo de citopenias en pacientes con MFP.

Por estos motivos, es necesario determinar otras alteraciones moleculares que permitan definir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de este grupo de enfermedades así como ampliar el conocimiento etiopatológico de las mismas.

### ***III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



## ***Hipótesis***

1. Existen otras alteraciones moleculares diferentes a las de JAK2 que pueden definir la fisiopatogenia de las Neoplasias Mieloproliferativas Philadelphia negativas y justificar las diferencias entre Policitemia Vera y Trombocitemia Esencial.
2. El establecimiento y análisis de estas posibles nuevas alteraciones podría definir nuevas estrategias terapéuticas orientadas a estos pacientes.

## ***Objetivos***

1. Determinar mediante técnicas de cribado epigenético, genético y proteómico, alteraciones que puedan relacionarse con la etiología de las NMP.
2. Analizar los efectos de la inhibición de las dianas moleculares encontradas en diferentes modelos celulares de NMP.
  - a. Seleccionar inhibidores que, siendo lo más específicos posible contra las dianas establecidas, estén aprobados o en fase de validación en ensayos clínicos.
  - b. Determinar los posibles efectos antitumorales de dichos inhibidores y los mecanismos de acción a nivel molecular de los mismos, tanto en modelos celulares como en células primarias de pacientes diagnosticados con NMP
  - c. Analizar los posibles efectos sinérgicos de los inhibidores seleccionados con Ruxolitinib, en los diferentes modelos celulares analizados.
3. Determinar posibles nuevas herramientas predictivas de la definición de respuesta que permitan definir el tratamiento más adecuado para cada paciente NMP de forma personalizada.



## ***IV. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS***



## **1. PACIENTES**

En el presente estudio se han analizado muestras de 103 pacientes, de los cuales, 42 fueron diagnosticados de PV, 46 de TE JAK *V617F* positiva y 16 de TE JAK2 *V617F* negativa (WT). Todos los pacientes fueron diagnosticados aplicando los criterios de la OMS en el hospital de procedencia; Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid, Hospital del Mar de Barcelona, Hospital Infanta Leonor de Madrid, Hospital Virgen de la Salud de Toledo, Hospital Severo Ochoa de Madrid, Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital 12 de Octubre y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes, de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

### **1.1. Análisis epigenético de metilación**

Para analizar el perfil de metilación en NMP, se seleccionaron un total de 35 muestras de pacientes recogidas en el momento del diagnóstico; 11 TE JAK2 *V617F*, 12 ET JAK2 WT y 12 PV JAK2 *V617F*, así como 12 donantes control no enfermos.

De los 35 pacientes (21 mujeres/14 hombres), con una edad media de 59,5 años (rango: 34-78), tres de ellos presentaron eventos trombóticos al diagnóstico. El recuento medio de plaquetas fue de  $421 \cdot 10^9 / L$  (rango:  $201 \cdot 10^9 - 1328 \cdot 10^9$ ) en PV y de  $747,5 \cdot 10^9 / L$  ( $455 \cdot 10^9 - 1896 \cdot 10^9$ ) en TE. Los valores de hemoglobina en las poblaciones a estudio fueron de 18,7 g / dL (17,5-21,7) en PV y 14,8 g / dL (11,9-16,2) en TE. Seis de los pacientes diagnosticados con PV y tres casos de TE presentaban leucocitosis ( $> 12,53 \cdot 10^6$  leucocitos / L) al momento del diagnóstico. El recuento de leucocitos medio fue de  $12,4 \cdot 10^9 / L$  en PV (8,0-20,1) y de  $4,8 \cdot 10^9 / L$  (rango 4,8-13,7). Todas las muestras contenían más del 70% de neutrófilos.

### **1.2. Análisis de expresión génica**

En el análisis de expresión génica, se incluyeron 49 pacientes diagnosticados con NMP JAK2 *V617F* (21 PV y 28 TE), ocho pacientes con eritrocitosis secundaria (ES) a hipoxemia, y 30 donantes control no enfermos. De los 49 casos, 23 fueron estudiados en el momento del diagnóstico y 26 tras tratamiento con HU. Las

características clínicas y biológicas en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento se resumen en la Tabla 5. La respuesta al tratamiento con HU fue definida de acuerdo a las recomendaciones de Vannucchi et al. [78] y a los criterios de respuesta clínico hematológicos de PV y ET definidos en la conferencia de la European Leukimia Net de 2009[79].

**Tabla 5:** Características clínicas y de laboratorio en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio de expresión génica. TE=TE JAK2 V617F.

Variables clínicas y biológicas	PV tratadas	TE tratadas	PV diagnostico	TE diagnostico
Pacientes	10	16	11	12
Sexo (M/F)	5/5	6/10	6/5	2/10
Edad al diagnostico	64,5 (37-77)	65 (20-92)	57 (21-74)	56 (39-87)
Esplenomegalia	0/10	0/16	1/11	1/12
Hepatomegalia	2/10	2/16	1/11	0/12
Hemoglobina (g/100 mL)	20,05 (17,5-22,5)	15,2 (12,5-16,4)	15,5 (14,2-21,3)	13,9 (11,9-19,5)
Hematocrito	58 (51,1-66,4)	45,9 (38,5-49,4)	46,3 (42,7-61)	43 (39,2-59)
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	11,1 (5,91-14,7)	9,61 (5,96-19,2)	8,44 (5,2-14,34)	10,2 (6,9-14,8)
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	436,5 (305-1328)	821 (552-11580)	582 (215-819)	655 (538-996)
LDH incrementada	4/10	3/16	1/11	1/2
Eventos trombóticos (diag.)	0/10	3/16	2/11	1/12
Eventos Hemorrágicos (diag.)	0/10	2/16	0/11	0/12
Eventos trombóticos (trat.)	4/10	3/16	-	-
Eventos hemorrágicos (trat.)	0/10	0/16	-	-
Carga alélica JAK2V617F	20,5% (1,64-100)	6,9% (0,7-29,5)	36,8% (2,3-128,8)	23,5% (2,3-36,1)
Duración de la enfermedad *	60,5 (1-122)	118 (4-216)	0	0
Duración del tratamiento*	60,5 (1-122)	118 (4-216)	0	0
Respuesta a HU	4/10	7/16	-	-

\*Meses. Diag: Eventos al diagnóstico. Trat: Eventos tras el tratamiento, previos a la recogida de la muestra. WBC: Whole blood cells.

### 1.3. Análisis del perfil proteómico

Para el estudio proteómico se utilizaron 20 extractos proteicos citosólicos procedentes de pacientes diagnosticados con NMP. Además se incluyeron 10 casos control no enfermos. Las muestras se agruparon en “pooles” para reducir el número de genes necesarios. Los datos clínicos y biológicos de los pacientes

incluidos en este estudio están detallados en la Tesis Doctoral de Miguel Gallardo Delgado [80].

#### 1.4. Análisis funcionales

Con el fin de analizar en cultivos celulares los resultados obtenidos en los análisis previos, se desarrollaron cultivos celulares de colonias eritroides de 8 muestras de pacientes diagnosticados con PV y 14 diagnosticados con TE (3 de ellos sin la mutación JAK2 V617F). Ninguno de los pacientes incluidos presentaba tratamiento en el momento del estudio (Tabla 6). A parte de los casos patológicos, se incluyeron cuatro muestras de sangre periférica de donantes control no enfermos y 2 muestras de cordón umbilical.

**Tabla 6:** Datos clínicos de las muestras utilizadas en los estudios funcionales.

Variables	PV	TE JAK2 V617F	TE JAK2 WT
Pacientes	8	7	4
Sexo(M/F)	3/5	2/5	2/2
Edad Diagnostico	59,5 (35-81)	51,9 (34-94)	46,8
Esplenomegalia	2/8	3/7	0/3
Hepatomegalia	1/8	1/7	0/3
Hemoglobina (g/100mL)	17,35 (15,3-20,3)	14,55 (12,0-15,5)	15,9 (15,7-16,2)
Hematocrito	53,6 (45,5-60,5)	44,1 (37,4-47,9)	48,3 (46,6-49,9)
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	545,55 (346-904)	580,5 (477-694)	762,7 (514-895)
LDH incrementada	4/8	3/7	1/3
Carga alélica JAK2V617F	49,54 % (8,53-100)	28,11% (11-49,8)	-
Duración de la enfermedad*	37 (7-156)	29 (8-96)	53(12-144)
Duración tratamiento	10 (8-12)	9 (7-15)	-
Respuesta a HU	5/8	4/7	1/2
Eventos diagnostico	4/8	2/5	1/3

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Extracción de células, ácidos nucleídos y proteínas**

En los diferentes estudios realizados se ha trabajado con poblaciones celulares específicas obtenidas de muestras de sangre periférica o médula ósea. En el caso del microarray de metilación se utilizaron células totales tras lisis de eritrocitos (Red Blood Lysis Buffer, Roche Applied Sciences). Para el microarray de expresión se extrajeron los neutrófilos mediante una separación por gradiente de densidad de Ficoll-Paque (Farmacia, Mannheim, Alemania)[81]. Esta misma técnica se aplicó para separar las células mononucleadas utilizadas en los cultivos de colonias eritroides. Por último, en los cultivos de células madre mieloides se separó la población CD34 positiva a partir de células mononucleadas de médula ósea, mediante el empleo de bolas magnéticas ligadas a anticuerpos anti CD34 (Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania).

El número de células viables se determinó mediante contaje automático (Cultek), contaje con Azul Tripano o utilizando el ensayo colorimétrico WST-1 (Roche Applied Sciences). El Azul Tripano es un compuesto coloreado capaz de penetrar en las células muertas, siendo las vivas impermeables al colorante. Esto permite la distinción y determinación de ambas poblaciones en una cámara de Neubauer. En el ensayo con WST-1, la señal colorimétrica es detectada en células viables, en las que la sal soluble de tetrazolio es hidrolizada por la deshidrogenasa mitocondrial, dando como producto formazán, compuesto coloreado cuantificable a 450nm.

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el sistema automático de extracción Maxwell 16 SEV (Promega). La cantidad y calidad del DNA fue determinada en un espectrofotometro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies. Newark, USA).

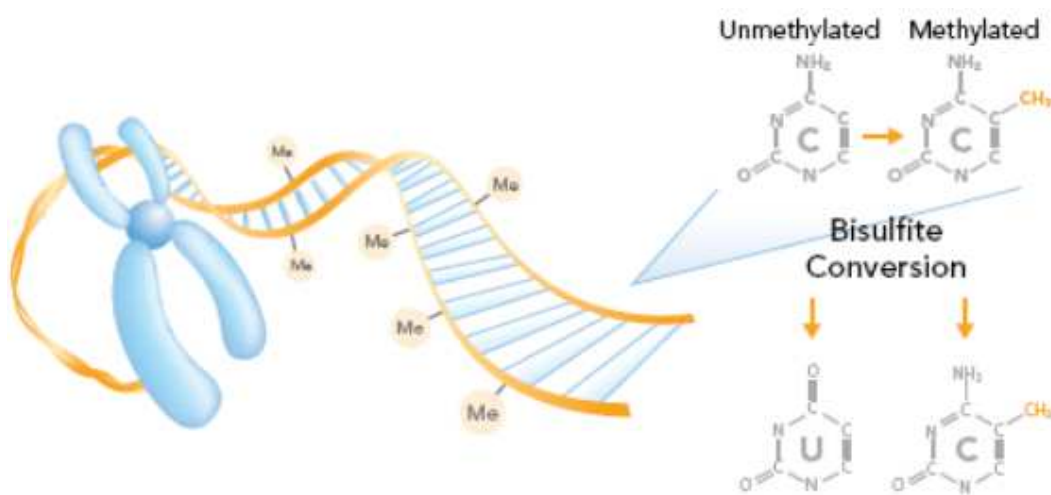
El ARN fue extraído a partir de al menos un millón de células con TRIzol®, (Invitrogen, Life Technologies). Tras determinar la cantidad y calidad del mismo en un Nanodrop, el ARN fue retrotranscrito por PCR a ADNc utilizando la retrotranscriptasa termoestable MMLV-modificada (Applied Biosystems).

Para la extracción proteica se aplicaron dos aproximaciones. En la primera, se separó proteína total lisando las células con el reactivo cytobuster (Roche Applied Sciences) en presencia de inhibidor de proteasas (proteínase inhibitor, Roche) y

fosfatasa (fosfatase inhibitor cocktail, roche). Para la separación de la fracción citosólica se utilizó el kit ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem). La concentración proteica se cuantificó mediante el método de Lowry utilizando el kit Dc Protein Assay de Bio-Rad.

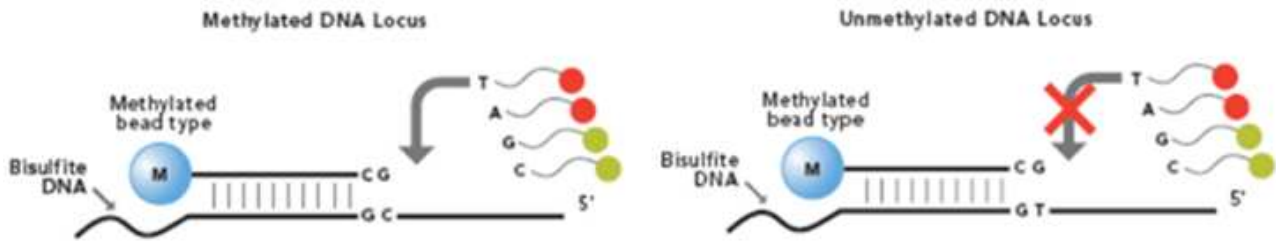
## 2.2. Microarray de metilación

Para desarrollar este análisis, realizado en la unidad de genotipado humano (CEGEN) del CNIO, el ADN de sangre periférica fue primero transformado con bisulfito utilizando el ensayo "Zymo EZ DNA methylation kit", (Zymo Research, CA, USA). Este reactivo transforma las citosinas no metiladas en uracilos, conservando las metiladas. Esto permite diferenciar unas de otras (Figura 9).



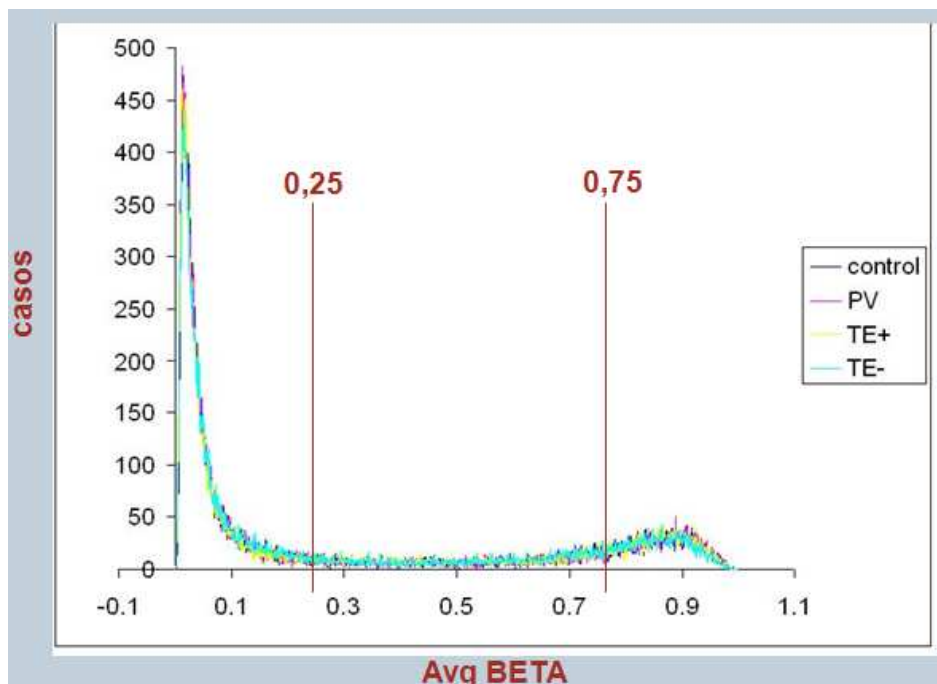
**Figura 9: Conversión del ADN con bisulfito.** Transformación de las citosinas no metiladas a uracilos mediante este reactivo (imagen extraída de [www.illumina.com](http://www.illumina.com)).

El ADN transformado con bisulfito es hibridado posteriormente a la plataforma HumanMethylation27 Beadchip DNA array (Illumina Inc., CA, USA). Este soporte permite analizar 27.578 loci CpG ubicados en las regiones promotoras de más de 14 000 genes. El grado de metilación es determinado gracias a que para cada isla CpG, hay un locus en el array con sondas fluorescentes específicas para ADN metilado incapaces de amplificar la secuencia no metilada y al contrario para el locus con sondas para ADN no metilado (Figura 10). El grado de fluorescencia comparado con un patrón proporciona el valor  $\beta$ , que describe el tanto por uno del grado de metilación de una isla CpG concreta de la muestra.



**Figura 10. Esquema de identificación de la metilación.** A la izquierda se observa como una sonda específica para una isla CpG metilada, permite la amplificación y posterior detección del fragmento gracias a los dNTP marcados. A la derecha se muestra como esta misma sonda no permite la amplificación de la isla CpG no metilada, en la que la C se transformó en U y está, tras la transcripción inversa, pasó a T.

En función del valor  $\beta$  obtenido, se definieron tres intervalos de estudio para cada muestra específica perteneciente a una de las poblaciones analizadas. Valores inferiores de 0,25 fueron consideradas muestras hipometiladas (Figura 11). Los casos con un  $\beta$  mayor de 0,75 se definieron como hipermetiladas. Los casos con valores  $0,25 < \beta < 0,75$  por su parte, fueron definidos como hemimetilados.



**Figura 11:** Mapa de frecuencias de valor  $\beta$  en las diferentes poblaciones estudiadas.

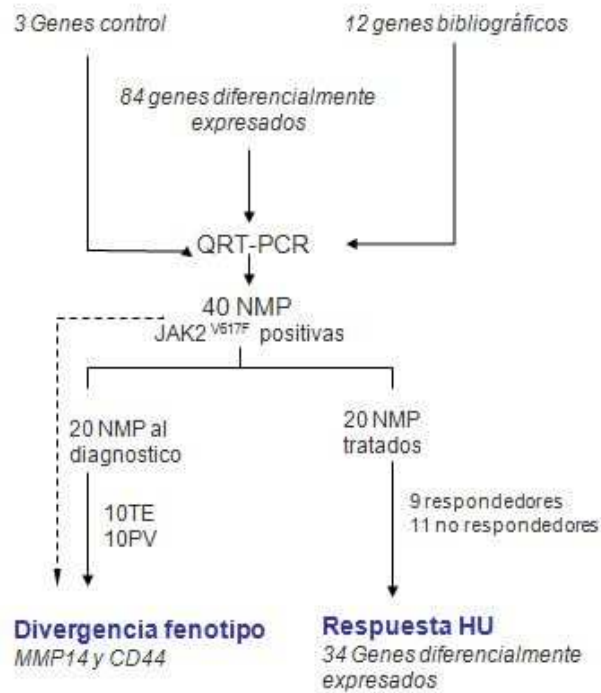
### **2.3. Microarray de expresión**

En este estudio se incluyeron muestras de 14 pacientes diagnosticados con NMP que presentaban la mutación JAK2 V617F (3 PV y ET 11). Además se incluyeron 20 muestras procedentes de donantes control no enfermos, analizados en grupos de cinco muestras. De las 14 NMP estudiadas, 11 estaban bajo tratamiento con HU y las tres restantes no habían sido tratadas antes de la obtención de la muestra.

EL Perfil de expresión se obtuvo utilizando el “Whole Human Genome Oligo Microarray Kit” (Agilent Technologies, Inc.) en la plataforma de microarrays de la unidad de linfomas del CNIO. Resumiendo, tras amplificar la muestra con el kit de amplificación de ARN (Agilent Technologies), está se marcó con CY3. Como control de la expresión, se utilizó el ARN de referencia “Stratagene Universal Human Reference RNA” (Agilent Technologies) marcado con CY5. Las muestras amplificadas y marcadas fueron hibridadas sobre el soporte Agilent 44K human whole genome microarrays, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron escaneadas con el G2565BA Microarray Scanner System (Agilent Technologies).

### **2.4. PCR cuantitativa en tiempo real**

Los resultados del microarray fueron validados mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (TLDA, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) en las que se incluían ensayos taqman para 96 genes. A parte de los genes seleccionados mediante los resultados de *microarrays* se añadieron genes de interés clínico o biológico desde el punto de vista bibliográfico y tres genes control *GAPDH*, *18s rRNA* y *ABL1* (Figura 12). Además, por problemas en la configuración de la placa, algunos de los genes fueron analizados de forma individual mediante ensayos de expresión TaqMan (Applied Biosystems).



**Figura 12:** Diagrama de flujo del diseño experimental seguido en el análisis de expresión génica.

En todos los ensayos se utilizó ADNc de neutrófilos de sangre periférica. La RT-PCR fue realizada por duplicado en el termociclador ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Por último se analizaron 4 muestras mas en placas de 96 pocillos (Taqman express plates, Applied Biosystems) en un termociclador ABI PRISM 7500HT. Este soporte tenía la misma configuración de los ensayos que las TLDA.

## 2.5. Geles 2D DIGE y espectrometría de masas

En este análisis se utilizaron proteínas de la fracción citosólica extraídas mediante el kit ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) a partir de neutrófilos separados de sangre periférica mediante la técnica de gradiente de densidad de ficoll. Los eritrocitos fueron eliminados mediante una lisis con un buffer comercial (Red Blood Lysis Buffer, de Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). Los extractos proteicos fueron enviados a la unidad de proteómica del CNB donde fueron procesados y analizados.

## 2.6.Cultivos celulares

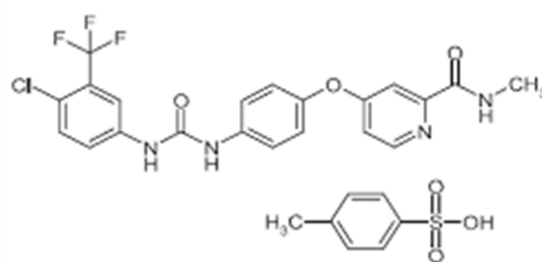
### 2.6.1. Reactivos

El material plástico utilizado en cultivos celulares fue suministrado por Corning (Corning, NY, USA) o NUNC (Nümbrecht, Alemania). El medio de cultivo RPMI-1940, la sero albumina bobina (BSA), el tampón PBS y el DMSO fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). El medio IMDM, el suero bovino fetal (FBS), la Tripsina-EDTA y los antibióticos (Penicilina-Estreptomicina) y antifúngico se obtuvieron en la casa Lonza. Para el cultivo de colonias eritroides se utilizó el medio MethoCult H4230 suplementado con rhIL3 (20ng/mL), rhSCF (50ng/mL) y en el caso de los cultivos facilitados, con 3U/mL de rhEPO, todos ellos de StemCell (Vancouver, Canada).

A continuación se describen los diferentes compuestos inhibidores utilizados en los estudios de viabilidad.

#### a. Sorafenib

El Sorafenib (Sorafenib tosilato, SelleckChem. Munich, Germany) es una molécula de pequeño tamaño con efecto inhibidor de múltiples tirosina quinasas (Figura 13). Tiene actividad antitumoral y antiangiogénica, induciendo apoptosis en numerosos modelos tumorales.



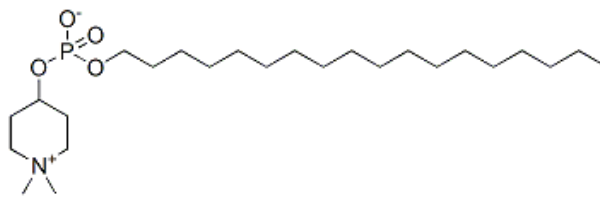
**Figura 13: Tosilato de Sorafenib;** 4-(4-(3-(4- Cloro-3-(trifluoro-metil) fenil) ureido) fenoxi) N2 metilpiridina-2-carboxamida-4-metilbencenosulfonato.

Entre sus principales dianas se encuentran las quinasas Raf-1 (IC<sub>50</sub>=6nM), B-Raf (IC<sub>50</sub> 22nM), VEGFR1/2/3, Flt-3, c-Kit, c-Ret y PDGFRβ (223, 230). Sin embargo no inhibe de forma significativa otras MAPK como MEK-1 o ERK-1 (IC<sub>50</sub>>10uM).

Sorafenib ha sido aprobado para el tratamiento del cáncer renal avanzado (RCC) y carcinoma hepatocelular (HCC).

#### b. Perifosine

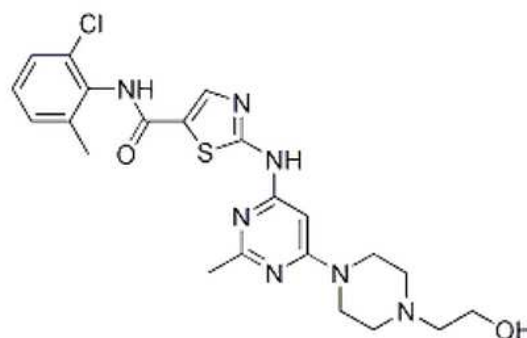
Compuesto de tipo alquil-fosfocolina (Figura 14) activo por vía oral, de potencial efecto antineoplásico. Actúa como inhibidor de la vía AKT y actualmente está aceptado su uso en el tratamiento del Mieloma Múltiple y el Neuroblastoma. El Perifosine fue adquirido en Selleckchem.



**Figura 14:** Estructura química del Perifosine.

#### c. Dasatinib

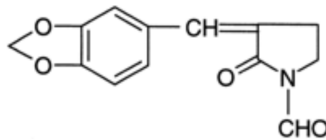
Actualmente, aprobado para el uso en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica (LMC) como alternativa del imatinib y de leucemia linfoblástica aguda positiva para cromosoma Philadelphia (LLA + Ph'). Se está evaluando su uso en otros tipos de cáncer incluyendo el cáncer de próstata avanzado. Además de su efecto sobre la proteína BCR-ABL, Dasatinib tiene actividad inhibitoria sobre otras proteínas tirosina quinasa como las pertenecientes a la familia SRC. Este compuesto fue adquirido en Selleckchem.



**Figura 15:** Estructura química del Dasatinib

d. KNK437

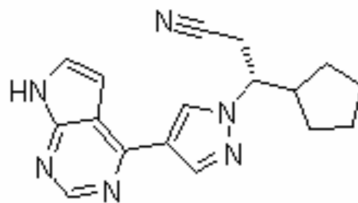
KNK437 inhibe la síntesis de la proteínas de choque térmico HSP70, HSP72 y HSP105. Estas proteínas se han relacionado recientemente con el procesamiento de algunas tirosina quinasas como JAK2. El KNK437 fue adquirido en la casa Tocris.



**Figura 16:** Estructura de inhibidor de HSP70 KNK437

e. Ruxolitinib

Fármaco usado en el tratamiento de la Mielofibrosis de intermedio-alto riesgo. Está siendo investigado su uso en otros tipos de cáncer y en la Psoriasis. Se trata de un inhibidor de Janus Quinasa (JAK) con especial selectividad por los subtipos 1 y 2. El Ruxolitinib fue cedido por Novartis.



**Figura 17:** Estructura química del Ruxolitinib

2.6.2. Líneas celulares

a. Líneas HEL

La línea celular HEL fue obtenida de la colección europea DSMZ (Braunschweig, Alemania). Las células se cultivaron en RPMI-1640 con L-Glutamina y NaHCO<sub>3</sub>, suplementado con 10% de suero bovino fetal, a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL, utilizando flask de 25cm<sup>2</sup>. La incubación se realizó en atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Se realizó un cambio de medio a las 24 horas y se realizaron pases cada 3-4 días (confluencia del medio de cultivo).

Además a partir de este modelo se desarrollo otro resistente a HU: HELR, tras cultivar las células durante 4 meses con una presión selectiva de 0,1mM de HU.

b. Líneas derivadas de BAF3

El modelo murino BAF3 producido a partir de células ProB tiene la ventaja de ser fácilmente transformable. La línea BAF3 pura fue obtenida en DMSZ. Además para este estudio se dispuso de 2 modelos transformados, uno con EPOR y JAK2V617F y otro con EPOR y JAK2 V617F WT.

Esta línea, IL3 dependiente, fue cultivada en RPMI-1640 con L-Glutamina y NaHCO<sub>3</sub>, 10% de suero bovino fetal y 10% de medio suplementado con IL3, obtenido a partir de medio filtrado tras 48h de cultivo de células WAHI, productoras de IL3.

c. Línea HL60

Línea celular procedente de una Leucemia mieloide Aguda obtenida de DMSZ. Cultivada en RPMI-1640 con L-Glutamina y NaHCO<sub>3</sub>, suplementado con 10% de suero bovino fetal.

d. Línea K562

Línea celular procedente de una Leucemia mieloide Aguda obtenida de DMSZ, cultivada en RPMI-1640 con L-Glutamina y NaHCO<sub>3</sub>, suplementado con 10% de suero bovino fetal.

e. Línea WAHI

Esta línea fue utilizada para producir medio enriquecido en IL3, necesario para el mantenimiento de la línea BAF3. Se cultivó en RPMI-1640 y tras 48h fue tripsinizada, y el medio centrifugado y filtrado.

*2.6.3. Mantenimiento y congelación de las células*

Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada tres días y las células fueron utilizadas en su fase de crecimiento exponencial para cada ensayo realizado. Para conservar durante largo tiempo las líneas celulares, se resuspendió un millón de células en 1mL de medio de congelación (DMSO /SBF 10% y fueron almacenadas en criotubos, congelados

en metanol lentamente hasta  $-80^{\circ}\text{C}$ . Antes de 72h éstos se almacenaron en un contenedor de nitrógeno líquido. La descongelación de las células se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de  $37^{\circ}\text{C}$  hasta la descongelación de su contenido, que rápidamente fue diluido 10 veces en el medio de cultivo apropiado según la línea celular.

## **2.7. Ensayos de inhibición**

Para el ensayo de inhibición, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células/mL. Tras 24h mantenidas sin tratamiento para alcanzar la sub-confluencia, las células se incubaron 3, 24 y/o 48h en presencia de las diferentes concentraciones de los inhibidores. Todos los estudios se realizaron por duplicado, con dos controles positivos, uno sin tratar y otro con DMSO al 0,1% y uno negativo sin células. Tras los diferentes periodos de incubación, las células se extrajeron y lavaron con PBS y se analizaron los resultados mediante el test de viabilidad WST.

### *2.7.1. Ensayos con ARNi ZNF577*

Para la transformación de las diferentes líneas celulares con el ARNi ZNF577 (Novus biologicals) se utilizaron diferentes concentraciones del mismo (10 y 50nM) y de células ( $0,5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^5$  células/mL). Primero, a las diferentes concentraciones de ARNi diluido en medio Optimem (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), se les añadió 1uL de Lipofectamida (calbiochem). Tras mezclar e incubar 15min, se añadieron las células y se incubaron 48h.

## **2.8. Cultivo de colonias en metilcelulosa**

$2,5 \times 10^5$  células mononucleadas/mL procedentes de sangre periférica fueron cultivadas en 500  $\mu\text{l}$  de medio de metilcelulosa enriquecido con eritropoyetina (en el caso de de cultivos facilitados), IL-3 y SCF en placas p24. Los cultivos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en una estufa con una humedad relativa del 100% y  $\text{CO}_2$  al 5%. Todos los análisis fueron realizados por duplicado. Los resultados se analizaron a los 14 días tras la siembra de las células mononucleadas.

Se consideró BFU-E a la agrupación de varias colonias (3 a 7) constituidas cada una de ellas por una agrupación celular de más de 50 células. Las colonias eritroides se identifican por presentar una tonalidad rojiza a veces muy intensa debido a la hemoglobina que contienen los eritroblastos.

## 2.9. Citometric Bead Arrays

Para analizar a nivel molecular los efectos de los diferentes compuestos sobre las células mononucleadas de pacientes, se cuantificó la expresión de las proteínas y fosfoproteínas AKT, MEK, P38 y STAT1 mediante la tecnología de citometric bead array (CBAs). Esta técnica se basa en que cada anticuerpo específico está unido a una microesfera con una intensidad de fluorescencia característica.

Para discriminar las diferentes microesferas entre sí, éstas emiten de forma distinta en dos canales diferentes. En función de la intensidad de fluorescencia se puede discernir la posición relativa de una esfera con respecto al resto de poblaciones. Para conocer la cantidad de proteína que tiene una muestra se utiliza un anticuerpo de detección conjugado a PE, que permite cuantificar la cantidad de proteína ligada a una población, proporcional a la fluorescencia emitida.

Los anticuerpos utilizados fueron seleccionados contra las proteínas: fosfo-STAT1, fosfo-MEK, fosfo-P38, fosfo-AKT, y las correspondientes proteínas no fosforiladas, STAT1, MEK, P38 y AKT. El valor de cada proteína fosforilada fue normalizado frente a la concentración de su proteína no fosforilada.

## 2.10. Cultivo de células madre hematopoyéticas

Para este estudio, se reprodujo el ensayo de inhibición en cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas, pero con células madre hematopoyéticas utilizando la misma técnica, con la salvedad de que en vez de  $5 \times 10^5$  células mononucleadas, se sembraron  $2 \times 10^3$  células CD34 positivas por pocillo.

Las células madre CD34 positivas se extrajeron de muestras de médula ósea de pacientes diagnosticados con NMP sin ningún tipo de tratamiento (dos PV y dos TE JAK2 V617F). Se separó la fracción CD34 positiva mediante el empleo de bolas magnéticas conjugadas a anticuerpos específicos contra CD34 utilizando columnas LS y un separador manual (Miltenyi Biotec).

## 2.11. Western blot

La electroforesis se realizó en los soportes para electroforesis SDS-PAGE Electrophoresis Module (Bio-RAD). Las proteínas se separaron en geles, al 10% Acrilamida/bisacrilamida (Bio-RAD), cargados con 20-30  $\mu\text{g}$  de lisado proteico en

tampón de electroforesis (0.1% SDS en Tris/Gly 1X, PH 8.3) en presencia de un campo eléctrico uniforme de 100V, durante 45 minutos. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham Hybond-ECL (GE Healthcare) en tampón de transferencia (20% v/v metanol, 250 mM tris, 1,92M Gly) a 100Vy 4°C.

Para el bloqueo de la membrana se utilizó tampón PBS 0,1% Tween con 5 % m/v de leche desnatada en polvo, excepto para las incubaciones con anticuerpos dirigidos contra residuos fosforilados, en las que se utilizó BSA al 2%, para evitar la interacción inespecífica de dichos anticuerpos con los grupos fosfato presentes en la caseína de la leche. Para la detección se utilizó el reactivo ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

#### *2.11.1. Anticuerpos*

Los anticuerpos utilizados en el western blot, anti-JAK2, anti-phosfo-JAK2 (Tyr1007/1008) anti-SRC, anti-phosfo-SRC (Tyr416), anti-ERK (p44/42 MAPK), anti-phosfo-ERK (Thr202/Tyr204), anti-p38, anti-phosfo-p38 (Thr180/Tyr185) anti-AKT, anti-phosfo-AKT (Ser473) anti-STAT5, anti-phosfo-STAT5 (ser456), anti-LYN, anti-phosfo-LYN (Tyr507), todos ellos producidos en conejo, fueron adquiridos en Cell Signaling (Beverly, MA, USA). El anticuerpo secundario conjugado con HRT también provenía de Cell Signaling. El Anti-ZNF577 de ratón y el correspondiente anti IgG de ratón provenían de la casa Novus Biologicals

### **2.12. Citometría de flujo**

Para determinar el inmunofenotipo de las células mononucleadas en cultivo de metilcelulosa tras el tratamiento con los diferentes fármacos, se realizó citometría de flujo de las mismas. Para ello, tras extraer y lavar las células con PBS, éstas se incubaron en presencia de los anticuerpos marcados fluorescentemente resumidos en la Tabla 7.

**Tabla 7:** Anticuerpos utilizados en citometría de flujo

Reactivo	Marcaje fluorescente	Población diana	Concent. (v/v)	Casa comercial
anti-CD71	FITC	Eritroide	4%	BD Bioscience
anti-CD41a	FITC	Megacariocítica y plaquetaria	4%	"
anti-CD45	PerCP	Pan-leucocitaria	4%	"
anti-CD34-APC	APC	Progenitores Hematopoyéticos	2%	"
Anexina V	APC	Células apoptóticas	2%	"

Como control de isotipo se utilizaron anti-IgG1-PE-PerCP, anti-IgG2a-FITC y anti-IgG2b  $\kappa$ -APC. Todos los anticuerpos se obtuvieron en la casa BD (BD Biosciences Europe, Oxford, UK). Para analizar la apoptosis en los cultivos se utilizó Anexina V-APC en binding buffer 1X (BD Biosciences).

### 2.13. Análisis Estadístico de los datos

Para el análisis del microarray de metilación se asumió que existía metilación diferencial de un gen entre 2 poblaciones cuando cumplieran las dos condiciones siguientes[74];

- La diferencia de los valores  $\beta$  (valor  $\Delta\beta$ , correspondiente a la resta del valor numérico asociado a la metilación de una de las poblaciones respecto a la otra ) era mayor a 0.3
- El Differential Score, es decir el resultado de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney corregido mediante el False Discovery Rate (FDR), es superior a 20.0.

La descripción del preprocesado y análisis de los datos de microarray de expresión están descritos en detalle en la tesis del Dr. Miguel Gallardo [80]. Estos análisis fueron realizados con la suite GEPAS (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es>)[55].

Para el análisis de la PCR cuantitativa en tiempo real, la cuantificación relativa se determinó mediante el método comparativo del cycle threshold (Ct) utilizando la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  (36). Los datos fueron analizados mediante análisis no paramétrico

de Mann-Whitney mediante el programa SPSS15 (SPSS Inc.). La significación estadística fue definida para un P-valor menor a 0.05.

Los resultados de Citometría de flujo fueron analizados con el software Summit 4.3 (DAKO, Colorado). Los resultados se compararon entre las diferentes poblaciones mediante un test de Mann-Whitney.

Los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad celular fueron analizados con el programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA), para calcular el IC50 se ajustaron los datos a una curva sigmoideal utilizando el software GraphPath Prism. Para determinar el grado de sinergia en las combinaciones de fármacos utilizadas se utilizo el programa CalcuSyn. Este programa utiliza la ecuación de Chou-Talalay, derivada de la ley de acción de masas y modelos de cinética enzimática, para calcular el índice de combinación (CI).

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} + \frac{(D)_1 (D)_2}{(Dx)_1 (Dx)_2}$$

El índice de combinación entre fármacos indica la existencia de sinergia para una combinación de dos fármacos cuando  $CI < 1$ , es decir el efecto de ambos fármacos se ve potenciado al combinarlos. Dicha combinación es aditiva cuando  $CI = 1$ , es decir, el efecto de un fármaco se suma al efecto de otro sin potenciarlo. La combinación es antagónica cuando  $CI > 1$ ; el efecto de ambos fármacos se ve disminuido al ser combinados entre sí.



## ***V. RESULTADOS***

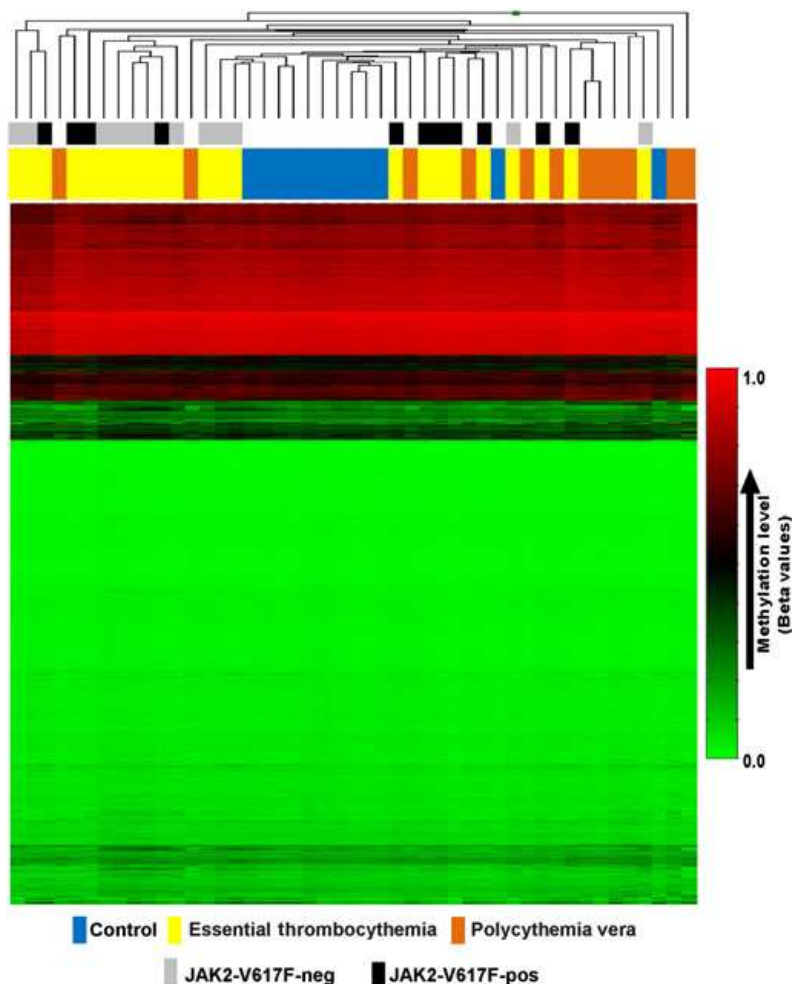


## 1. ANÁLISIS DE METILACIÓN

### 1.1. Análisis Global

Con el fin de analizar los valores de metilación de los 27 000 loci CpGs en los 35 casos de pacientes NMP y las 12 muestras de control, se realizó un clúster jerárquico no supervisado y un Heat map con todos los datos del array.

Como se observa en la Figura 18, pese a que la mayoría de los controles fueron agrupados en el clúster, no se observaron diferencias claras entre las diferentes NMP, especialmente entre TE JAK2 V617F y TE JAK2 WT. Además, el Heat map reveló que el patrón de metilación de ADN era muy homogéneo tanto entre los subtipos de NMP como entre éstos y los donantes control.



**Figura 18:** Clúster jerárquico y Heat map de los valores de metilación (valor  $\beta$ ) de los 27.578 loci CpG analizados. Las columnas representan las muestras, las filas los loci CpG. La barra de la derecha muestra el nivel de metilación de 0 (verde) a 1 (rojo).

## 1.2. Metilación en genes SOCS

La matriz del array incluía 31 loci CpG pertenecientes a diferentes genes de la familia SOCS: ocho encontraban en la región promotora de SOCS-1, 14 en SOCS-2, dos en SOCS-3, otros dos en CISH y el resto se situaban en los genes SOCS 4, 5 y 6. Por motivos bibliográficos nos centramos en el estado de metilación de SOCS-1, SOCS-3 y SOCS-4[82, 83]. Este análisis nos permitió determinar dos regiones CpG pertenecientes a los genes SOCS-1 ( $\beta_{PV}=0,659$ ) y SOCS-4 ( $\beta_{PV}=0,932$ ) altamente metiladas en muestras de pacientes de PV JAK2 V617F, TE JAK2 V617F y TE JAK2 WT (Tabla 8).

**Tabla 8:** Valores  $\beta$  de los genes de la familia SOCS. La metilación de una muestra específica perteneciente a uno de los grupos analizados se define como hipermetilada para  $\beta > 0,75$ , hemimetilada para  $0,25 < \beta < 0,75$  e hipometilada para  $\beta < 0,25$ .

GENES	Isla CpG		PV	TE V617F	TE WT	Controles
N			12	11	12	12
ZNF 577	Cg16731240	Avg $\beta$	0,573	0,286	0,248	0,138
		Casos				
		hyper.	5	1	0	0
		hemi.	4	3	3	0
		hypo.	3	7	9	12
SOCS 1	Cg10784813	Avg $\beta$	0,659	0,619	0,593	0,546
		Casos				
		hyper.	6	4	2	1
		hemi.	5	8	10	11
		hypo.	0	0	0	0
SOCS 2	Cg06630241	Avg $\beta$	0,235	0,256	0,305	0,302
		Casos				
		hyper.	0	0	0	0
		hemi.	1	3	6	7
		hypo.	10	9	6	5
SOCS 3	Cg15502888	Avg $\beta$	0,0278	0,0286	0,0309	0,0331
		Casos				
		hyper.	0	0	0	0
		hemi.	0	0	0	0
		hypo.	12	11	11	12
SOCS 4	Cg08292050	Avg $\beta$	0,932	0,904	0,929	0,940
		Casos				
		hyper.	12	11	12	12
		hemi.	0	0	0	0
		hypo.	0	0	0	0
CISH	Cg08996521	Avg $\beta$	0,0428	0,0592	0,0551	0,0786
		Casos				
		hyper.	0	0	0	0
		hemi.	0	0	0	0
		hypo.	12	11	12	12

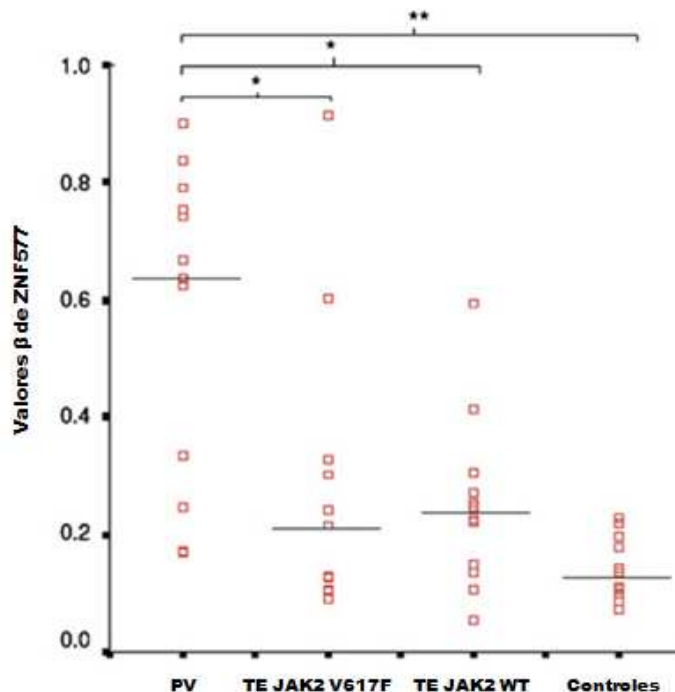
Sin embargo, estas CpGs presentaban una metilación similar en sujetos sanos ( $\beta_{SOCS1}=0,546$ ,  $\beta_{SOCS4}=0,940$ ). Las CpGs situadas en la región promotora del resto de genes SOCS estaban hipometiladas tanto en NMP como en la población control.

La media de valor  $\beta$  para los diferentes genes SOCS y el grado de metilación para los casos de forma individual se muestra en la Tabla 8.

El análisis individual de otros genes relacionados previamente con una metilación diferencial en otros tipos de cáncer, como XAF1, JUNB, CDH13, TET2, CBL y CEBPA tampoco presentó resultados estadísticamente significativos[36, 84, 85].

### 1.3. Hipermetilación del gen ZNF577

El único gen con un perfil de metilación diferencial entre los diferentes grupos analizados fue ZNF577. Este gen presentaba metilación diferencial entre el grupo PV y el grupo de donantes control ( $\Delta\beta= 0.435$ , FDR <0.01,  $p < 0,01$ ) según los criterios marcados para el screening. Además, realizando un estudio individual de los valores  $\beta$  mediante el test no paramétrico de Wilcoxon, el gen ZNF577 también presentaba una metilación diferencial significativa comparando los casos de PV con TE JAK2 V617F ( $p = 0,013$ ) y PV con TE JAK2 WT ( $p = 0,005$ ) como se muestra en la Figura 19.

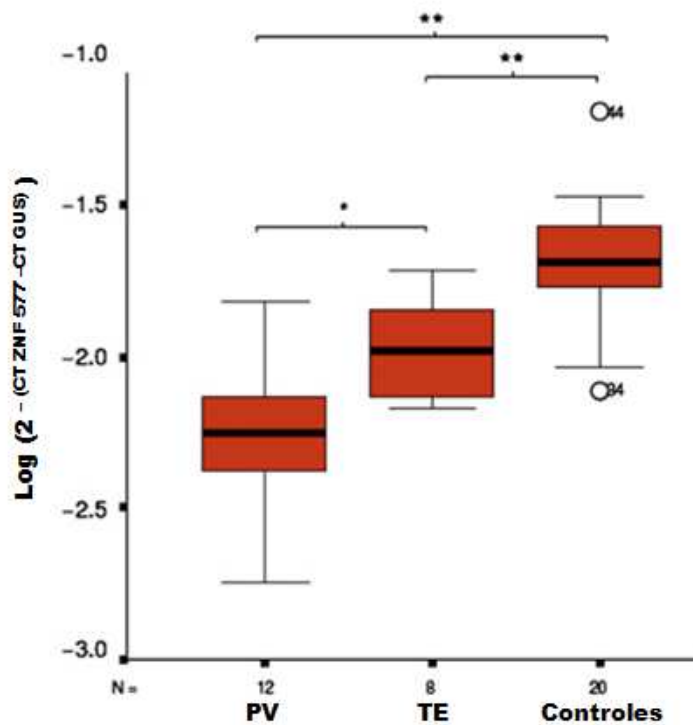


**Figura 19:** Valores de  $\beta$  para ZNF577, en las diferentes poblaciones analizadas. La barra horizontal representa la mediana para cada población. \*Pval<0,05. \*\*Pval<0,01.

La población PV, se dividía en dos subgrupos; uno con un nivel de metilación similar a los casos control y otro mayoritario (8/12 casos) con un valor  $\beta$  superior

a 0,6. Con el fin de justificar la presencia de esta subpoblación no metilada, realizamos diferentes análisis dicotómicos, sin encontrar correlación entre está y las diferentes variables demográficas y clínicas analizadas (edad, sexo, hematocrito, eventos trombóticos, leucocitosis o carga alélica de JAK2).

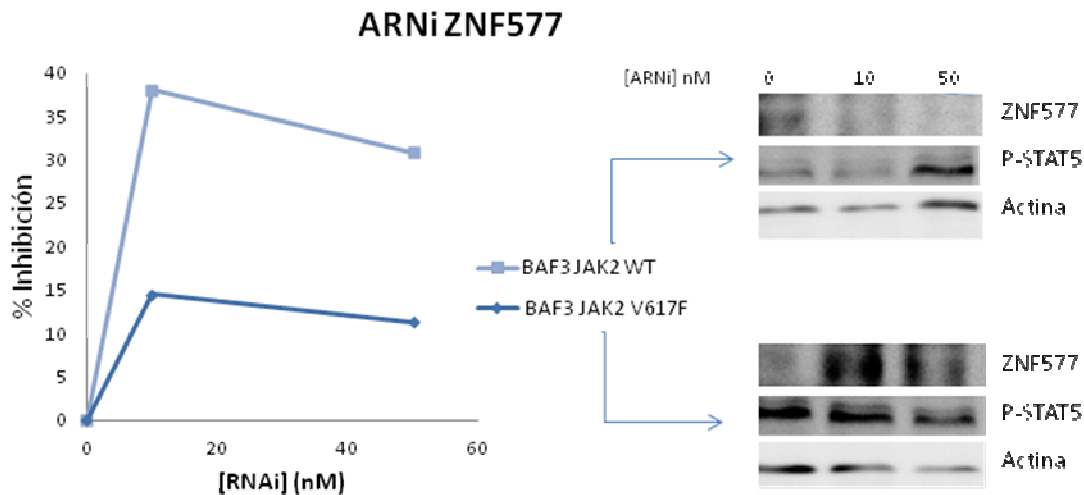
La PCR en tiempo real utilizando sondas taqman contra los transcritos de ZNF577, permitió correlacionar el gradiente de metilación entre las poblaciones de PV, TE y controles con una mayor expresión del gen ZNF577 en los controles en comparación con los casos de NMP ( $p < 0,001$ ). Además, como se muestra en la Figura 20, la expresión de ZNF577 en los casos TE (analizados en conjunto) fue también superior a la que presentaban los casos PV ( $p = 0,007$ ).



**Figura 20: Expresión de ZNF577.** Se representa el logaritmo del ratio de expresión para cada una de las poblaciones analizadas. En la población TE incluyen tanto TE JAK2 V617F negativas como TE JAK2 WT. \* Pval<0,05. \*\*Pval<0,001.

Para estudiar la relación de la expresión de ZNF577 con la fisiopatogenia de las NMP se puso a punto un modelo de inhibición de este gen mediante ARN de interferencia (ARNi). Para ello se utilizaron las líneas BAF3 JAK2V617F y BAF3 JAK2 WT. Como se observa en la Figura 21, la transformación de la línea BAF3 WT fue eficaz, produciendo una disminución de viabilidad celular. Además en western

blot muestra un descenso de la cantidad de ZNF577 proporcional a la cantidad de ARNi. Por el contrario la transformación de la línea BAF3 JAK2 V617F no fue eficaz.



**Figura 21:** Efectos de la transformación de las líneas BAF3 JAK2 V617F y BAF3 JAK2 WT con ARNi ZNF577.

## 2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

### 2.1. Resultados del microarray de expresión

La expresión diferencial entre los grupos de PV, TE y controles, se determinó mediante la plataforma de microarray Whole Human Genome Oligo Microarray Kit de Agilent, capaz de analizar más de 40.000 genes. Esta aproximación permitió definir 84 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa, candidatos para validación mediante RT-PCR y sondas taqman. Los genes fueron seleccionados a partir de diferentes análisis dicotómicos: PV frente TE, PV y TE frente a donantes control y NMP con respuesta a HU frente a casos sin respuesta a HU[55].

Para validar estos resultados se realizó PCR cuantitativa en tiempo real con sondas taqman de estos 84 genes. Además se incluyeron 3 genes control y 12 genes con interés bibliográfico. Los ratios de expresión de los 99 genes seleccionados se analizaron utilizando las diferentes variables clínicas y biológicas presentadas en la **Tabla 5** de la sección anterior.

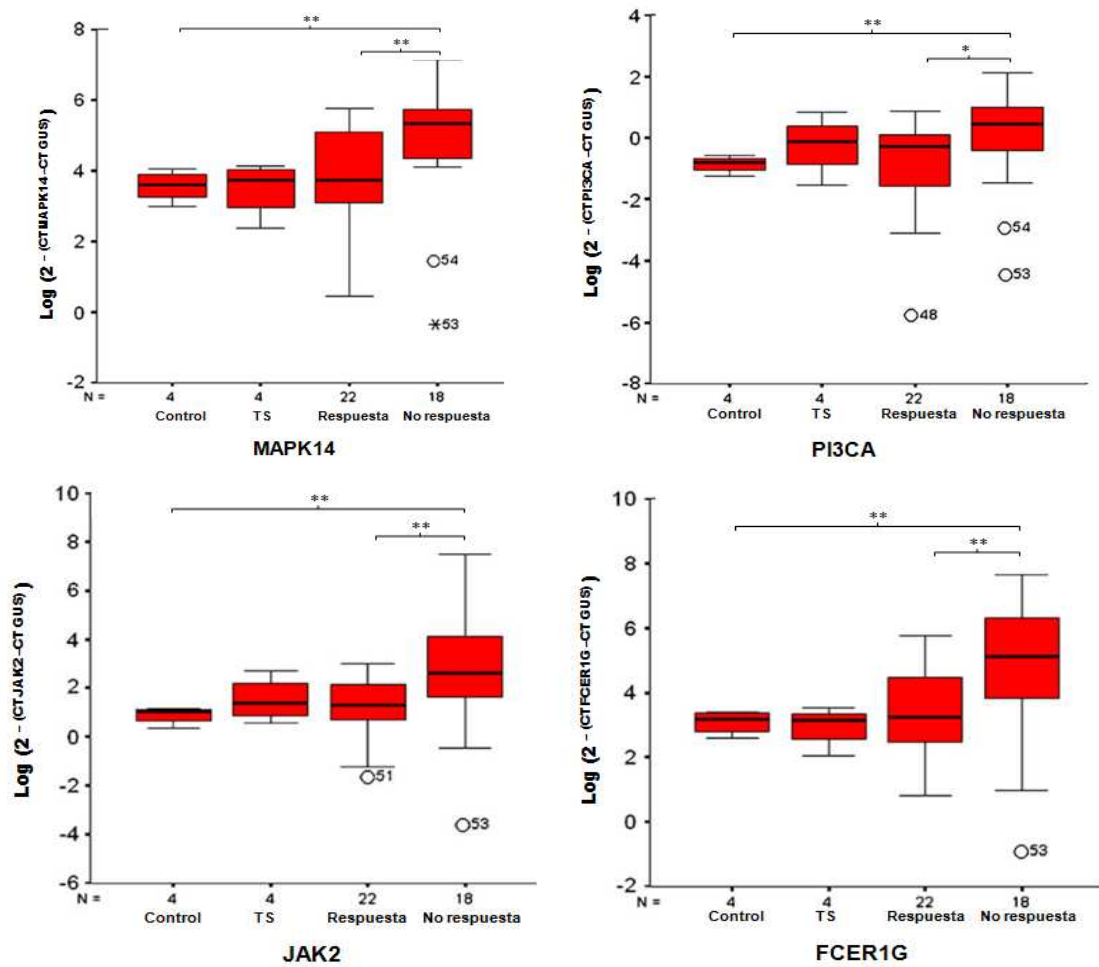
En el análisis de la población tratada con HU se encontraron 36 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa tanto analizando la variable patología (TE vs PV), como la variable respuesta al tratamiento. Para discernir cuál de estas variables clínicas era la responsable de esta divergencia, se realizó el mismo análisis en muestras de pacientes al diagnóstico, encontrando que solo un gen, MMP14 mantenía estas diferencias entre TE y PV. Por lo tanto, la expresión diferencial del resto debía estar relacionada con el tratamiento.

Efectivamente, la expresión diferencial de los 35 genes restantes se correlacionaba con el grado de respuesta al tratamiento con HU, siendo mayor en los pacientes no respondedores. Entre estos genes se encuentran; JAK2, IGF1R, MAPK14, FCRE1G, LYN, BTK, y PIK3CA (Figura 23). Más aun, la expresión de estos genes se reducía a niveles equivalentes a los pacientes con eritrocitosis secundaria y controles sanos. Dicho de otro modo, el perfil de la expresión génica del grupo de control fue similar al de pacientes que respondieron al tratamiento con HU.

Como se muestra en la Tabla 9;, se intentó correlacionar el perfil de expresión con las diferentes variables clínicas y biológicas, analizadas de manera dicotómica. Las variables incluidas fueron, al momento del diagnóstico: género, edad, esplenomegalia, hepatomegalia, hemoglobina, hematocrito, glóbulos blancos, plaquetas, lactato deshidrogenasa, eventos trombóticos, eventos hemorrágicos, y carga alélica de JAK2 V617F. Además se incluyeron las variables de seguimiento: duración de la enfermedad, duración del tratamiento, episodios trombóticos después del diagnóstico, eventos hemorrágicos después del diagnóstico y la respuesta a HU. El patrón de expresión fue similar para todos los genes candidatos.

## **2.2. Cuantificación de la carga alélica de JAK2**

Para analizar si la disminución de la expresión del gen JAK2 en la población respondedora se relaciona con un descenso de la carga alélica de JAK2V617F, se determinó la misma mediante RT-PCR en los pacientes al diagnóstico y tras tratamiento con HU. Se observó que si bien la carga alélica disminuía tanto en PV como en TE bajo tratamiento con HU, esta disminución solo era estadísticamente significativa en TE (Pval = 0,003). Sin embargo el análisis dicotómico entre las poblaciones respondedoras y no respondedoras a HU no presentaba diferencias significativas.



**Figura 23:** Expresión diferencial de los genes: JAK2, MAPK14, PIK3CA y FCER1G en muestras de pacientes NMP en relación al tratamiento con HU. Diagrama de cajas de expresión: Eje y: logaritmo del ratio de expresión. Eje x: Controles sanos (Control), Trombocitosis secundarias (TS), pacientes respondedores (Respuesta), pacientes no respondedores (No respuesta). \* Pval<0,05. \*\*Pval<0,01.

**Tabla 9: Expresión génica diferencial de las neoplasias mieloproliferativas phi negativas analizadas, en función de los diferentes análisis dicotómicos realizados.**

	TE vs PV				TE vs PV (tratadas)				TE vs PV (al diagnóstico)				Tiempo de evol. (meses)				Respuesta				Eventos			
	p-val.	TE	Rafio	PV	p-val.	TE	Rafio	PV	p-val.	TE	Rafio	PV	p-val.	<36	5	15	>36	p-val.	Si	No	Si	No	Si	No
<b>Población</b>																								
ACSL	0.044*	4.072	4.609	0.000*	3.611	5.602	0.598	4.534	3.617	0.770	4.780	4.548	0.017*	4.235	5.060	0.137	4.388							
ANXA1	0.040*	2.282	2.756	0.000*	1.953	3.275	0.975	2.610	2.209	0.794	2.793	2.554	0.020*	2.320	2.973	0.086	1.846							
BTK	0.0032*	0.467	1.636	0.000*	-0.707	1.807	0.729	1.642	1.466	0.331	1.168	0.344	0.016*	0.082	1.121	0.487	0.362							
CASP8	0.003*	2.838	3.459	0.000*	2.210	3.775	1.000	3.466	3.144	0.450	3.430	2.847	0.039*	2.667	3.391	0.010*	2.170							
CD44	0.008*	2.422	3.229	0.000*	1.796	3.961	0.424	3.049	2.497	0.890	3.031	2.827	0.005*	2.348	3.527	0.141	2.139							
CXCL1	0.054	2.359	3.156	0.000*	1.214	3.168	0.940	3.504	3.144	0.770	2.410	2.118	0.014*	1.713	2.775	0.537	2.174							
EDN1	0.218	-1.292	-0.679	0.002*	-1.990	-0.433	0.598	-0.593	-0.926	0.331	-1.464	-1.127	0.009*	-1.818	-0.471	0.069	-1.784							
F2R	0.02*	-2.409	-2.308	0.091	-2.404	-1.632	0.452	-2.414	-3.019	0.102	-1.281	-2.264	0.019*	-2.420	-1.526	0.183	-3.034							
FCER1G	0.0021*	3.511	4.682	0.000*	2.484	5.415	0.497	4.527	3.950	0.488	4.387	3.810	0.004*	3.295	4.760	0.874	3.789							
FRMD4B	0.001*	1.148	2.579	0.000*	0.104	2.931	0.845	2.191	2.228	0.432	2.069	1.334	0.001*	0.735	2.473	0.624	1.414							
GAPDH	0.011*	2.464	3.167	0.000*	1.719	4.164	0.577	3.208	2.170	0.469	3.301	2.822	0.037*	2.520	3.457	0.402	2.240							
GSK3B	0.094	1.550	2.191	0.000*	0.567	2.650	0.220	2.593	1.733	0.678	1.925	1.502	0.024*	1.176	2.137	0.716	1.789							
HMBG2	0.014*	3.188	3.932	0.000*	2.185	4.375	0.869	4.190	3.089	0.469	3.748	3.124	0.014*	2.754	3.924	0.950	3.259							
IGF1R	0.052	2.417	2.703	0.000*	1.715	3.538	0.798	3.120	1.867	0.488	3.048	2.486	0.026*	2.259	3.076	0.937	2.522							
IKZF1	0.022*	1.102	2.187	0.000*	0.503	2.190	0.752	1.700	2.184	1.000	1.540	1.282	0.024*	0.970	1.807	0.800	1.402							
ITGAM	0.065	2.718	3.384	0.000*	1.905	3.912	0.283	3.532	2.857	0.396	3.265	2.789	0.004*	2.400	3.530	0.217	2.387							
JAK2	0.002*	1.527	2.862	0.000*	0.444	2.995	0.892	2.611	2.729	0.866	1.882	1.665	0.008*	1.096	2.482	0.125	1.115							
LITAF	0.002*	4.366	5.142	0.000*	4.146	6.122	0.497	4.586	4.161	0.866	5.250	5.095	0.016*	4.693	5.673	0.011*	3.731							
LRMP	0.007*	2.496	3.532	0.000*	1.568	3.740	0.752	3.434	3.324	0.818	2.845	2.584	0.001*	2.134	3.280	0.327	2.149							
LYN	0.002*	4.535	5.686	0.000*	0.648	1.931	0.616	5.321	5.450	0.770	5.053	4.755	0.017*	4.386	5.372	0.553	4.617							
MAP2K1	0.053	1.070	1.683	0.001*	3.200	5.414	0.598	1.493	1.435	0.528	1.579	1.193	0.045*	0.972	1.677	0.740	1.235							
MAPK14	0.006*	3.606	4.314	0.000*	3.200	5.414	0.460	4.012	3.215	0.508	4.736	4.164	0.007*	3.834	4.885	0.385	3.530							
MMP14	0.000*	-4.422	-2.794	0.001*	-4.430	-2.759	0.003*	-4.414	-2.829	0.634	-3.518	-3.620	0.106	-3.995	-3.105	0.060	-4.517							
PECAM1	0.021	2.641	3.562	0.000*	1.676	3.782	0.869	3.505	3.342	1.000	2.847	2.690	0.030*	2.414	3.114	0.825	2.803							
PIK3CA	0.015*	-0.490	0.217	0.000*	-1.424	0.434	0.752	0.445	0.000	0.678	-0.448	-0.511	0.020*	-0.881	-0.024	0.018*	-1.167							
PLA2G4A	0.082	-1.904	-1.446	0.002*	-2.609	-1.301	0.798	-1.199	-1.590	0.639	-1.990	-1.943	0.022*	-2.289	-1.547	0.248	-2.338							
RAFI	0.005*	2.039	2.954	0.000*	1.352	3.082	0.845	2.726	2.826	0.794	2.352	2.172	0.003*	1.811	2.713	0.740	2.086							
SI00A4	0.059	3.779	4.334	0.000*	3.072	4.845	0.478	4.486	3.823	0.988	4.093	3.914	0.037*	3.679	4.301	0.268	3.378							
SEC31B	0.114	-0.260	0.194	0.002*	-0.463	0.750	0.346	-0.058	-0.391	0.315	-0.227	0.267	0.026*	-0.184	0.544	0.001*	-1.434							
SELL	0.005*	3.681	4.566	0.000*	2.765	5.148	0.892	4.596	4.184	0.450	4.326	3.834	0.014*	3.527	4.482	0.289	3.410							
SELP	0.010*	-1.000	0.040	0.002*	-1.635	0.166	0.641	-0.365	-0.086	0.678	-0.504	-0.811	0.019*	-1.067	-0.327	0.179	-1.601							
SKAP2	0.008*	2.230	3.254	0.000*	1.330	3.675	0.845	3.131	2.832	0.469	2.925	2.362	0.013*	2.053	3.052	0.716	2.293							
SPON1	0.469	-5.401	-5.314	0.030*	-5.398	-4.389	0.459	-5.403	-6.239	0.331	-5.184	-4.797	0.027*	-5.269	-4.435	0.498	-5.586							
TAP1	0.072	2.677	3.522	0.000*	2.441	3.923	0.684	2.913	3.121	0.914	3.466	3.087	0.042*	2.921	3.500	0.681	2.854							
YWHAH	0.025*	1.650	2.436	0.000*	1.188	2.937	0.660	2.137	1.880	0.301	2.485	1.921	0.034*	1.672	2.538	0.585	1.605							

### **3. GELES 2D DIGE Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

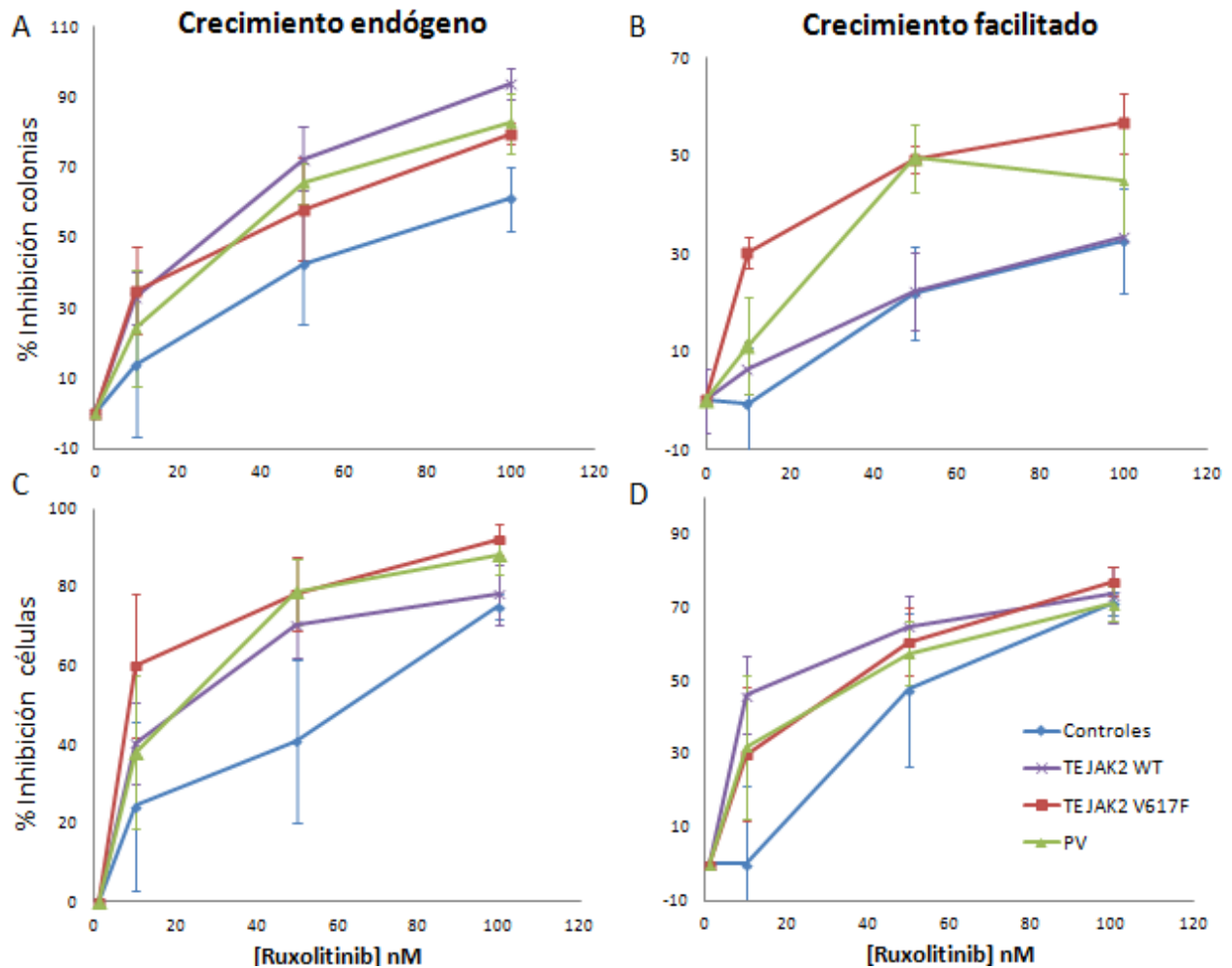
Los geles 2D de las poblaciones de PV y TE JAK2 V617F mostraron 82 proteínas diferencialmente expresada de un total de 3419 analizadas. La espectrometría de masas de estos spots diferencialmente expresados permitió identificar 50 proteínas, la mayoría de ellas correspondientes a enzimas involucradas en procesos metabólicos y bioquímicos de la célula. Sin embargo, algunas de estas proteínas se encuadraban en vías hematológicas, de activación leucocitaria o de diferenciación eritroide, como es el caso de la proteína HSP70 [80].

### **4. ANÁLISIS FUNCIONALES**

Las aproximaciones de cribado génico y proteómico antes descritas, nos permitieron seleccionar un grupo de genes candidatos para analizar mediante inhibidores específicos en los modelos celulares descritos en la sección de material y métodos. Estos compuestos fueron: Ruxolitinib como inhibidor de JAK2. Sorafenib como inhibidor de la vía MAP quinasa. El inhibidor de chaperonas KNK437 contra la diana HSP70. Perifosine para bloquear la vía PI3K/AKT y por ultimo Dasatinib como inhibidor de las proteínas de la familia SRC.

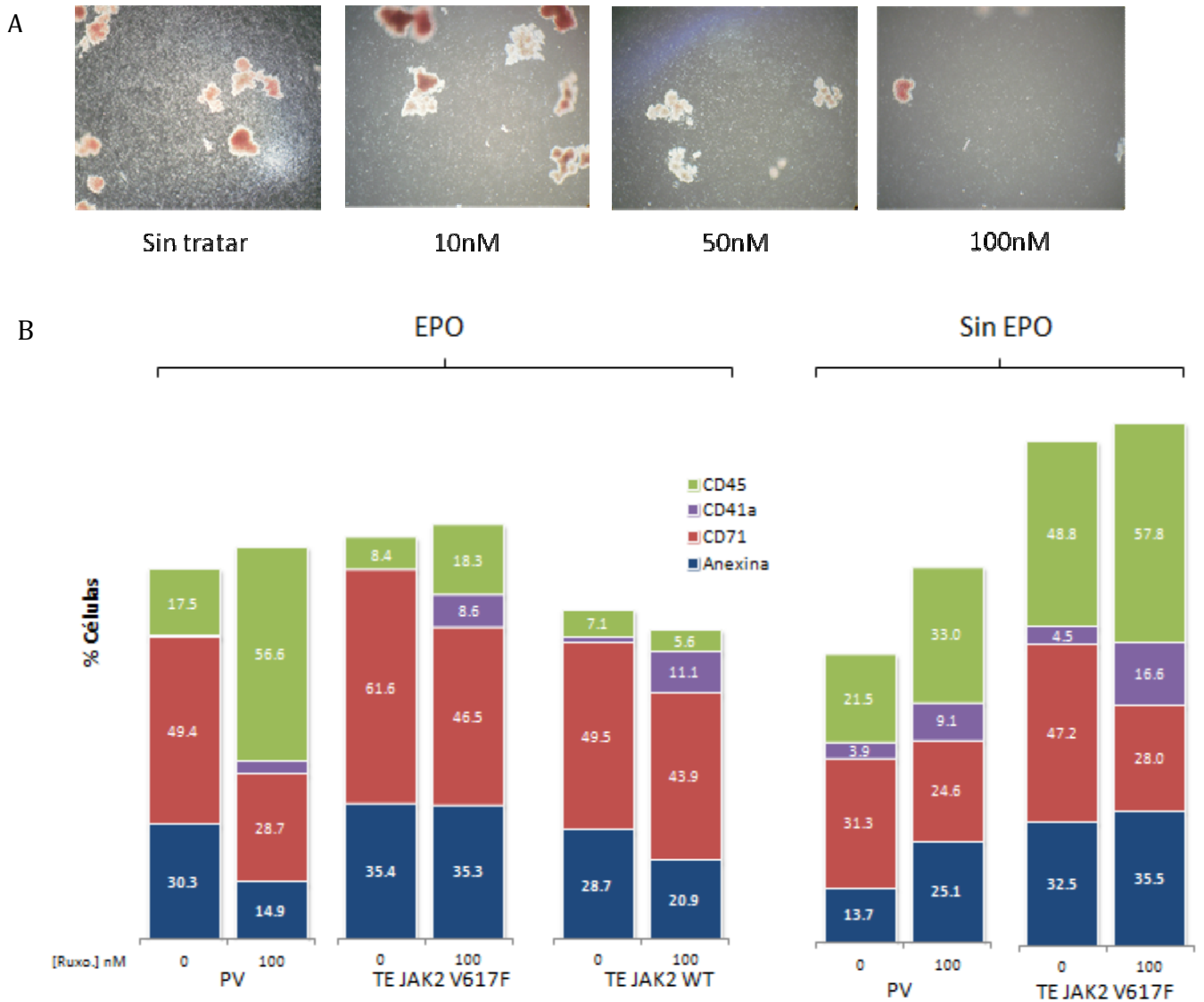
#### **4.1. Ruxolitinib**

El Ruxolitinib en el modelo celular basado en el cultivo de células mononucleadas de pacientes NMP en metilcelulosa, mostró un IC50 en cultivos facilitados con EPO de 30 nM en NMP JAK2 V617F y de 12nM en TE JAK2 WT. En cultivos en crecimiento endógeno, los casos de PV mostraron un IC50 medio de 30nM, los de TE JAK2 V617F de 6nM y los de TE JAK2 WT de 15nM. Los efectos de este fármaco sobre la población control fueron menores siendo el IC50 de 56nM en cultivos facilitado con EPO y de 47nM en crecimiento endógeno (Figura 24).



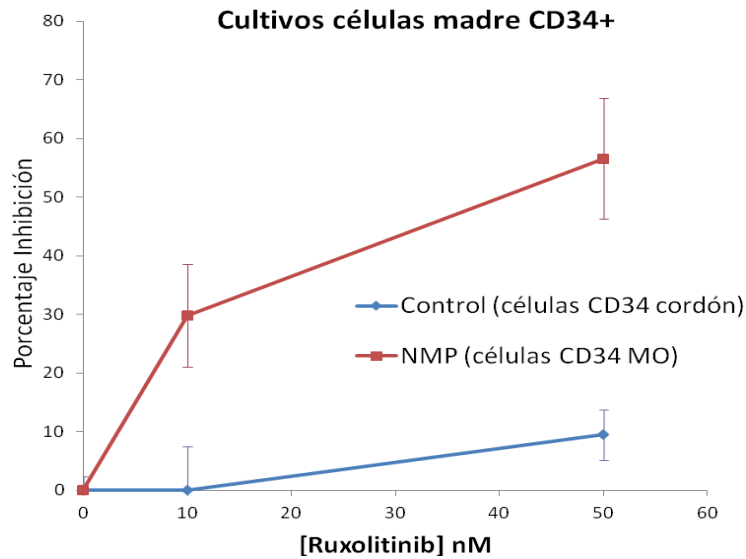
**Figura 24:** Acción del Ruxolitinib sobre los cultivos de células mononucleadas. (A y B, conteo de colonias. C y D viabilidad celular).

A nivel fenotípico, el Ruxolitinib disminuía el número de colonias eritroides, pero se mantenía el tamaño de las que conseguían desarrollarse. (Figura 25 A). Mediante inmunofenotipado por citometría de flujo comprobamos además que esta disminución es específica de células eritroides y megacariocíticas, manteniéndose la población panleucocitaria (Figura 25 B). Por otro lado comprobamos que solo se produce un aumento de las células apoptóticas en presencia de Ruxolitinib en los casos de PV cultivados en crecimiento endógeno.



**Figura 25:** A. Efectos del Ruxolitinib en el desarrollo de colonias eritroides. B. Inmunofenotipado de los efectos del Ruxolitinib en cultivos de colonias eritroides facilitados con EPO (izquierda) o en crecimiento endógeno (derecha). Para cada anticuerpo se representa la media de los valores de % de células marcadas. Esta media está calculada para al menos tres pacientes de cada grupo.

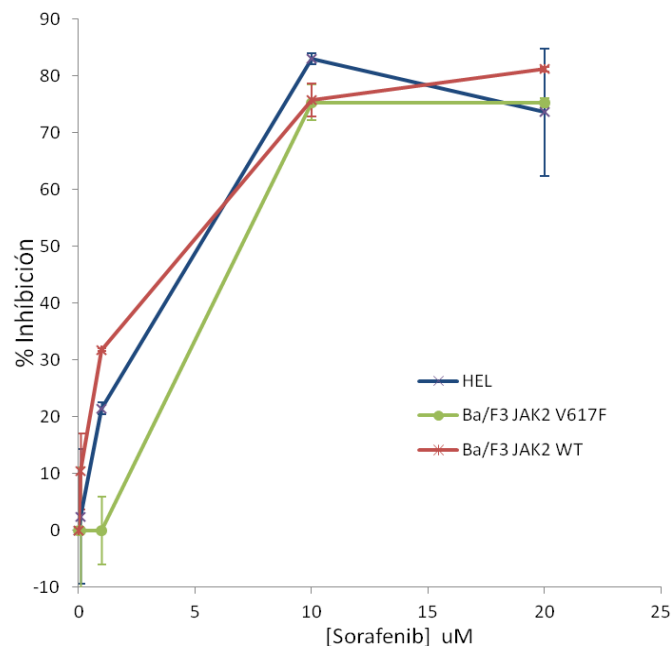
Por último, se realizó una aproximación similar a los cultivos de colonias eritroides, pero utilizando células CD34 provenientes de aspirados de médula ósea de 4 pacientes diagnosticados con NMP. Como población control se utilizaron células CD34 de muestras de cordón umbilical (Figura 26). Sobre este modelo de células madre patológicas, el Ruxolitinib presentó un IC50 de 50nM, mientras que sobre las células madre control el Ruxolitinib no mostró apenas efecto.



**Figura 26:** Acción del Ruxolitinib en células CD34

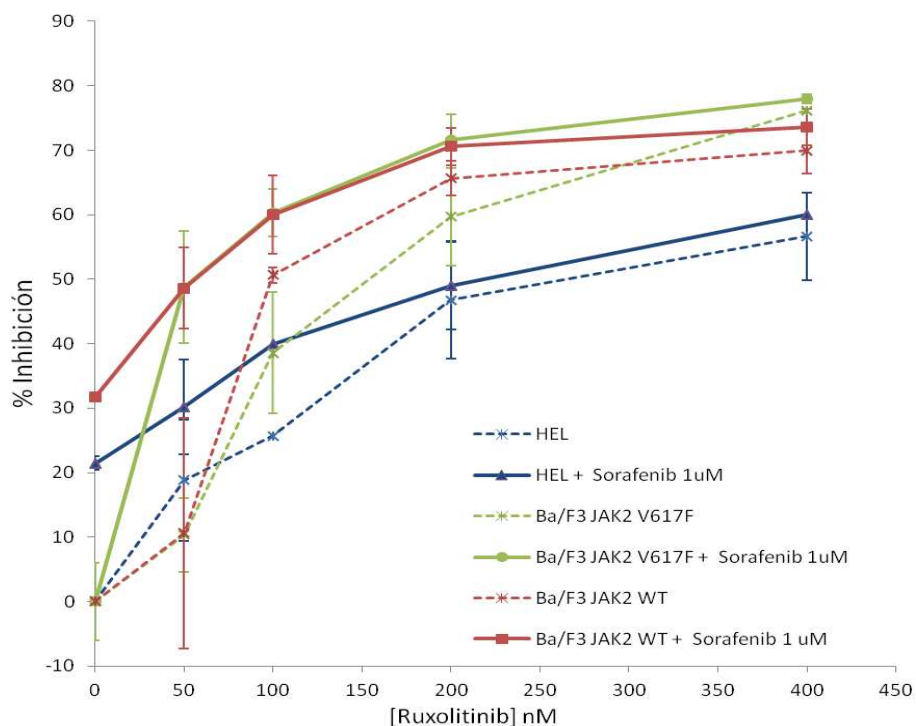
## 4.2. Sorafenib

Para analizar los efectos del Sorafenib sobre los diferentes modelos celulares, primero se determinaron las dosis efectivas de este fármaco en cultivos secundarios. En esta aproximación, el Sorafenib presentó un IC50 de aproximadamente 5uM tanto para las líneas JAK2 V617F como para la línea BAF3 transformada con JAK2 WT (Figura 27).



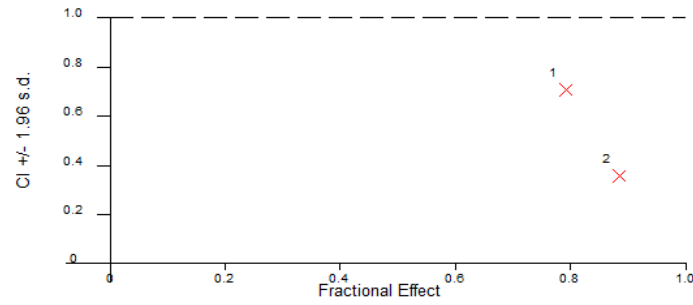
**Figura 27:** Efectos del Sorafenib sobre las líneas celulares estudiadas.

A continuación se analizaron los posibles efectos sinérgicos de Sorafenib con Ruxolitinib. Como se muestra en la Figura 28 (líneas punteadas), el cultivo de las diferentes líneas celulares en presencia de Ruxolitinib, permitió definir un IC50 de 274nM para HEL, 158nM para BAF3 V617F y 137nM para BAF3 JAK2 WT (Tabla 10). Por el contrario, en el cultivo de estas líneas, a las mismas concentraciones de Ruxolitinib, pero con una concentración constante de Sorafenib de 1uM, la dosis efectiva de Ruxolitinib fue de 3 a 5 veces menor en las líneas BAF3 transformadas con JAK2, siendo estos efectos mucho más limitados en la línea HEL.



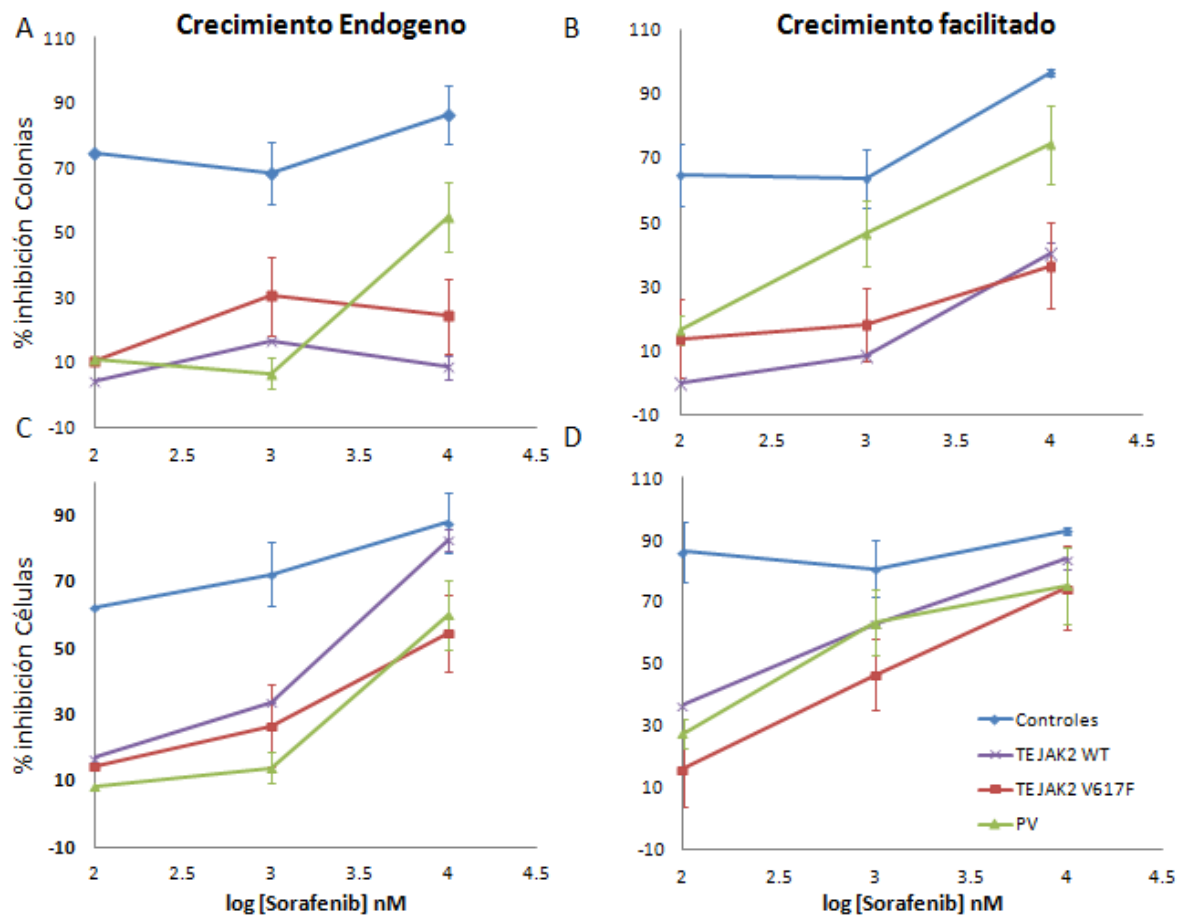
**Figura 28:** Efectos sinérgicos del Ruxolitinib y Sorafenib en las líneas celulares.

El punto cero de las líneas continuas en la Figura 28 representa los efectos del Sorafenib 1uM sin Ruxolitinib. Como se puede observar, a esta concentración el Sorafenib puede disminuir la viabilidad celular hasta en un 30%. Para discernir si los efectos combinados de los dos fármacos eran aditivos o realmente sinérgicos, se analizaron los datos de inhibición mediante el modelo de Chow-Talalay, observándose que la acción combinada de ambos fármacos producía un efecto sinérgico moderado en las líneas BAF3 JAK2 V617F y BAF3 JAK2 WT con unos coeficientes sinérgicos, (CI) de 0,60 y 0,43 respectivamente, a una concentración de Ruxolitinib de 50nM (Figura 29).



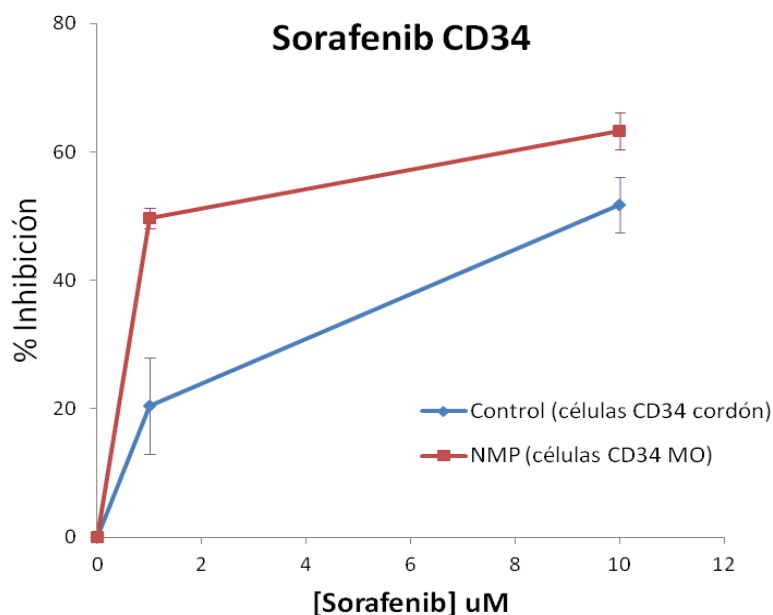
**Figura 29:** Representación de los coeficientes de sinérgicos del Sorafenib y Ruxolitinib. (CI<1; efecto sinérgico)

Para validar estos resultados en un modelo más próximo a la enfermedad, se analizaron los efectos del Sorafenib sobre modelos primarios de células mononucleadas (Figura 30) y CD34 positivas (Figura 31) de pacientes diagnosticados con NMP. Estos efectos eran similares a los encontrados en las líneas celulares, observándose un IC50 de aproximadamente 1uM en ambos modelos.



**Figura 30:** Acción del Sorafenib sobre los cultivos de células mononucleadas. (A y B, conteo de colonias. C y D viabilidad celular).

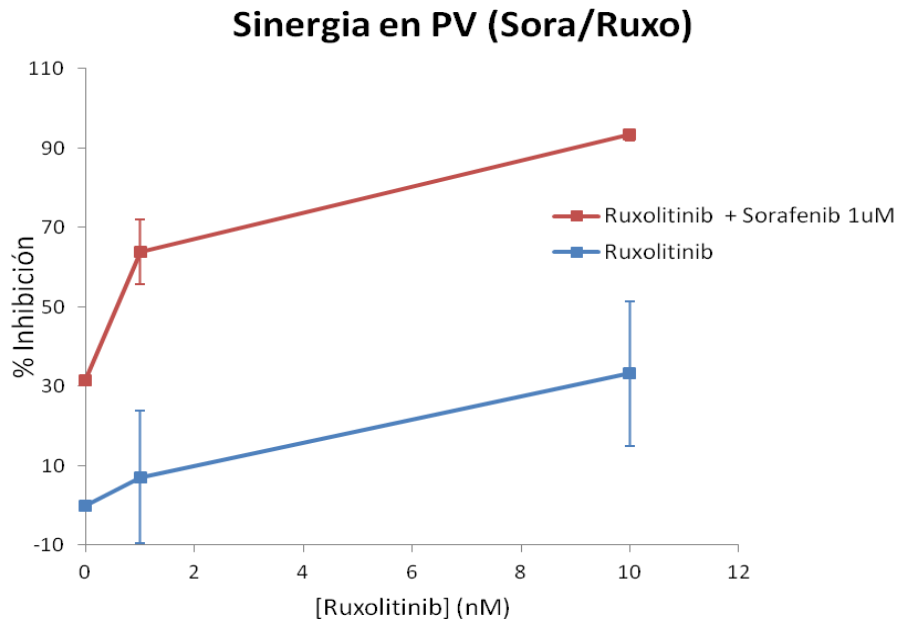
En estos mismos modelos se observa un cambio en el comportamiento de las células procedentes de donantes control no enfermos. Por un lado el Sorafenib resulto ser más eficaz en cultivos de células mononucleadas de donantes que en células de pacientes, con un IC50 menor a 0,1uM en algunos casos (Figura 30). Por el contrario, el Sorafenib fue menos eficaz en células CD34 positivas de donantes (IC50>10uM) que en células CD34 positivas procedentes de aspirados de médula ósea de pacientes NMP (Figura 31).



**Figura 31: Efecto del Sorafenib en células madre CD34 positivas.** Células extraídas de médula ósea de pacientes NMP (rojo) o de cordón umbilical de donantes no enfermos

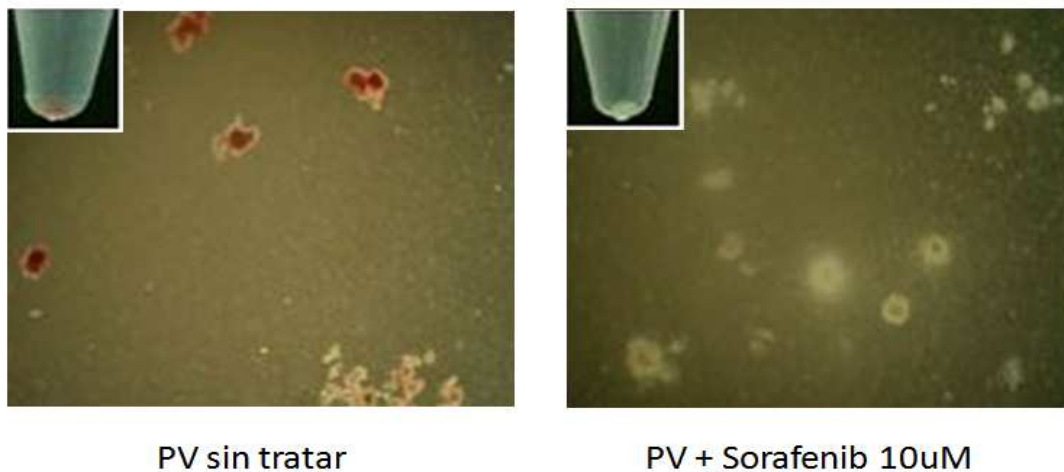
Por último, se verificó que los efectos sinérgicos entre el Sorafenib y el Ruxolitinib se mantenían en cultivos de células mononucleadas de pacientes con PV, lo que nos permitió validar los resultados previos obtenidos en líneas celulares. Se obtuvo una reducción del IC50 de 60nM para el Ruxolitinib solo, a menos de 1nM para el Ruxolitinib en presencia de una concentración constante de 1uM de Sorafenib (Figura 32). Los CI de

esta combinación de fármacos fueron de 0,083 para una concentración de Ruxolitinib de 1nM y de 0,052 para 10nM.



**Figura 32:** Efectos sinérgicos del Sorafenib y el Ruxolitinib en células mononucleadas procedentes de 3 casos de PV.

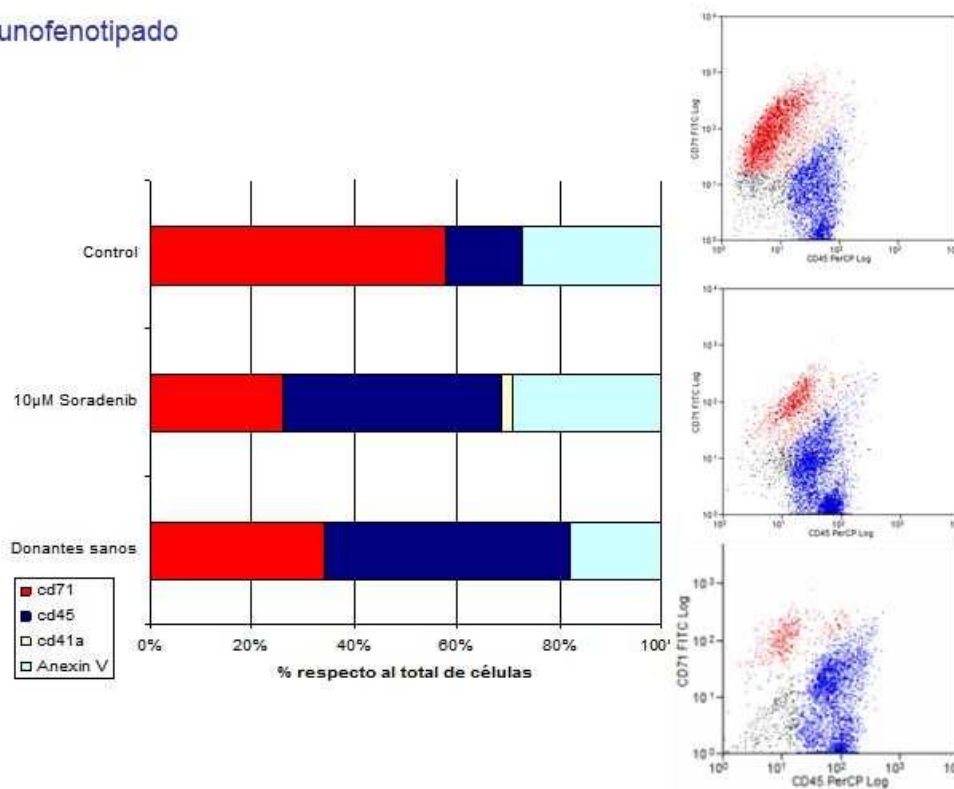
A nivel fenotípico, los cultivos de colonias tratados con Sorafenib presentaban una clara disminución del número de colonias eritroides, manteniéndose o incluso aumentando el número de colonias blancas no hemoglobinizadas (Figura 33).



**Figura 33:** Esquina superior derecha: Pellet celular tras la centrifugación de los cultivos de una muestra de PV sin tratar y tras el tratamiento con 10uM de Sorafenib. Fotografía de microscopía confocal, en la que se muestran los efectos del Sorafenib a 10nM sobre los cultivos de colonias (crecimiento facilitado) sobre la misma muestra.

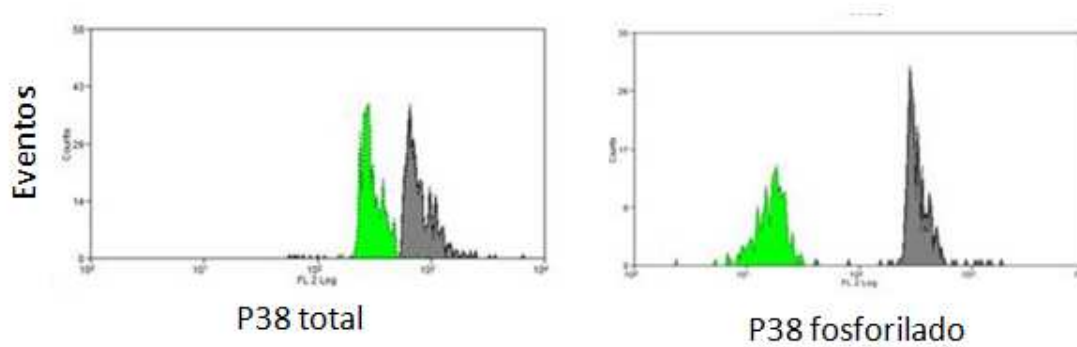
Con el fin de delimitar a nivel molecular este cambio poblacional, se realizó un Inmunofenotipado por citometría de flujo, observándose un aumento de las poblaciones panleucocitaria (CD45) y megacariocítica (CD41a) y una disminución de la línea eritroide (CD71) a una concentración de 10uM de Sorafenib (Figura 34). Este perfil era similar a los cultivos de donantes no enfermos sin tratar con Sorafenib.

### Inmunofenotipado



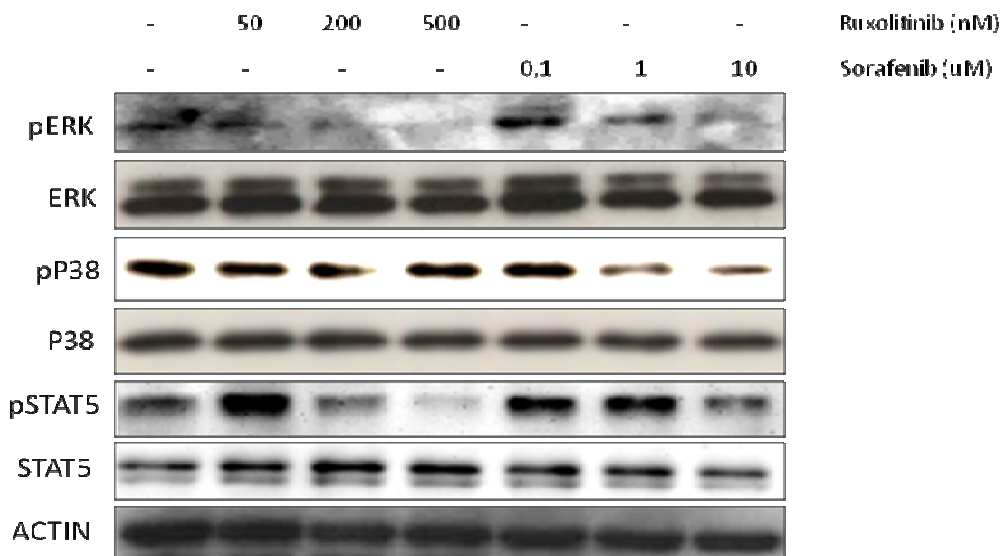
**Figura 34:** Inmunofenotipado de los efectos del Sorafenib en cultivos de colonias eritroides. Izquierda. Dotplot de CD71 (rojo) frente a CD45 (azul) de un caso de PV, el mismo caso tratado con 10uM de Sorafenib y un donante control.

El análisis de los niveles de activación de las principales vías proliferativas mediante la aproximación de CBAs mostró que el Sorafenib, además de inhibir la vía MAPK canónica a nivel de RAF1 (produciendo una disminución de la activación de ERK), bloqueaba la activación de P38 como se observa en la Figura 35.



**Figura 35:** Resultados del análisis por CBAs de los cultivos de colonias eritroides tratadas con Sorafenib. A la izquierda se muestra la cantidad de la proteína P38 y a la derecha de la misma proteína fosforilada. En Gris se representa los valores para el cultivo sin tratar y en verde para el cultivo tratado con 10uM de Sorafenib.

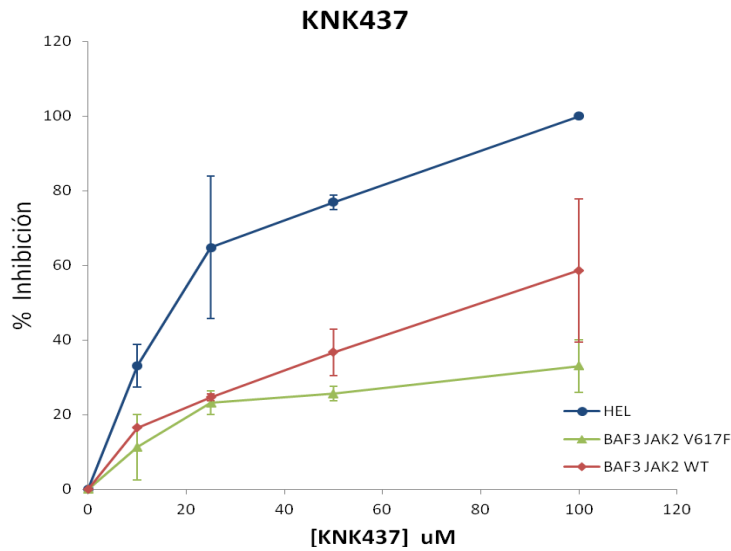
Para confirmar esta inactivación de P38 se realizó un western blot de proteínas extraídas de la línea HEL tras el tratamiento con Ruxolitinib y Sorafenib (Figura 36). Esto permitió confirmar que mientras que el Ruxolitinib bloquea la vía MAPK canónica sin afectar la vía alternativa P38, el Sorafenib, además de la activación de ERK, disminuye la activación de p38.



**Figura 36:** Western blot de las proteínas de la línea HEL tratadas con diferentes concentraciones de Ruxolitinib y Sorafenib

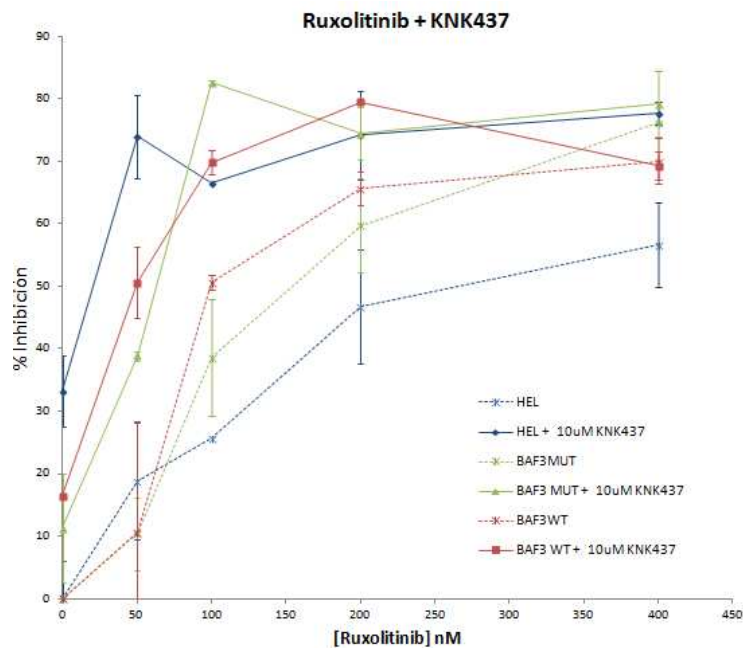
### 4.3. KNK 437

La inhibición de las diferentes líneas celulares con KNK437 mostró un IC50 de 79 y 300uM en las líneas BAF3 murinas (JAK2 WT y JAK2 V617F, respectivamente) pero solo de 17uM para la línea JAK2 V617F HEL (Figura 37).



**Figura 37:** Efectos del KNK437 sobre las líneas celulares estudiadas.

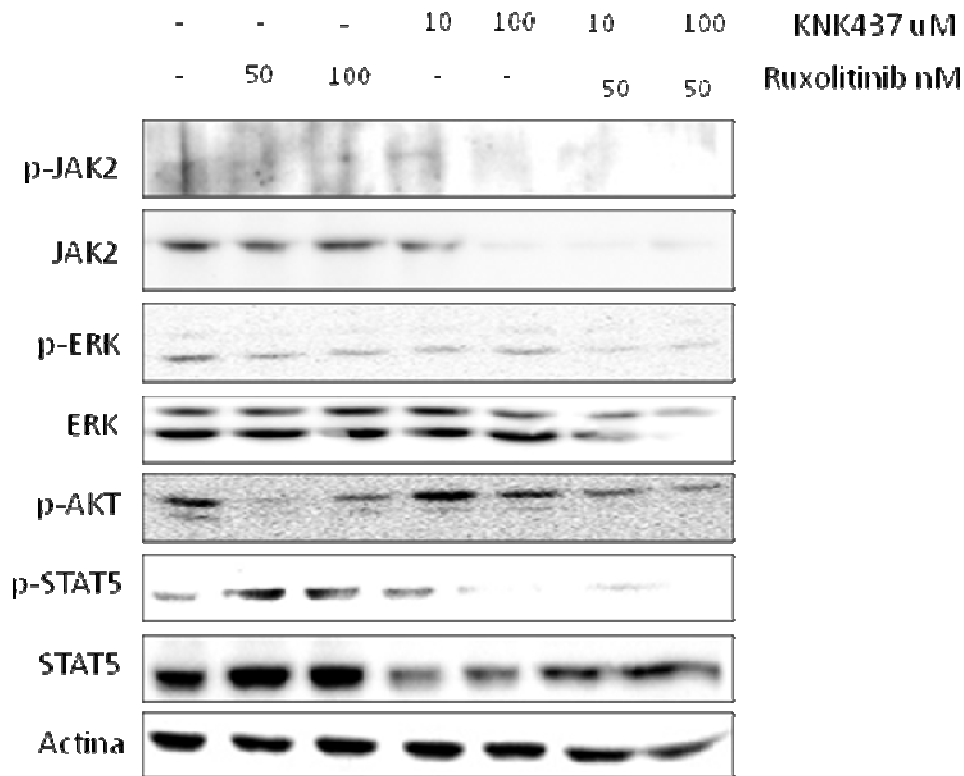
De forma similar a la aproximación realizada con Sorafenib y Ruxolitinib, se estudió el posible efecto sinérgico de este compuesto a una concentración constante de KNK437 de 10uM con Ruxolitinib, encontrándose un IC50 de 50nM para BAF3 JAK2 WT y BAF3 JAK2 V617F pero solo de 25nM para la línea HEL (Figura 38).



**Figura 38:** Efectos sinérgicos del Ruxolitinib y KNK437 en las líneas celulares

A nivel molecular, el KNK437 disminuye no solo la activación de JAK2 sino su expresión, como podemos apreciar en la

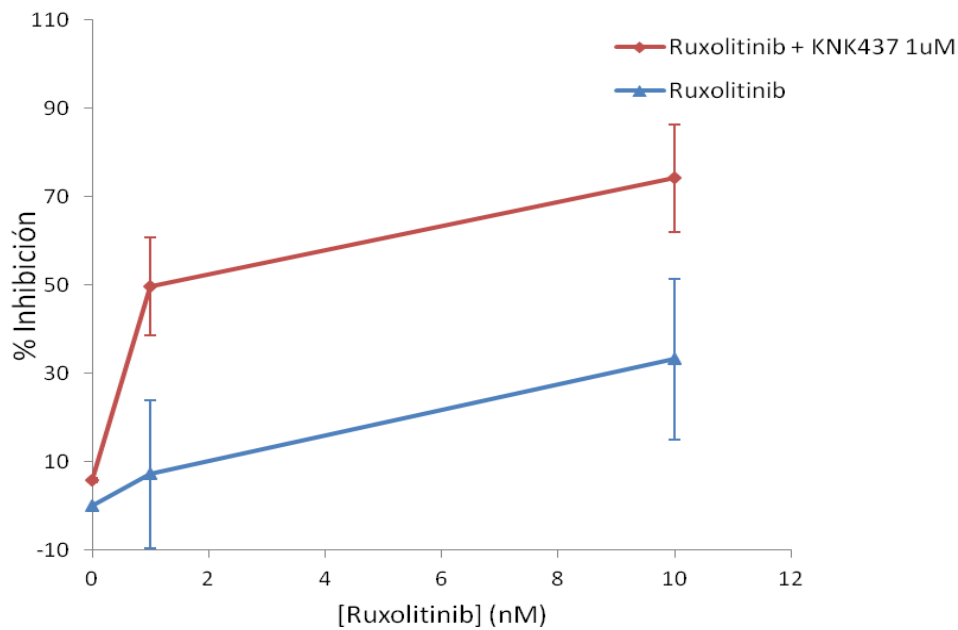
Figura 39. Esta disminución de la expresión provoca una bajada en la activación de las principales vías proliferativas. Estos efectos son mucho más intensos en combinación con Ruxolitinib.



**Figura 39:** Análisis de los efectos del KNK437, solo o con Ruxolitinib en cultivos de la línea celular BA/F3

El valor del coeficiente sinérgico de esta combinación de fármacos se muestra en la (Tabla 10). EL IC50 de KNK437 en células de pacientes es de 25uM en cultivos de colonias eritroides y de 30uM en cultivo de células madre hematopoyéticas (véase tesis doctoral Dr Miguel Gallardo). El análisis de los efectos sinérgicos entre ambos fármacos en células mononucleadas de pacientes con PV mostró una reducción del IC50 de 60nM para Ruxolitinib, a menos de 1nM para el Ruxolitinib en presencia de una concentración constante de 1uM de KNK437 (Figura 40).

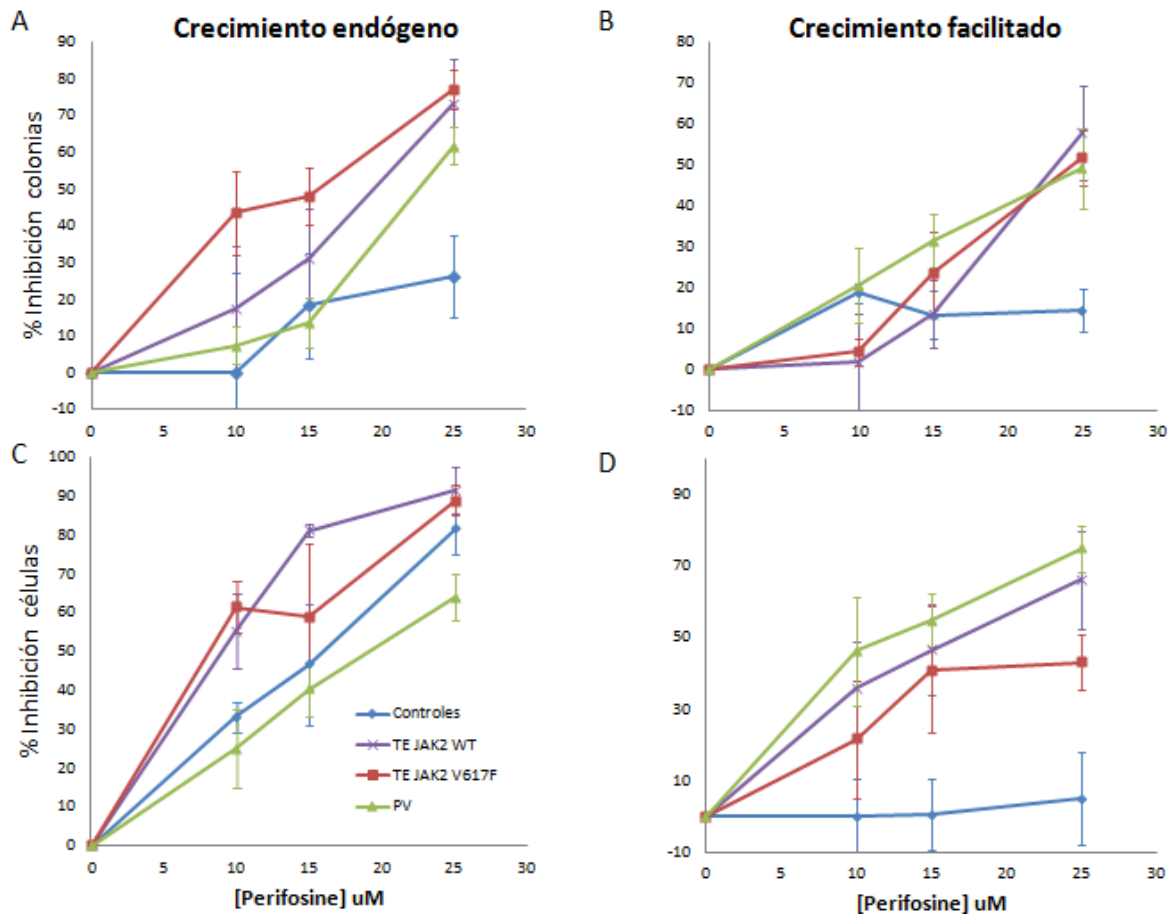
### Sinergia en PV (KNK437/Ruxo)



**Figura 40:** Efectos sinérgicos del KNK437 y el Ruxolitinib en células mononucleadas procedentes de 3 casos de PV.

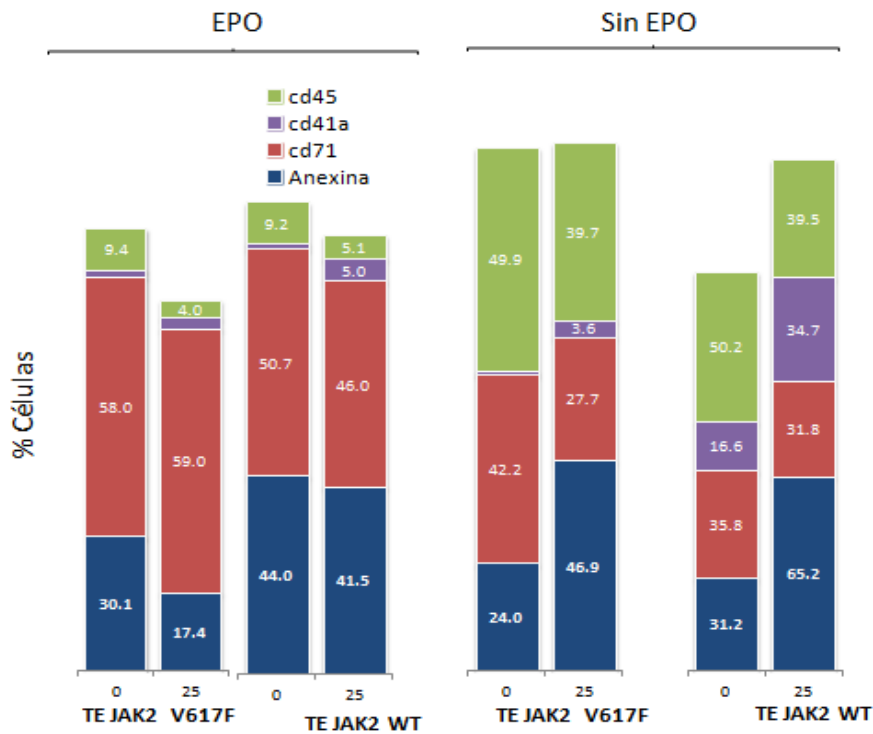
#### 4.4. Perifosine

El inhibidor de AKT Perifosine, fue eficaz tanto en la reducción del número de colonias como en la inhibición de la proliferación celular de cultivos de células mononucleadas de pacientes diagnosticados con PV, TE JAK2 V617F y TE JAK2 WT, con un IC50 promedio entre 10 y 20 uM (Figura 41). En cultivos de controles no enfermos, esta reducción solo era patente en presencia de Eritropoyetina, no teniendo efectos sobre las células no eritroides encontradas en el cultivo endógeno de donantes (Figura 41, D).



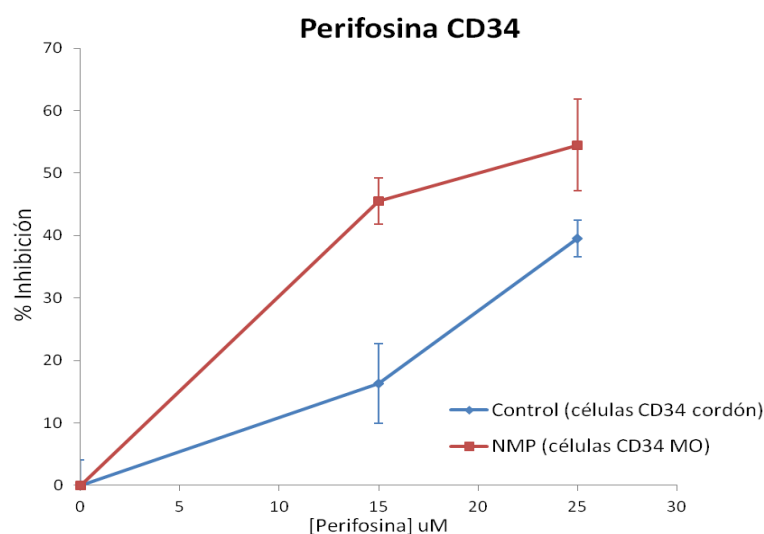
**Figura 41:** Acción del Perifosine sobre los cultivos de células mononucleadas. (A y B, conteo de colonias. C y D viabilidad celular).

Sobre las células procedentes de estos mismos cultivos, se realizó inmunofenotipado por citometría de flujo (Figura 42), observándose una relación entre la presencia de EPO, los efectos proapoptóticos del Perifosine y la disminución de la población eritroide. El Perifosine disminuye la población eritroide respecto al resto de líneas, y aumenta la apoptosis en cultivos sin EPO. Además, la falta de EPO, aumenta el desarrollo de células panleucocitarias y Megacariocíticas en TE, siendo este aumento mucho más notable en los cultivos procedentes de casos TE JAK2 WT.



**Figura 42:** Inmunofenotipado de los efectos de Perifosine en cultivos de colonias eritroides, facilitados con EPO (izquierda) o en crecimiento endógeno (derecha). Para cada anticuerpo; se representa la media de los valores de % de células marcadas. Esta media está calculada para al menos tres pacientes de cada grupo.

El Perifosine también redujo la viabilidad de células madre hematopoyéticas CD34 positivas, con un IC50 de 15nM (Figura 43), siendo este efecto mucho menor en células CD34 positivas procedentes de donantes de cordón no enfermos.

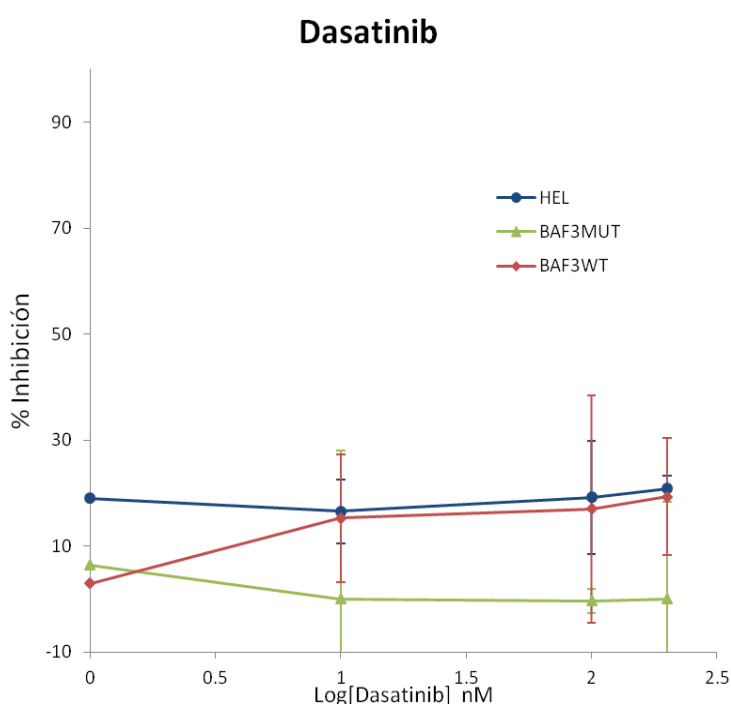


**Figura 43:** Efecto del Perifosine en células madre CD34 positivas. Células extraídas de médula ósea de pacientes NMP (rojo) o de cordón umbilical de donantes no enfermos (azul).

Los estudios de sinergias con Perifosine y Ruxolitinib no han mostrado resultados concluyentes en líneas celulares, que justifiquen su estudio en modelos de células provenientes de pacientes NMP.

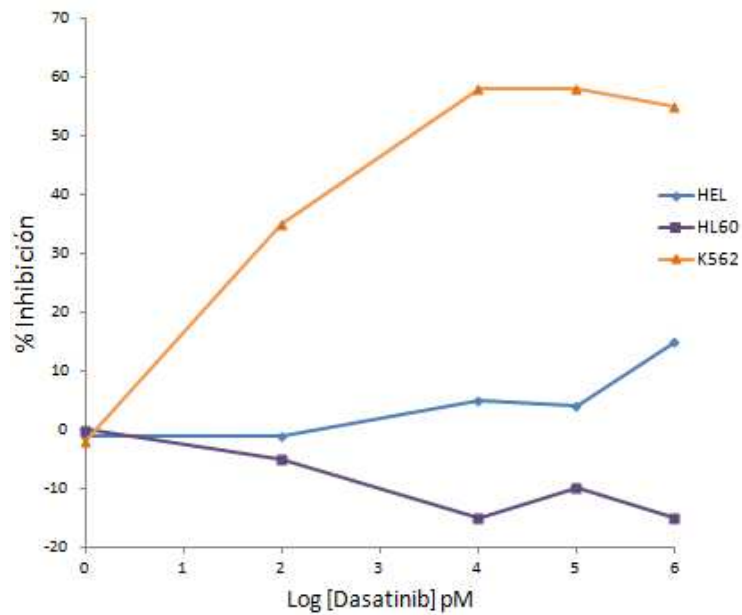
#### 4.5. Dasatinib

Por último se analizó la capacidad del Tosilato de Dasatinib para inhibir la proliferación de los diferentes modelos celulares. El Dasatinib no mostró efectividad alguna en los modelos de líneas celulares, como se observa en la Figura 44.



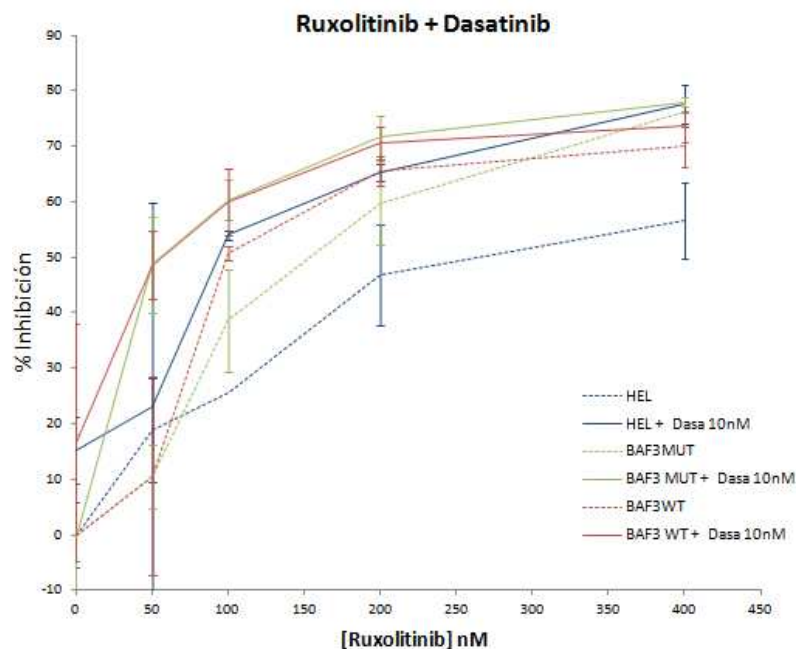
**Figura 44:** Efectos del Dasatinib sobre las líneas celulares estudiadas.

Para determinar si esta falta de eficacia era debida a que realmente el Dasatinib no producía ningún efecto biológico en estos modelos, analizamos los efectos del mismo sobre un modelo celular en el que sí que están descritos sus efectos: la línea celular K562, proveniente de un paciente con LMC. Como se observa en la Figura 45, Dasatinib si inhibe el crecimiento de la línea LMC BCR-ABL positiva K562, sin afectar al modelo HEL JAK2 V617F ni al modelo de LMA HL60.



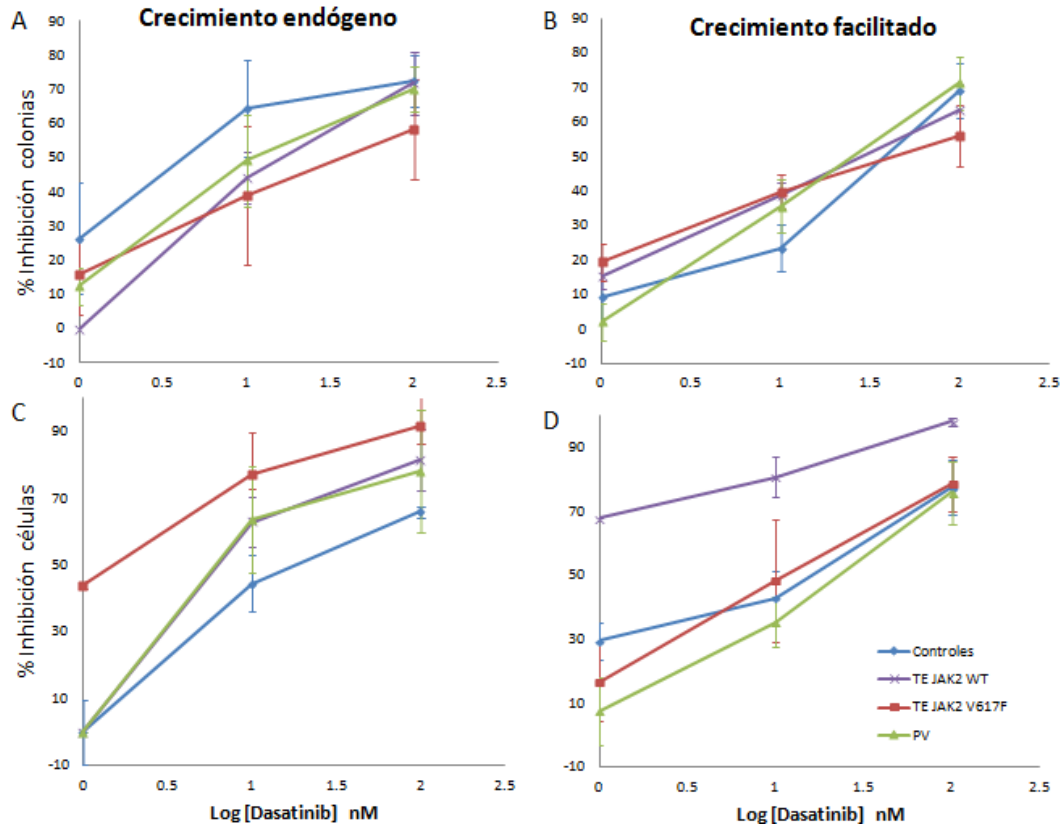
**Figura 45:** Efectos del Dasatinib sobre los modelos secundarios HEL (eritroleucemia JAK2 V617F), HL60 (LMA) y K562 (LMC BCR-ABL positiva).

Por último, pese a esta falta de efectividad en nuestros modelos JAK2 V617F, estudiamos si aun así el Dasatinib era capaz de actuar sinérgicamente con el Ruxolitinib. Para ello se utilizó una concentración de 10nM de Dasatinib. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 46.



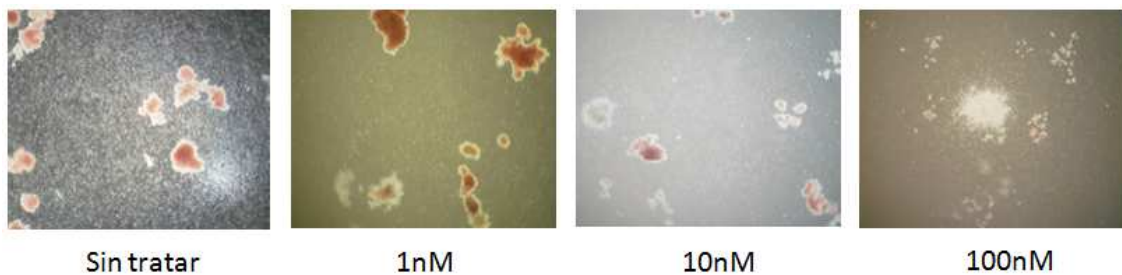
**Figura 46:** Efectos sinérgicos del Ruxolitinib y KNK437 en las líneas celulares.

Los estudios de viabilidad de Dasatinib sobre cultivos de colonias en metilcelulosa presentaron una concentración de colonias muy similar entre los diferentes grupos (Figura 47 A y B). Sin embargo, como se aprecia en la figura 47.D, para los casos provenientes de NMP JAK2 V617F cultivados sin EPO, los IC50 eran cercanos a 10nM, siendo considerablemente superiores a los presentados por las TE JAK2 WT. (IC50= 1nM).



**Figura 47:** Acción del Dasatinib sobre los cultivos de células mononucleadas. (A y B, conteo de colonias. C y D viabilidad celular).

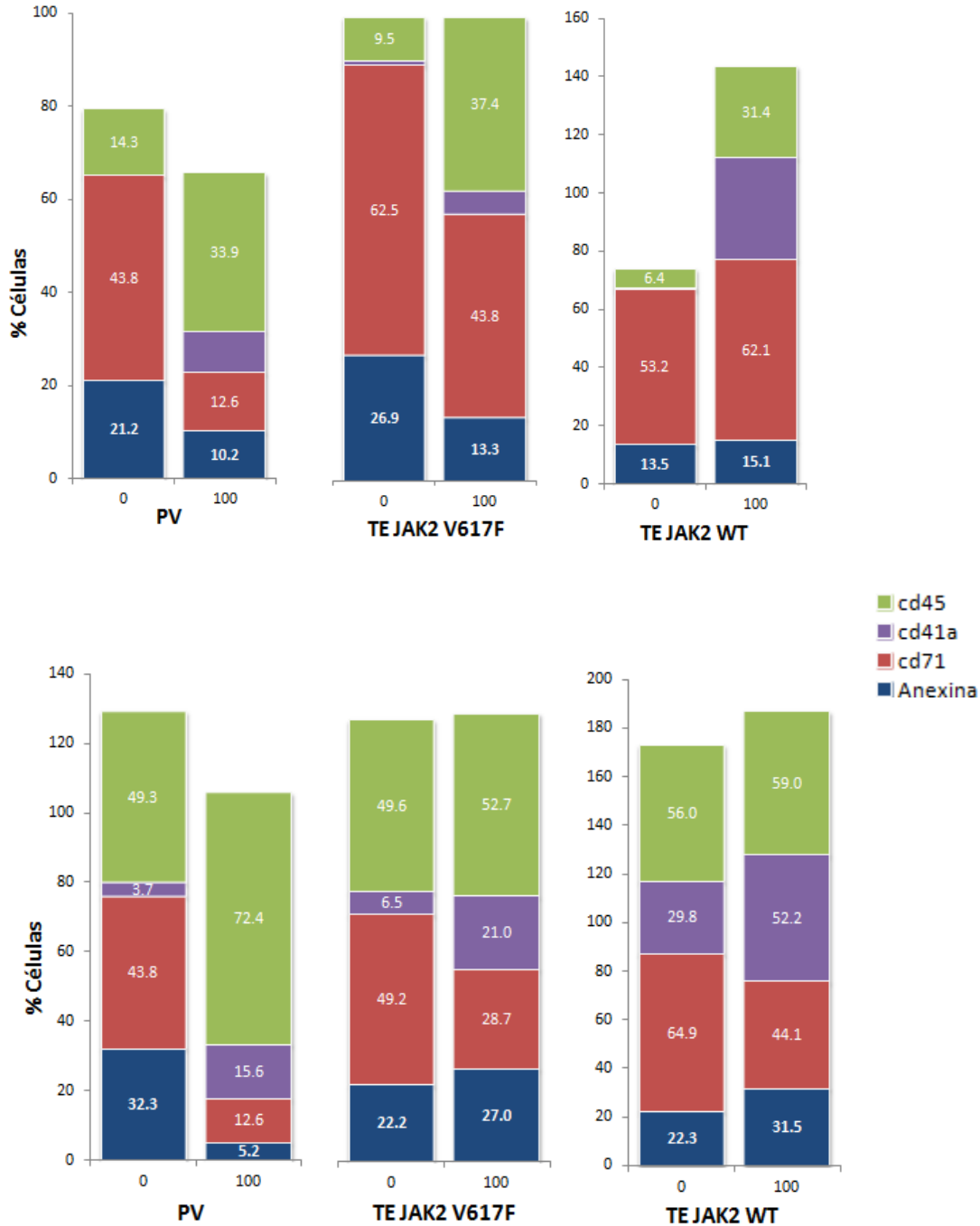
A nivel fenotípico, el Dasatinib, parece disminuir el desarrollo de las colonias eritroides específicamente. Esta disminución ocurría no solo a nivel de número sino del tamaño de las mismas, observándose una inhibición del desarrollo (Figura 48).



**Figura 48:** Disminución del número de colonias eritroides en el tratamiento con Dasatinib.

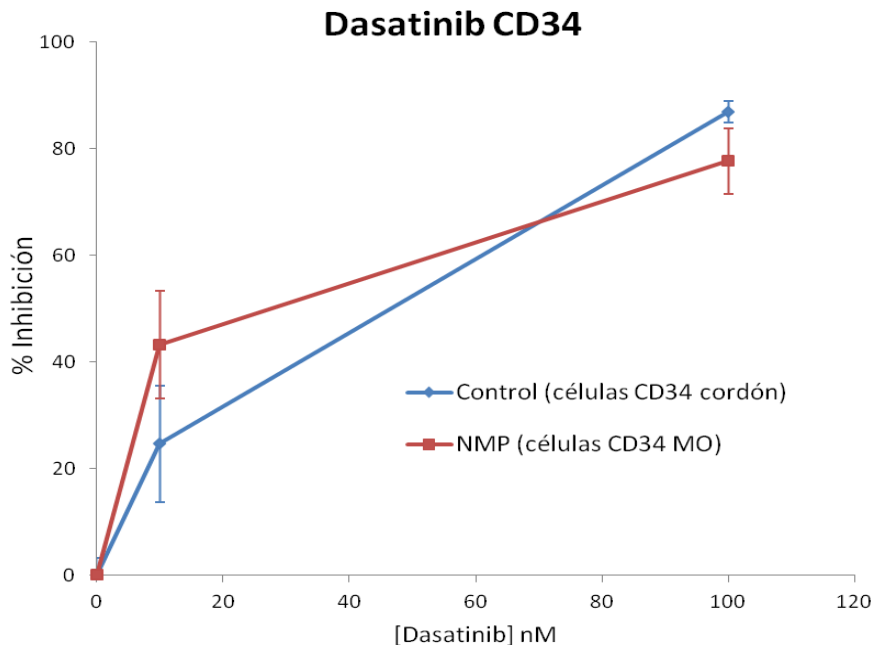
Como se observa en la

Figura 49, los efectos del Dasatinib sobre la estirpe eritroide son más patentes en PV que en TE, tanto JAK2 V617F como WT.



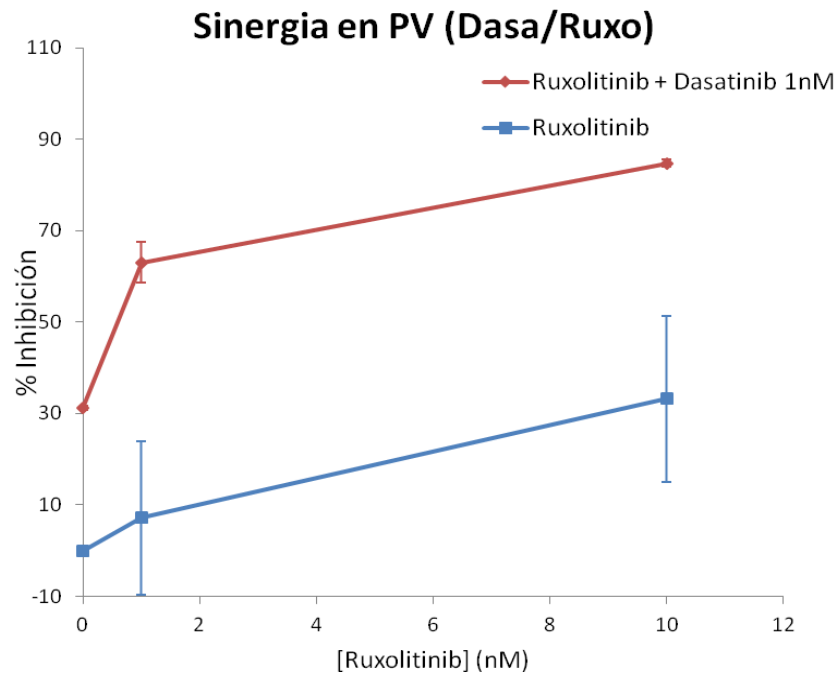
**Figura 49:** Inmunofenotipado de los efectos de Dasatinib en cultivos de colonias eritroides, facilitados con EPO (A) o en crecimiento endógeno (B). Para cada anticuerpo; se representa la media de los valores de % de células marcadas. Esta media está calculada para al menos tres pacientes de cada grupo.

El valor del IC50 encontrado en cultivos de colonias se mantenía analizando células CD34 de Pacientes NMP JAK2 V617F, siendo cercano a 10nM. Las células de donantes de cordón control presentaron un comportamiento similar (Figura 50)



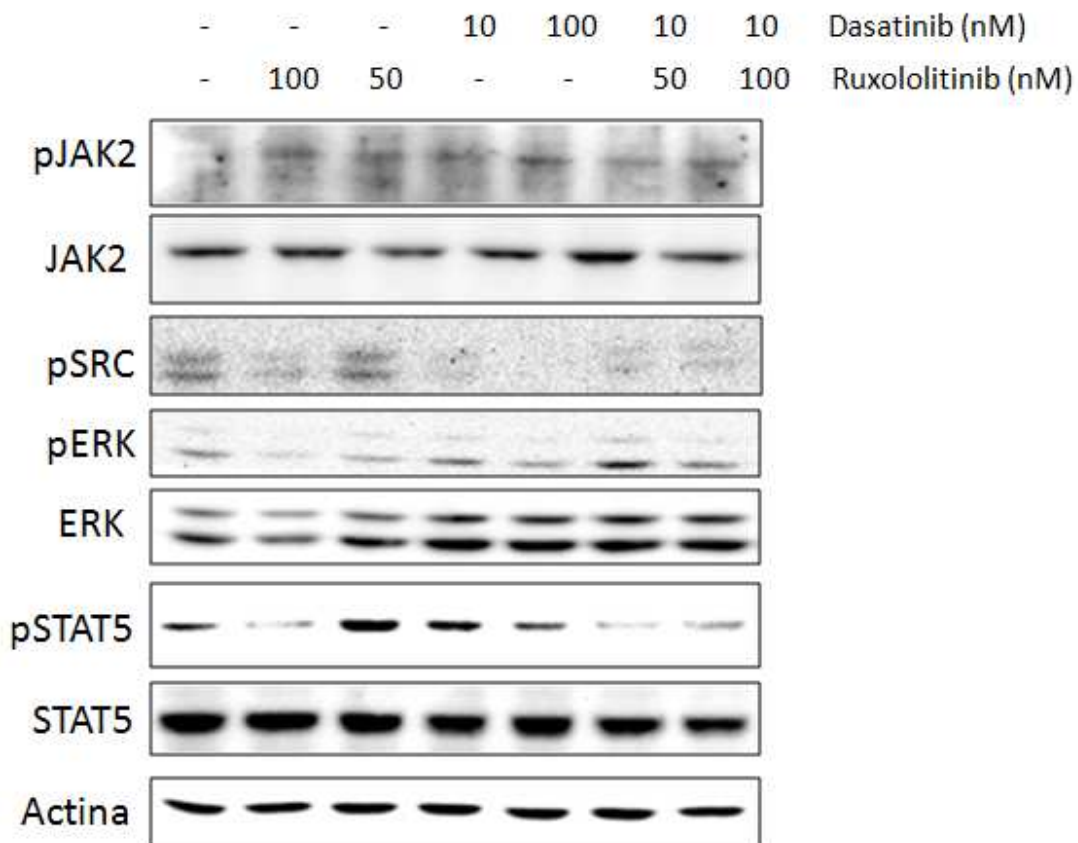
**Figura 50: Efecto del Dasatinib en células madre CD34 positivas.** Células extraídas de médula ósea de pacientes NMP (rojo) o de cordón umbilical de donantes no enfermos (azul).

Como en el análisis de Inhibición con KNK437 y Sorafenib, los estudios de sinergia con Ruxolitinib en células de pacientes con PV también presentaron una disminución significativa de la concentración efectiva de Ruxolitinib en presencia de una concentración de Dasatinib de 1nM, observándose una disminución del IC50 para Ruxolitinib de 50nM a 1nM (Figura 51). Los valores de CI para la combinación de fármacos fueron de 0,084 para Ruxolitinib 1nM y de 0,137 para Ruxolitinib 10nM.



**Figura 51:** Efectos sinérgicos del Dasatinib y el Ruxolitinib en células mononucleadas procedentes de 3 casos de PV.

El análisis molecular de los efectos del Dasatinib sobre la línea celular BAF3 JAK2V617F mediante western blot (Figura 52) permitió comprobar su efecto inhibitorio sobre la activación de SRC, que parece correlacionarse con una disminución de la activación de STAT5. Más aun, como se puede observar en las dos últimas bandas, la acción conjunta de ambos fármacos prácticamente elimina la activación de STAT5.



**Figura 52:** Western blot de las proteínas de la línea BAF3 JAK2 V617F tratadas con diferentes concentraciones de Ruxololitinib y Dasatinib.

A modo de resumen se presentan en la Tabla 10. los valores de IC 50 obtenidos mediante una aproximación sigmoïdal obtenida mediante el programa GraphPad Prism, para los diferentes compuestos y sus combinaciones con Ruxololitinib, en los diferentes modelos estudiados. Además se indican los valores del índice de combinación (CI) obtenido mediante la ecuación de Chou-Talalay mediante el programa Calcsyn.

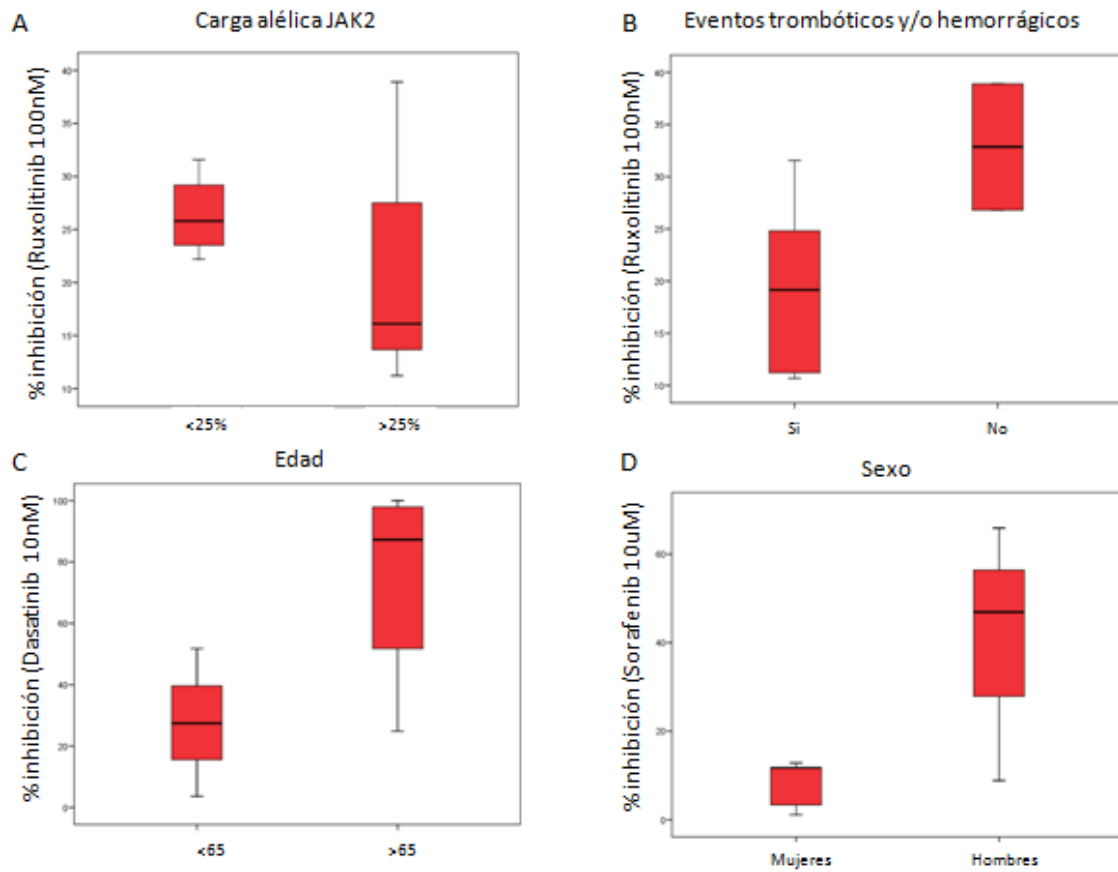
**Tabla 10** : IC50 y Coeficiente Sinérgico para los diferentes compuestos. (CI>1,1 Antagonistas. 1,1<CI<0,9 Efecto aditivo. 0,9<CI<0,3 Efecto Sinérgico. CI<0,3 Efecto sinérgico fuerte). [Ruxolitinib]: <sup>a</sup>10nM, <sup>b</sup>50nM, <sup>c</sup>100nM. El IC50<sub>sinergia</sub> se determinó en relación al Ruxolitinib a concentraciones constantes de Sorafenib (1uM), KNK437 (1uM) y Dasatinib (1nM).

	Ruxolitinib	Sorafenib			KNK437			Dasatinib		
	IC50 <sub>(nM)</sub>	IC50 <sub>sin</sub>	CI	IC50 <sub>(uM)</sub>	IC50 <sub>sin</sub>	CI	IC50 <sub>(uM)</sub>	IC50 <sub>sin</sub>	CI	IC50 <sub>(nM)</sub>
HEL	274.4	249.9	1.07 <sup>b</sup>	3.87	6.67	0.41 <sup>b</sup>	17.1	111.1	0.30 <sup>c</sup>	-
BAF3mut	157.5	58.91	0.60 <sup>b</sup>	8.49	43.11	0.22 <sup>c</sup>	313.2	59.13	0.31 <sup>b</sup>	-
BAF3wt	137.4	21.11	0.43 <sup>b</sup>	2.37	29.43	0.39 <sup>c</sup>	79.8	42.08	0.33 <sup>b</sup>	-
PV	15.51	0.53	0.052 <sup>a</sup>	8.11	1.03	0.251 <sup>a</sup>	100	0.35	0.14 <sup>a</sup>	11.68

Por último se intentó correlacionar las tasas de respuesta a los diferentes fármacos en cultivo de colonias eritroides con las diferentes variables clínicas y biológicas estudiadas, recogidas en la Tabla 6. Dado el limitado tamaño poblacional a estudio, no se encontró significación estadística en estos análisis, por lo que estos resultados son meramente ilustrativos.

Como se aprecia en la Figura 53.A, dicotomizando la carga mutacional de JAK2, observamos una mejor respuesta a ruxolitinib en los casos con carga mutacional menor de 25%. Sin embargo nuestros resultados sugieren una peor respuesta a este fármaco en aquellos paciente que presentaron eventos trombóticos y/o hemorrágicos.

Respecto al Dasatinib, una peor respuesta parece asociarse a mayor edad (más de 65 años). Por último, como se aprecia en la Figura 53.D, la respuesta a Sorafenib en mujeres es peor con respecto a los hombres.



**Figura 53.** Análisis de la respuesta a los distintos fármacos en función de las variables clínicas y biológicas recogidas.

## *VI. DISCUSIÓN*



## **1. *Análisis de Metilación***

Las alteraciones epigenéticas, como la metilación de islas CpG, son cambios reversibles en la cromatina que modulan la expresión génica sin afectar a la secuencia de ADN. Fallos en la maquinaria de regulación de estos procesos producen perfiles de expresión patológicos. Este tipo de perfiles anómalos a nivel del epigenoma se han relacionado con algunas enfermedades hematológicas [74]. De hecho, el tratamiento con agentes desmetilantes, que revierten la metilación aberrante del ADN, se están utilizando con éxito en algunos desordenes hematológicos [86].

Por ejemplo, ITF2357, un nuevo agente inhibidor de histonas deacetilasas (HDAC), ha mostrado un importante efecto antitumoral en células de PV, ET [87] y MFP [88]. Como consecuencia, se está desarrollando un estudio fase II para evaluar la eficacia y seguridad de este compuesto en el manejo de estas patologías [89].

También se ha relacionado un silenciamiento génico por metilación de genes concretos con las enfermedades aquí estudiadas. Teoffili y col, encontraron que SOCS-1 y SOCS-3 presentaban hipermetilación en casos diagnosticados con NMP [83]. La hipermetilación de otro gen, CXCR4, en casos de MFP, se ha relacionado con la migración de las células CD34 positivas en esta enfermedad [90].

En este estudio, analizamos la tasa de metilación de más de 27.000 loci CpGs en 35 muestras de pacientes diagnosticados con NMP y 12 muestras de donantes control no enfermos. La poca información existente sobre este mecanismo esencial de regulación de la expresión génica en NMP [90, 91], junto con la aparición en estas patologías de nuevas mutaciones en genes relacionadas con la regulación epigenética [92], justificaron este estudio.

El perfil epigenómico a nivel de metilación de ADN de los casos PV JAK2 V617F, TE JAK2 V617F y TE JAK2 WT es muy homogéneo (Figura 18). La muestra biológica utilizada en este análisis fue ADN extraído de sangre periférica de pacientes diagnosticados con NMP sin tratamiento citorreductor. Se eligió esta fuente de material genético por dos motivos. El primero fue la accesibilidad a la muestra; la prueba diagnóstica de cuantificación de JAK2 V617F se realiza sobre ADN genómico de sangre periférica. Además todas las

muestras presentaban más de un 70% de neutrófilos, células utilizadas como modelo en estas patologías.

Sin duda la muestra ideal para este análisis hubiera sido ADN procedente de los clones tumorales extraídos de médula ósea. El principal inconveniente de esta aproximación es que la selección de este clon tumoral en NMP no es trivial ya que, aun siendo JAK2 V617F un buen marcador diagnóstico para estas enfermedades, no es posible utilizarlo en los casos de TE JAK2 WT. Además la hipótesis de partida de este estudio es que JAK2 V617F no es la causa etiológica (al menos no la única) en estas enfermedades.

Los genes pertenecientes a la familia SOCS codifican proteínas intracelulares, algunas de las cuales se han revelado claves en la regulación de procesos fisiológicos como la diferenciación, maduración y activación de las células hematológicas[93]. En un estudio del 2008, Teoffili y col. analizaron los genes SOCS1, 2 y 3 en neutrófilos extraídos de sangre periférica. Confirmaron que SOCS-3 estaba hipermetilado en 5 de los 23 casos de PV analizados y tres de los 30 de TE. Sin embargo, en este estudio no se determinaba claramente el grado de metilación de la población control sana[83]. Por su parte Fourouclas y col. encontraron metilación diferencial en 16 de 60 casos de MFP pero en ninguno de los 15 casos PV ni de los 23 TE al compararlos con los 20 donantes control analizados [82].

En nuestro estudio, de las 31 islas CpG pertenecientes a los genes SOCS incluidas en el microarray, solo dos islas CpG pertenecientes a SOCS-1 y SOCS-4 estaban hipermetiladas en NMP. Sin embargo, estas islas CpGs presentaban un grado de metilación similar en la población control no enferma, indicando que, en estos casos, la metilación puede relacionarse con un proceso tejido específico natural en vez de ser causada por un proceso patológico NMP específico.

En la región de SOCS-1 analizada, correspondiente al exón 2, se observa una disminución del número de casos hipermetilados (PV>TE JAK2V617F V>TE WT>controles). No obstante, se encuentra un perfil opuesto si se analizan solo los casos hemimetilados, que puede estar apantallando las posibles diferencias entre las poblaciones analizadas (Tabla 8), por lo que mediante el  $\Delta\beta$  no observamos metilación diferencial en este gen. Juntos, estos datos sugieren que la metilación aberrante de genes de la familia SOCS no parece jugar un papel importante en la fisiopatología de PV o TE.

Se ha descrito que los genes XAF1, JUNB, CDH13, TET2, CBLy CEBPA, presentan mutaciones recurrentes en casos NMP [92]. Estos genes se relacionan con mecanismos de regulación epigenéticos como la metilación y acetilación de histonas. Nuestra aproximación solo nos ha permitido estudiar el grado de metilación de las islas Cpg de estos genes. No encontramos, de forma acorde a lo descrito en la literatura [94, 95], un patrón de metilación diferencial en ninguno de estos genes entre los casos NMP y controles.

El único gen que presenta metilación diferencial estadísticamente significativa es ZNF577. El grado de metilación de este gen decrece claramente al pasar de PV a ET y de éstos a controles (Figura 19), mientras que la expresión de este gen muestra un comportamiento opuesto (Figura 20). Este comportamiento podría estar relacionado con la fisiopatogenia de las NMP y más concretamente con las diferencias entre PV y TE.

EL gen ZNF577 codifica una proteína de dedos de Zinc de función incierta. El hecho que presente dominios de dedos de Zinc, indica que interacciona con el DNA, por lo que posiblemente tenga relación con mecanismos de regulación transcripcional. Dentro de la vía JAK-STAT, los principales reguladores transcripcionales, que además presentan dedos de Zinc son las Proteínas Inhibidores de STAT Activado (PIAS). Mediante un alineamiento de secuencias (BLAST) entre ZNF577 y las de los principales PIAS, solo encontramos homología en las regiones de dominios de dedos de Zinc, no así en las de interacción con STATs y otros dominios efectores presentes en los PIAS.

Por otro lado, la secuencia de ZNF577 presenta un dominio de tipo KRAB, descrito como módulo de represión de la transcripción[96]. Este dominio está presente en numerosos genes supresores de tumores como BRAC1, proteína reparadora del ADN, implicada en cáncer de mama y otras neoplasias, y relacionada con metaloproteasas como MMP9 [97]. Además existen otros indicios de que ZNF577 puede ser un gen supresor de tumores. Por ejemplo, recientemente se ha descrito en una translocación relacionada con cáncer de próstata [98].

Como se puede observar en la Figura 20, hay dos poblaciones claramente diferenciadas en relación al grado de metilación de este gen. Sin embargo, no fue posible correlacionar estas dos poblaciones con las diferentes variables demográficas, clínicas o biológicas.

Hasta donde sabemos, este es el primer análisis global de la metilación en las NMP TE y PV. Nuestros resultados muestran que no existe un perfil de metilación diferencial que juegue un papel en la fisiopatogénesis de ninguna de las enfermedades estudiadas, sean JAK2 V617F o JAK2 WT, ni que justifique las diferencias fenotípicas entre PV y TE. Pese a que estos resultados deberían ser confirmados en células CD34 de médula ósea, el hecho de que el perfil de expresión de estas enfermedades sea bastante homogéneo, como se discutirá a continuación, y que la hipermetilación del ADN no es un hallazgo frecuente en NMP, sugiere que estas neoplasias no son objetivos adecuados para el ensayo de tratamientos desmetilantes como la 5-Azatidina o la Diazatidina [99].

## **2. *Análisis de expresión***

El análisis de expresión por “microarray”, realizado para buscar una huella genética diferencial entre los grupos NMP tratados con HU, permitió la identificación de 84 genes con expresión diferencial significativa a nivel estadístico. Algunos de estos genes, son clave en las principales vías de señalización intracelular proliferativas como PI3K/AKT, MAPK (MAPK14, RAF1, RASA1, YWHAH), la familia de las SRC (LYN y SKAP2) y tirosina quinasas (JAK2, BTK). Otros se relacionan con la hematopoyesis (CD44, MAP1B, JARID2, HMGB2, IKZF1), o con otras vías de señalización y apoptosis (SKAP2, PLAUR, LRMP). Muchos de ellos ya han sido caracterizados en otros microarray y estudios funcionales sobre NMP [44, 60].

La posterior validación de este análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando sondas taqman en un soporte TLDA de 384 pocillos, determinó un perfil de expresión diferencial en NMP, atendiendo al grado de respuesta de los mismos. Encontramos 34 genes sobre-expresados en pacientes que no respondían al tratamiento con HU. Entre estos 34 genes, se mantenían los que formaban parte de la vía MAPK (MAPK14, p38, RAF1) de la vía AKT (PI3K, FRMD4B), de la familia SRC (LYN, FCER1G, BTK, SKAP2) así como JAK2 y IGFR1. La expresión génica no variaba analizando otras variables como el tiempo de evolución de la enfermedad.

El grupo de pacientes que no respondía al tratamiento con HU, presentaba una expresión de los genes pertenecientes a la vía MAPK no solo significativamente menor a los que si respondían, sino que además esta era similar a las eritrocitosis secundarias y a

los casos control. La activación y sobre-expresión de genes como P38, RAF1 y MAP2K1, a sido descrita previamente en la patogénesis de PV [44-46].

La sobre-expresión de los genes de la vía MAPK, puede estar relacionada con la falta de respuesta al tratamiento con HU, aunque por mecanismos aun desconocidos, probablemente relacionados con la expresión del gen JAK2.

El gen AKT y la vía de señalización que define, es crucial en un gran número de procesos relacionados con la proliferación, diferenciación, ciclo celular y apoptosis. Esta molécula, además ha sido relacionada con la patogénesis de NMP (TE y PV), por sobre-activación y sobre-expresión[45, 51]. En nuestro análisis encontramos que el gen PI3K, regulador de AKT, estaba también sobre-expresado en pacientes que no respondían al tratamiento con HU. Esta sobre-expresión puede estar también implicada en la falta de respuesta al tratamiento con HU y se correlaciona con la sobre-expresión del gen JAK2.

Se ha descrito previamente que algunas de las proteínas de la familia SRC, pueden estar relacionadas con la señalización mediada por el receptor de la EPO [57]. Pese a ello no parecen indispensables para el fenotipo PV inducido por JAK2 V617F, como muestran estudios en médula ósea de ratones “knockout” (KO) para genes como LYN, FYN o FGR [100]. Nuestros resultados muestran sin embargo que BTK y otros miembros de la familia SRC como LYN, FCER1G y SKAP2, están sobre-expresados en pacientes que no responden al tratamiento con HU. Como en el resto de vías descritas, esta sobre-expresión parece estar relacionada con la falta de respuesta a HU, por lo que menores niveles de expresión de estas vías podrían correlacionarse con una buena respuesta al tratamiento con HU en un modelo predictivo. Sin embargo, este análisis solo podría realizarse de forma retrospectiva sobre la población que, en el momento del análisis no había sido tratada. En la actualidad se están recopilando los datos de respuesta al tratamiento para estos 20 casos.

Algunas de las proteínas codificadas por genes de la familia SRC parecen no estar relacionados con la cascada de señalización de JAK2, lo que aumenta el interés del estudio en profundidad de estas dianas, ya que sus alteraciones en la expresión y activación serian independientes de las mutaciones en JAK2. Además el que los niveles de expresión en la respuesta a HU sean similares a los niveles observados en pacientes

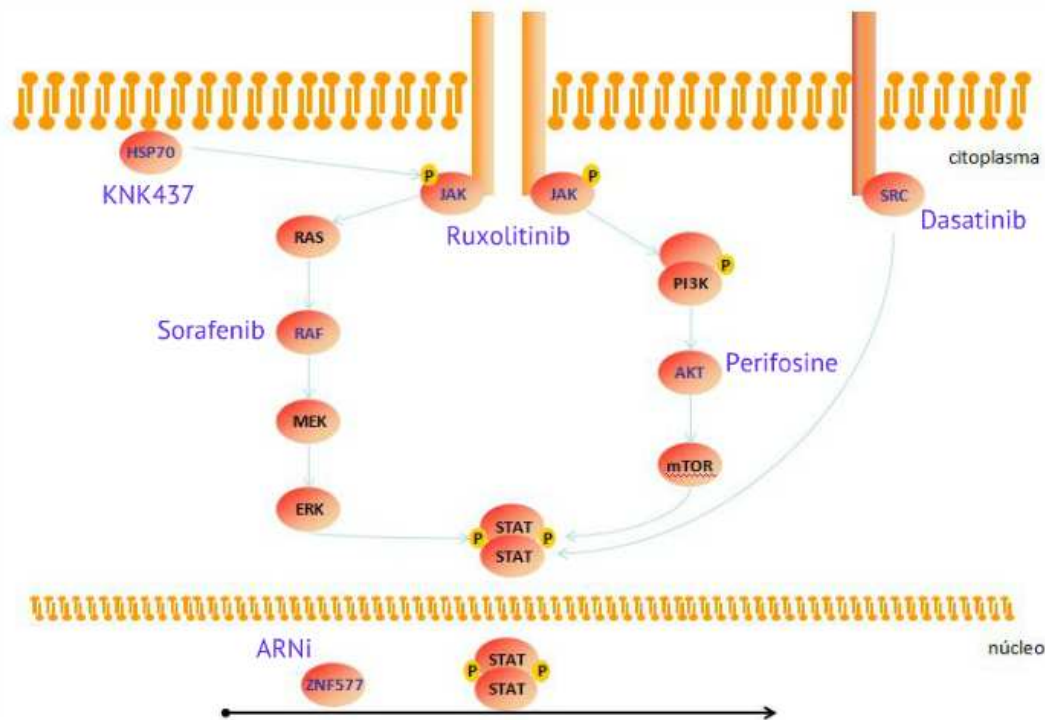
con ER y controles no enfermos, sugiere que estos hallazgos podrían ser de gran interés ya que los pacientes con altos niveles de expresión de los genes de la familia SRC podrían beneficiarse de tratamientos con inhibidores de SRC como Dasatinib. De hecho, algunos grupos ya han ensayado Dasatinib en líneas celulares y en pacientes con PV con cierto éxito[59].

El tratamiento con HU en pacientes NMP mostró una disminución no solo en la carga alélica de JAK2V617F, sino también en la expresión del gen JAK2 en la falta respuesta a HU. Mientras que JAK2 estaba sobre-expresado en pacientes que no respondían al tratamiento con HU, en los pacientes que si respondían bien, la expresión de JAK2 se redujo a niveles equivalentes a los hallados para ER y controles. Además mostramos que, pese a que la carga tumoral de JAK2V617F disminuía después del tratamiento con HU como ya han indicado algunos autores [101], no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de cuantificación JAK2V617F en relación a la respuesta a HU.

Sin embargo si analizamos la expresión del gen JAK2 en nuestros grupos de pacientes con y sin respuesta a HU, si encontramos una expresión diferencial estadísticamente significativa. Esto indica que la sobre-expresión de JAK2 puede reflejar una falta de respuesta al tratamiento con HU, pese a que el mecanismo molecular subyacente no queda definido. A nuestro entender, este es el primer estudio que muestra estos resultados, pero consideramos que el grado de expresión podría ser útil en un futuro como un parámetro adicional de respuesta.

### **3. *Ensayos funcionales***

El conjunto de cribados de expresión antes descrito, nos permitió definir un grupo de dianas moleculares que podrían estar relacionadas con la fisiopatogenia de los NMP y además ser candidatos para la definición de nuevas aproximaciones terapéuticas. El análisis de expresión génica por microarray nos permitió seleccionar las principales proteínas de las vías proliferativas JAK/STAT, MAPK, AKT y familia SRC, para cuya inhibición seleccionamos los compuestos Ruxolitinib, Sorafenib, Perifosine y Dasatinib. El análisis proteómico, por su parte, nos permitió definir un último candidato; HSP70 y su inhibidor correspondiente, KNK437 (Figura 54).



**Figura 54:** Modelo de acción de nuestros fármacos sobre las cascadas de señalización estudiadas

Los modelos que seleccionamos para la realización de estos estudios funcionales fueron tres: los cultivos secundarios de líneas celulares, los cultivos de células mononucleadas de casos NMP extraídas de sangre periférica y los cultivos de células madre CD34 positivas.

La principal ventaja de los cultivos secundarios de líneas celulares es su versatilidad y reproducibilidad. La principal desventaja es que son el modelo más alejado de nuestras patologías. Se seleccionaron 2 líneas JAK2 V617F, una procedente de una eritroleucemia (HEL) y otra obtenida tras la transformación de la línea murina BA/F3 con JAK2 V617F y EPOR. Sin duda estas dos líneas están bastante alejadas de nuestras patologías, una por provenir de una LMA y la otra por ser un modelo murino. Sin embargo creemos que el ruido producido por estas desviaciones se minimiza gracias al estudio en paralelo de ambas. Podemos asumir que los efectos encontrados en los dos modelos han de ser debidos a la presencia de JAK2 mutado, único nexo entre las dos líneas. Además, como control negativo de estas líneas contábamos con la línea HL60 también proveniente de una LMA, BA/F3 JAK2 WT y BA/F3 sin transformar con JAK2 así como un modelo celular procedente de una LMC (K562).

El crecimiento de colonias eritroides en cultivos endógenos (sin EPO ni otras citoquinas) es un marcador clínico de la PV incluido en los criterios diagnósticos de esta enfermedad. Nuestro modelo se aleja un poco del aplicado en la práctica clínica. Utilizamos en los cultivos sin EPO las citoquinas IL3 y SCF para garantizar el crecimiento de una mínima cantidad de células que permita la realización de todos los análisis aplicados.

Además dado el elevado número de ensayos con cada muestra, tampoco definimos con detalle el tipo y grado de maduración de cada colonia (BFU-E, CFU-E, BFU-GM, CFU-MK). Sin embargo, las poblaciones celulares de todos los ensayos realizados fueron caracterizadas por citometría de flujo. Estas desviaciones del modelo clínico estándar han quedado validadas al encontrar para los fármacos descritos unas actividades similares a las presentadas en la bibliografía [59, 102, 103].

Sin embargo el mejor modelo con el que contamos en este estudio son los cultivos de células madre CD34 positivas. Estas células fueron extraídas de médula ósea de pacientes diagnosticados con NMP sin ningún tratamiento. Dado la dificultad de obtención de este tipo de muestras y las pocas células obtenidas tras la purificación de la población CD34 positiva con bolas magnéticas, solo se pudo analizar la viabilidad en presencia de los fármacos a estudio de 4 casos NMP (2 PV y 2TE).

El Ruxolitinib es el primer inhibidor de JAK2 admitido por la FDA para el manejo de la mielofibrosis [104], y está en desarrollo clínico para el resto de NMP y otras neoplasias hematológicas [105]. Pese a que la acción del Ruxolitinib sobre los modelos celulares utilizados está en parte definida en la bibliografía [102], creímos interesante por un lado validar estos resultados, con el fin de ratificar a su vez nuestra aproximación experimental. Además consideramos que el análisis exhaustivo realizado amplía la información existente sobre este compuesto en los principales modelos de NMP existentes, permitiendo una mejor caracterización de su acción a nivel molecular.

Los resultados obtenidos en el cultivo de células eritoides de PV (IC<sub>50</sub> 30nM) son similares a los presentados en el estudio preclínico de Quintas-Cardama y col. (IC=67nM). Además observamos de forma acorde con la literatura [102], una mayor acción citotóxica del Ruxolitinib en NMP que en controles. A nivel fenotípico, pese a

observar una cierta disminución del tamaño de las colonias eritroides, el Ruxolitinib principalmente disminuye el número de las mismas, lo que parece indicar que actúa sobre progenitores tempranos. Mediante inmunofenotipado observamos que Ruxolitinib disminuye de forma específica la población eritroide CD71 positiva. Pese a que puede parecer que las poblaciones panleucocitaria y megacariocítica aumentan, estos valores no son absolutos, ya que en todos los ensayos de citometría se analizaron 10.000 células, por lo que al disminuir específicamente una de las poblaciones, las otras han que aumentar. También observamos un aumento leve de la apoptosis en los cultivos endógenos de muestras de PV y como era de esperar, una mayor población megacariocítica en cultivos sin EPO. No se muestran los datos de las TE negativas sin EPO, ya que solo se disponía del inmunofenotipado de dos de ellas.

Por último la inhibición de la proliferación de células CD34 positivas de las 4 muestras NMP (2 PV y 2 TE) analizadas fue significativamente mayor a la encontrada en células CD34 de donantes de cordón no enfermos ( $IC_{50NMP}$  35nM,  $IC_{50CONTROL} > 400nM$ ,  $Pval. < 0,05$ ) Estos resultados indican que el Ruxolitinib no solo es más eficaz en la inhibición de la proliferación de células de pacientes NMP, sino que además actúa selectivamente contra células madre patológicas.

En líneas celulares, Ruxolitinib presentó una eficacia menor que en cultivos primarios. La bibliografía presenta un  $IC_{50}$  en la línea HEL de 186nM y en BAF3 JAK2 V617F de 137nM [102]. En nuestro estudio encontramos un  $IC_{50}$  en la línea HEL de 274nM y de 126nM en la línea BA/F3 JAK2 V617F.

Debido al gran número de ensayos a realizar, nos vimos obligados a reducir el número de concentraciones de trabajo estudiadas para caracterizar los efectos de cada fármaco sobre los diferentes modelos de cultivo. Pese a ello, como se muestra, los valores de  $IC_{50}$  para este y el resto de fármacos son consistentes con los descritos en la bibliografía [59, 102]. Además, la motivación de este estudio no es definir perfectamente el rango dinámico de acción de cada fármaco, sino comparar su eficacia entre las diferentes poblaciones estudiadas y los posibles efectos sinérgicos que presentan.

Una vez caracterizados los efectos del Ruxolitinib en nuestros modelos celulares, pasamos a estudiar los efectos del resto de compuestos seleccionados, tanto de forma independiente, como en combinación con el Ruxolitinib.

Pese a que no está descrita la acción del Sorafenib en modelos celulares de NMP, su acción citotóxica en otros procesos neoplásicos como cáncer de colón y pulmón si está ampliamente estudiada [106]. Además se ha mostrado eficaz contra la progresión de multitud de tumores sólidos [103]. Por último también existe en la bibliografía la descripción de su posible aplicación en algunas neoplasias hematológicas como la leucemia linfocítica crónica [107].

En nuestra batería de experimentos con este fármaco, encontramos que el Sorafenib tiene efectos citotóxicos en un rango de concentraciones (1-10uM) similar al descrito previamente en otros modelos [103]. Además comprobamos que este compuesto actúa de forma sinérgica con el Ruxolitinib disminuyendo las concentraciones efectivas del mismo tanto en líneas celulares como en cultivos primarios de células provenientes de pacientes.

Por otro lado es llamativo el hecho de que los efectos inhibitorios de la proliferación celular del Sorafenib en donantes control no enfermos sean significativamente mayores que los presentados por los casos NMP. Esta discrepancia puede ser explicada asumiendo que la vía MAPK es clave en la proliferación celular basal, por lo que su bloqueo tiene un efecto citostático automático en células de donantes control, cuya proliferación no cuenta con la activación constitutiva de JAK/STAT y todas las cascadas asociadas. Sin embargo en el modelo de cultivo con células CD34 positivas sí que apreciamos una mayor inhibición del desarrollo en casos NMP respecto a los donantes control ( $P_{val} < 0.05$ ). Esto podría indicar que en los estadios más tempranos de la maduración celular, la vía MAPK no es el único ni el principal agente transductor de las señales proliferativas, volviéndose clave sin embargo en células más maduras.

A nivel fenotípico, el Sorafenib produce un cambio en el desarrollo de las colonias. Como se muestra en la Figura 30, el Sorafenib inhibe el desarrollo de colonias eritroides CFU-E y BFU-E, y aumenta el de colonias blancas no hemoglobinizadas (CFU-GM y CFU-MK). La citometría de flujo revela que detrás de este cambio fenotípico se encuentra una

disminución de las células eritroides CD71 y un aumento de las colonias megacariocíticas y panleucocitarias, principalmente CFU-GM.

Mediante análisis de CBAs en muestras de pacientes NMP tratados con Sorafenib, observamos una disminución de la activación de la proteína P38. Esta disminución fue confirmada mediante western blot de cultivos de la línea celular JAK2 V617F tratados con Sorafenib. La proteína P38, pertenece a la familia MAP Quinasa, pero no forma parte de la cascada clásica RAF/RAS/MEK/ERK, sino que conforma una vía de señalización independiente. Desterke y col, han señalado que la activación de P38 está relacionada con un aumento de la apoptosis de megacariocitos [108]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el Sorafenib tiene un doble efecto sobre las células hematopoyéticas. Por un lado disminuye la proliferación de células eritroides mediante la inactivación de la vía MAPK clásica. Por otro lado, a altas concentraciones promueve la supervivencia de las no eritroides mediante el bloqueo de la apoptosis de las mismas, vía P38.

La chaperona HSP70 es una proteína perteneciente a la familia de las “Heat Shock Proteins” (HSP), proteínas encargadas de garantizar el correcto plegamiento de un gran número de dianas. Son activadas mediante diferentes señales de estrés [109], y su inhibición aumenta la poliubiquitinación y degradación por el proteosoma [110]. Se han relacionado con diferentes vías proliferativas implicadas en la proliferación mieloide como JAK/STAT, AKT o MAPK [111]. Además se ha descrito una protección de la proteólisis de GATA1 por parte de HSP70 [112, 113]. A nivel hematológico, las chaperonas tienen un papel recurrente en numerosos procesos neoplásicos. Concretamente, HSP70 ha mostrado sobre-expresión en los SMD [114], LMC o LLA [115]. Mediante el estudio de Gel 2D/Espectrometría de masas, ampliamos estos resultados relacionando la sobre-expresión de esta proteína con la PV.

Para estudiar los efectos de la inhibición de esta proteína sobre nuestros modelos celulares, utilizamos el inhibidor de HSP70, KNK437. El análisis molecular de los efectos de este fármaco sobre la línea celular BA/F3 Jak2 V617F mediante western blot indica que KNK437, no solo disminuye la activación de JAK2, sino que es capaz de inhibir la expresión de esta proteína. En un estudio publicado recientemente, se definen los efectos sinérgicos del inhibidor de HSP90, AUY922 con el inhibidor de JAK2 TG101209. Además encuentran que la inhibición de HSP90 disminuye la auto fosforilación y

expresión de JAK2 V617F, en células primarias de pacientes con mielofibrosis [63]. Esta disminución de la expresión se relaciona con la inhibición de la unión JAK2-HSP90, promoviendo la degradación del primero por el proteosoma.

KNK437 presenta sinergia con Ruxolitinib, tanto en las líneas celulares analizadas como cultivos de colonias de PV. Como se muestra en la tabla 10, estos efectos son muy intensos en este último modelo, llegando a unos CI inferiores a 0,1 (efecto sinérgico muy fuerte).

De manera análoga, recientemente ha sido descrito otro inhibidor de HSP90, PU-H71, como potencial tratamiento de las NMP, concretamente de la PV y la TE [116]. Con este inhibidor también se observa una disminución de la expresión de JAK2. Esta descrito que HSP90 y HSP70 pueden unirse y formar complejos enzimáticos que potencian sus funciones [117]. Estos datos sugieren que las HSP pueden ser clave en la fisiopatogenia de las NMP, y dada la inhibición de la expresión de JAK2 tanto mediante el bloqueo de HSP90 como HSP70, estas proteínas resultan ser unas excelentes dianas terapéuticas.

Numerosos estudios han relacionado el exceso de eritropoyesis en PV con un aumento de la vía AKT/PI3K [118] y de su molécula efectora GSK3 $\beta$  [119, 120]. Nuestros resultados sugieren que existe una relación entre la sobre-expresión de este gen y la falta de respuesta a HU. Por ello decidimos estudiar la inactivación de esta vía en nuestros modelos celulares para concretar su papel en la fisiopatogenia de las NMP. Dado que la vía PI3K/AKT, se relaciona con multitud de procesos neoplásicos, se han desarrollado una gran variedad de inhibidores para estas dianas [121]. En el presente estudio seleccionamos el alquifosfolipido inhibidor de AKT Perifosine, molécula en ensayo clínico fase III en mieloma multiple.

En lo que creemos es el primer ensayo de inhibición con este compuesto en modelos NMP, encontramos una mayor respuesta al mismo en células provenientes de casos diagnosticados con NMP que en donantes control no enfermos, aumentando la apoptosis de los primeros en cultivos no suplementados con EPO. Estos resultados se validaron en cultivos de células madre CD34 positivas.

Sin embargo los estudios de sinergia con este fármaco y Ruxolitinib no fueron concluyentes, debido a la escasa reproducibilidad de los mismos. Este hecho puede ser

debido bien a un diferente grado de respuesta en los casos NMP estudiados. Sin embargo la limitada población estudiada no ha permitido concretar este resultado.

El Dasatinib es un inhibidor dual de las quinasas de la familia SRC, y ABL que ha sido recientemente aprobado para el tratamiento de adultos en todas las fases de la LMC con resistencia o intolerancia al tratamiento con metilato de imatinib [122].

Dasatinib también inhibe otros oncogenes tirosina quinasa como c-KIT, PDGF-RB o EPHA2 [56, 122]. Estas quinasas están implicadas en multitud de procesos celulares relacionados con la oncogénesis como son la proliferación, adhesión, metástasis, angiogénesis, control del ciclo celular y apoptosis.

En este estudio mostramos que el Dasatinib, pese a no ser eficaz en la inhibición de la proliferación de líneas celulares, acorde con lo observado previamente en la línea HEL [123], si presenta una inhibición significativa de los cultivos de células mononucleadas de casos NMP. En un estudio preliminar, Wapll y col. observaron un grado de inhibición similar en pacientes con PV [59].

Nuestros resultados señalan que este efecto observado en PV es similar al presentado por casos de TE JAK2 V617F. Sin embargo las TE JAK2 WT son hasta 10 veces más sensibles a este compuesto. Esto puede indicar que las proteínas de la familia SRC son importantes en la fisiopatogenia de NMP, pero sus efectos quedan enmascarados por la presencia de mutaciones en JAK2. Sin embargo en las TE negativas, al no tener la activación constitutiva de la vía JAK/STAT, la implicación de las SRC queda más patente.

Este compuesto, al igual que el Sorafenib y el KNK437, presenta un importante efecto sinérgico con Ruxolitinib, tanto en líneas celulares, como en ensayos con células de pacientes.

Okutani y col. Demostraron que cSRC está implicada en los mecanismos de transducción de señal mediados por eritropoietina, relacionando esta proteína con la activación de STAT5 [124]. En la Figura 52, se muestra que, al menos en la línea BAF3 JAK2 V617F estudiada, la inhibición con Dasatinib elimina completamente la activación de SRC, y a su vez disminuye la activación de STAT5 a concentraciones próximas a 100uM. Ruxolitinib por su parte, a concentraciones cercanas a 100nM, también elimina la activación de

STAT5. A concentraciones menores, de 10uM de Dasatinib y 50nM de Ruxolitinib, no se observa esta inhibición de STAT5. Sin embargo si se aplican estas concentraciones en conjunto, se elimina casi por completo la activación de esta proteína. Estos resultados sugieren que el fenómeno molecular que determina los efectos sinérgicos entre ambos fármacos es la inhibición del efector común STAT5.

De hecho, como se muestra en la Figura 54, todas las vías inhibidas por los compuestos estudiados confluyen en la proteína efectora STAT5. Además, como se muestra en los diferentes westerns blot realizados, la combinación de Ruxolitinib con los diferentes fármacos provoca una disminución de la activación de STAT5. Estos resultados nos permiten concluir que los efectos sinérgicos encontrados para los diferentes farmacos, a nivel molecular, son debidos a la inhibición conjunta de la molécula efectora común STAT5.

Pese a que se ha realizado un gran esfuerzo para en la búsqueda de inhibidores contra STAT3[125, 126], hasta hace poco no existían compuestos específicos y seguros que inhibieran STAT5[127]. La relación de los efectos sinérgicos encontrados para los diferentes compuestos con STAT5, sugiere que el ensayo de estos nuevos inhibidores contra esta diana con una aproximación experimental similar a la sugerida en esta tesis es prometedora.

Consideramos que los resultados expuestos, justifican el diseño de ensayos clínicos que estudien las ventajas de la administración de Ruxolitinib en combinación con los diferentes fármacos aquí estudiados.

Por otro lado, se han encontrado efectos sinérgicos entre distintos inhibidores de JAK2 y inhibidores de histona deacetilasas como panabinstat [128], AUY922[63] y otros inhibidores de HSP90 [129]. Esto sugiere que los efectos sinérgicos son un mecanismo bastante recurrente, que podría ayudar a disminuir la dosis de Ruxolitinib, para disminuir los efectos secundarios que causan intolerancia en un 5/10% de los casos estudiados en los diferentes ensayos clínicos, y evadir la resistencia molecular encontrada en un 20% de los mismos.

Estos datos nos han permitido además, elaborar un nuevo estudio en el que se están analizando más de 40 fármacos antitumorales de forma individual y en combinación con

Ruxolitinib, tanto en células de pacientes como en modelos celulares. Para ello se está aplicando la tecnología desarrollada por la compañía Vivia Biotech. Con esta aproximación no solo pretendemos caracterizar mejor los posibles efectos sinérgicos del nuevo inhibidor de JAK2, sino desarrollar un método de selección del tratamiento óptimo para cada paciente de forma individual.



## ***VII. CONCLUSIONES***



1. Mediante las técnicas de cribado utilizadas, se demuestra que los perfiles de expresión molecular global en las neoplasias mieloproliferativas philadelphia negativas (NMP) son muy homogéneos y similares a los de donantes control no enfermos. Esto indica que las alteraciones moleculares en estas patologías deben de ser puntuales, sin afectar de forma global al epigenoma, genoma, o proteoma de las mismas.
2. Estas aproximaciones, sin embargo, han permitido definir una serie de candidatos moleculares que pueden justificar las diferencias fisiopatogénicas y los mecanismos de respuesta/resistencia molecular en estas patologías. Estos candidatos pueden ser empleados como futuras dianas terapéuticas.
3. ZNF577, posible gen supresor de tumores, se encuentra silenciado por hipermetilación en el 75% de los casos de Policitemia Vera estudiados. La inhibición mediante ARNi es una buena aproximación para caracterizar su funcionalidad.
4. La inhibición de las cascadas de señalización celular MAPK con Sorafenib, de la vía PI3K/AKT con Perifosine, y de las tirosinas quinasas de la familia SRC con Dasatinib, presenta unos efectos antitumorales similares al Ruxolitinib. La inhibición de HSP70 con KNK437 disminuye la expresión de la proteína JAK2. El empleo de estos compuestos puede ser beneficioso para el manejo de casos que no respondan a Ruxolitinib.
5. El Sorafenib, el KNK437 y el Dasatinib, presentan un fuerte efecto sinérgico con Ruxolitinib. Este efecto puede deberse en la confluencia de todas las vías estudiadas en STAT5, por lo que está justificado su futuro estudio dentro de ensayos clínicos en combinación.
6. Pese a que la población estudiada no ha permitido definir un modelo de respuesta a los diferentes fármacos, sí existe una tendencia a que los enfermos con mutación del gen JAK2 sean más sensibles a estos tratamientos moleculares.



## *VIII. BIBLIOGRAFÍA*

1. Ronald, H., *Hematology. Basic Principles and Practice*. 3rd Edition ed. 2000: Churchill Livingstone.
2. Miyajima, A., Y. Ito, and T. Kinoshita, *Cytokine signaling for proliferation, survival, and death in hematopoietic cells*. *Int J Hematol*, 1999. **69**(3): p. 137-46.
3. de Graaf, C.A. and D. Metcalf, *Thrombopoietin and hematopoietic stem cells*. *Cell Cycle*. **10**(10): p. 1582-9.
4. Dameshek, W., *Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes*. *Blood*, 1951. **6**(4): p. 372-375.
5. Baxter, E.J., et al., *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*. *Lancet*, 2005. **365**(9464): p. 1054-61.
6. Tefferi, A., et al., *Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel*. *Blood*, 2007. **8**: p. 8.
7. Goldman, J.M., et al., *Chronic myeloproliferative diseases with and without the Ph chromosome: some unresolved issues*. *Leukemia*, 2009.
8. Vannucchi, A.M. and P. Guglielmelli, *Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations*. *Haematologica*, 2008. **93**(7): p. 972-6.
9. James, C., et al., *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera*. *Nature*, 2005. **434**(7037): p. 1144-8.
10. Tefferi, A., *Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management*. *Am J Hematol*. **87**(3): p. 285-93.
11. Jamieson, C.H.M., et al., *The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(16): p. 6224-6229.
12. Akerblom, L., et al., *Overproduction of the free radical of ribonucleotide reductase in hydroxyurea-resistant mouse fibroblast 3T6 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(4): p. 2159-63.
13. Harrison, C.N., et al., *Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(1): p. 33-45.
14. Barosi, G., et al., *A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group*. *Leukemia*, 2007. **21**(2): p. 277-80.
15. Finazzi, G., et al., *Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2664-70.
16. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. *Gene*, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
17. Rodig, S.J., et al., *Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biological responses*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 373-83.

18. Fridman, J.S., et al., *Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050*. J Immunol, 2012. **184**(9): p. 5298-307.
19. Brown, M.P., et al., *Reconstitution of early lymphoid proliferation and immune function in Jak3-deficient mice by interleukin-3*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1906-14.
20. McCubrey, J.A., et al., *Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 708-22.
21. Saharinen, P., K. Takaluoma, and O. Silvennoinen, *Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3387-95.
22. Haan, C., et al., *Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1538-46.
23. Funakoshi-Tago, M., et al., *Jak2 FERM domain interaction with the erythropoietin receptor regulates Jak2 kinase activity*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(5): p. 1792-801.
24. Ihle, J.N., *Cytokine receptor signalling*. Nature, 1995. **377**(6550): p. 591-4.
25. Schwaller, J., et al., *Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 693-704.
26. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
27. Seubert, N., et al., *Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1239-50.
28. Huang, L.J., S.N. Constantinescu, and H.F. Lodish, *The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1327-38.
29. Neubauer, H., et al., *Jak2 Deficiency Defines an Essential Developmental Checkpoint in Definitive Hematopoiesis*. Cell, 1998. **93**(3): p. 397.
30. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 378-87.
31. Kile, B.T., et al., *The SOCS box: a tale of destruction and degradation*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(5): p. 235-41.
32. Rakesh, K. and D.K. Agrawal, *Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(5): p. 649-57.
33. Oka, T., et al., *Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6390-4.
34. Zhang, Q., et al., *STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(19): p. 6948-53.
35. Chim, C.S., et al., *SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4630-5.

36. Irie-Sasaki, J., et al., *CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 349-54.
37. Ugo, V., et al., *Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera*. Exp Hematol, 2004. **32**(2): p. 179-87.
38. Sivertsen, E.A., et al., *PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells*. Br J Haematol, 2006. **135**(1): p. 117-28.
39. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
40. Lenormand, P., et al., *Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins*. J Cell Biol, 1998. **142**(3): p. 625-33.
41. Adachi, M., M. Fukuda, and E. Nishida, *Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism*. J Cell Biol, 2000. **148**(5): p. 849-56.
42. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.
43. Pellagatti, A., et al., *Gene expression profiling in polycythemia vera using cDNA microarray technology*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 3940-4.
44. Schwemmers, S., et al., *JAK2V617F-negative ET patients do not display constitutively active JAK/STAT signaling*. Experimental Hematology, 2007. **35**(11): p. 1695.
45. Desterke, C., et al., *FLT3-mediated p38-MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis*. Cancer Res. **71**(8): p. 2901-15.
46. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
47. Shaw, R.J. and L.C. Cantley, *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 424-30.
48. Shayesteh, L., et al., *PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 99-102.
49. Jimenez, C., et al., *Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase*. EMBO J, 1998. **17**(3): p. 743-53.
50. Shide, K., et al., *Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 87-95.
51. Parsons, S.J. and J.T. Parsons, *Src family kinases, key regulators of signal transduction*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7906-9.
52. Silva, C.M., *Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 8017-23.
53. Summy, J.M. and G.E. Gallick, *Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1398-401.

54. Albizua, E., et al., *Differential expression of JAK2 and Src kinase genes in response to hydroxyurea treatment in polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Ann Hematol. **90**(8): p. 939-46.
55. Lombardo, L.J., et al., *Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays*. J Med Chem, 2004. **47**(27): p. 6658-61.
56. Chin, H., et al., *Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3734-45.
57. Tundwal, K. and R. Alam, *JAK and Src tyrosine kinase signaling in asthma*. Front Biosci. **17**: p. 2107-21.
58. Wappler, M., et al., *Dasatinib inhibits progenitor cell proliferation from polycythaemia vera*. Eur J Clin Invest, 2008. **38**(8): p. 578-84.
59. Kralovics, R., et al., *Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3374-6.
60. Romanucci, M., T. Bastow, and L. Della Salda, *Heat shock proteins in animal neoplasms and human tumours--a comparison*. Cell Stress Chaperones, 2008. **13**(3): p. 253-62.
61. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(6): p. 670-84.
62. Fiskus, W., et al., *Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(23): p. 7347-58.
63. Baselga, J. and C.L. Arteaga, *Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(11): p. 2445-59.
64. Zhang, J., P.L. Yang, and N.S. Gray, *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 28-39.
65. Sawyers, C.L., *Even better kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med. **362**(24): p. 2314-5.
66. Shah, N.P., et al., *Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 117-25.
67. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
68. Sergina, N.V., et al., *Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3*. Nature, 2007. **445**(7126): p. 437-41.
69. Stommel, J.M., et al., *Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies*. Science, 2007. **318**(5848): p. 287-90.
70. Mascarenhas, J. and R. Hoffman, *Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis*. Clin Cancer Res. **18**(11): p. 3008-14.

71. Tenedini, E., et al., *Gene expression profiling of normal and malignant CD34-derived megakaryocytic cells*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3126-35.
72. Martin-Subero, J.I., et al., *A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6986.
73. Tallarida, R.J., *Drug synergism: its detection and applications*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 865-72.
74. Raffa, R.B., D.J. Stone, Jr., and R.J. Tallarida, *Unexpected and pronounced antinociceptive synergy between spinal acetaminophen (paracetamol) and phentolamine*. Eur J Pharmacol, 2001. **412**(2): p. R1-2.
75. Chou, T.C. and P. Talalay, *Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors*. Eur J Biochem, 1981. **115**(1): p. 207-16.
76. Vannucchi, A.M., P. Guglielmelli, and A. Tefferi, *Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(3): p. 171-91.
77. Barosi, G., et al., *Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference*. Blood, 2009. **113**(20): p. 4829-33.
78. Gallardo, M., *Divergencias genéticas y proteómicas en la fisiopatogenia de las neoplasias mieloproliferativas (NMP)*, in *Medicina interna*. 2011, UCM: Madrid.
79. Klippel, S., et al., *Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis*. Blood., 2003. **102**(10): p. 3569-74. Epub 2003 Jul 31.
80. Fourouclas, N., et al., *Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders*. Haematologica, 2008. **93**(11): p. 1635-44.
81. Teofili, L., et al., *Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases*. Int J Cancer, 2008. **123**(7): p. 1586-92.
82. Chim, C.S., T.K. Fung, and R. Liang, *Methylation of cyclin-dependent kinase inhibitors, XAF1, JUNB, CDH13 and soluble Wnt inhibitors in essential thrombocythaemia*. J Clin Pathol. **63**(6): p. 518-21.
83. Chim, C.S., et al., *Methylation of TET2, CBL and CEBPA in Ph-negative myeloproliferative neoplasms*. J Clin Pathol. **63**(10): p. 942-6.
84. Gotze, K., et al., *Azacitidine for treatment of patients with myelodysplastic syndromes (MDS): practical recommendations of the German MDS Study Group*. Ann Hematol. **89**(9): p. 841-50.
85. Guerini, V., et al., *The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F)*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 740-7.
86. Mithraprabhu, S., et al., *Deactylase inhibition in myeloproliferative neoplasms*. Invest New Drugs. **28 Suppl 1**: p. S50-7.
87. Rambaldi, A., et al., *A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms*. Br J Haematol. **150**(4): p. 446-55.

88. Bogani, C., et al., *Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis*. Stem Cells, 2008. **26**(8): p. 1920-30.
89. Capello, D., et al., *Epigenetic inactivation of suppressors of cytokine signalling in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders*. Br J Haematol, 2008. **141**(4): p. 504-11.
90. Zhang, S.J. and O. Abdel-Wahab, *Disordered epigenetic regulation in the pathophysiology of myeloproliferative neoplasms*. Curr Hematol Malig Rep, 2011. **7**(1): p. 34-42.
91. Palmer, D.C. and N.P. Restifo, *Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function*. Trends Immunol, 2009. **30**(12): p. 592-602.
92. Urrutia, R., *KRAB-containing zinc-finger repressor proteins*. Genome Biol, 2003. **4**(10): p. 231.
93. Lin, L.F., et al., *ZBRK1 acts as a metastatic suppressor by directly regulating MMP9 in cervical cancer*. Cancer Res. **70**(1): p. 192-201.
94. Maher, C.A., et al., *Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer*. Nature, 2009. **458**(7234): p. 97-101.
95. Barrio, S., et al., *Epigenomic profiling in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia shows low levels of aberrant DNA methylation*. J Clin Pathol. **64**(11): p. 1010-3.
96. Zaleskas, V.M., et al., *Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F*. PLoS One, 2006. **1**: p. e18.
97. Girodon, F., et al., *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**(11): p. 1723-7.
98. Quintas-Cardama, A., et al., *Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms*. Blood, 2011. **115**(15): p. 3109-17.
99. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
100. Eghtedar, A., et al., *Phase 2 study of the JAK kinase inhibitor Ruxolitinib in patients with refractory leukemias, including postmyeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemia*. Blood. **119**(20): p. 4614-8.
101. Morgillo, F., et al., *Antitumor activity of Sorafenib in human cancer cell lines with acquired resistance to EGFR and VEGFR tyrosine kinase inhibitors*. PLoS One. **6**(12): p. e28841.
102. Fecteau, J.F., et al., *Sorafenib-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells is associated with downregulation of RAF and myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1)*. Mol Med. **18**(1): p. 19-28.
103. Song, J., M. Takeda, and R.I. Morimoto, *Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 276-82.

104. Yang, Y., et al., *Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4833-42.
105. Madamanchi, N.R., et al., *Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(3): p. 321-6.
106. Lurie, L.J., et al., *Differential GATA factor stabilities: implications for chromatin occupancy by structurally similar transcription factors*. *Biochemistry*, 2008. **47**(3): p. 859-69.
107. Dame, C., et al., *Developmental changes in the expression of transcription factors GATA-1, -2 and -3 during the onset of human medullary haematopoiesis*. *Br J Haematol*, 2002. **119**(2): p. 510-5.
108. Vasikova, A., et al., *A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome*. *Leuk Res*. **34**(12): p. 1566-72.
109. Yeh, C.H., et al., *Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia*. *Leuk Res*. **34**(5): p. 605-9.
110. Marubayashi, S., et al., *HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans*. *J Clin Invest*. **120**(10): p. 3578-93.
111. Ebong, I.O., et al., *Heterogeneity and dynamics in the assembly of the Heat Shock Protein 90 chaperone complexes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(44): p. 17939-44.
112. Dai, C., I.J. Chung, and S.B. Krantz, *Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(2): p. 152-8.
113. Kamishimoto, J., et al., *Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation*. *Cell Signal*. **23**(5): p. 849-56.
114. Nagao, T., et al., *DNA damage stress and inhibition of Jak2-V617F cause its degradation and synergistically induce apoptosis through activation of GSK3beta*. *PLoS One*. **6**(11): p. e27397.
115. Pal, S.K., et al., *Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer*. *Expert Opin Investig Drugs*. **19**(11): p. 1355-66.
116. Shah, N.P., et al., *Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor*. *Science*, 2004. **305**(5682): p. 399-401.
117. Snead, J.L., et al., *Acute Dasatinib exposure commits Bcr-Abl-dependent cells to apoptosis*. *Blood*, 2009. **114**(16): p. 3459-63.
118. Okutani, Y., et al., *Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signaling pathway*. *Oncogene*, 2001. **20**(45): p. 6643-50.
119. Madoux, F., et al., *Modulators of STAT Transcription Factors for the Targeted Therapy of Cancer (STAT3 Inhibitors)*.
120. Debnath, B., S. Xu, and N. Neamati, *Small Molecule Inhibitors of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) Protein*. *J Med Chem*.

121. Page, B.D., et al., *Small molecule STAT5-SH2 domain inhibitors exhibit potent antileukemia activity.* J Med Chem. **55**(3): p. 1047-55.
122. Wang, Y., et al., *Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic effects against human myeloproliferative neoplastic cells.* Blood, 2009. **114**(24): p. 5024-33.
123. Weigert, O., et al., *Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition.* J Exp Med. **209**(2): p. 259-73.



*ANEXOS*



## ***ÍNDICE DE FIGURAS***

Figura 1: Hematopoyesis.....	28
Figura 2: Diferenciación Eritroide. ....	29
Figura 3: Diferenciación Megacariocítica.....	30
Figura 4: Dominios comunes a las proteínas de la familia Janus quinasa.....	37
Figura 5: Principales vías de señalización relacionadas con JAK.....	39
Figura 6: Proteínas pertenecientes a las vías MAPK.....	42
Figura 7: Señalización mediada por AKT. ....	44
Figura 8: Interacción de las SRC con las principales vías de señalización celular. ....	45
Figura 9: Conversión del ADN con bisulfito. ....	63
Figura 10. Esquema de identificación de la metilación. ....	64
Figura 11: Mapa de frecuencias de valor $\beta$ en las diferentes poblaciones estudiadas. ....	64
Figura 12: Diagrama de flujo del diseño experimental seguido en el análisis de expresión génica. ....	66
Figura 13: Tosilato de Sorafenib.....	67
Figura 14: Estructura química del Perifosine.....	68
Figura 15: Estructura química del Dasatinib.....	68
Figura 16: Estructura de inhibidor de HSP70 KNK437.....	69
Figura 17: Estructura química del Ruxolitinib.....	69
Figura 18: Clúster jerárquico y Heat map de los valores de metilación.....	79
Figura 19: Valores de $\beta$ para ZNF577.....	81
Figura 20: Expresión de ZNF577.....	82

Figura 21: Efectos de la transformación de las líneas BAF3 JAK2 V617F y BAF3 JAK2 WT con ARNi ZNF577. ....	83
Figura 23: Expresión diferencial de los genes: JAK2, MAPK14, PIK3CA y FCER1G e .....	85
Figura 24: Acción del Ruxolitinib sobre los cultivos de células mononucleadas. ....	88
Figura 25: A. Efectos del Ruxolitinib.....	89
Figura 26: Acción del Ruxolitinib en células CD34.....	90
Figura 27: Efectos del Sorafenib sobre las líneas celulares estudiadas. ....	90
Figura 28: Efectos sinérgicos del Ruxolitinib y Sorafenib en las líneas celulares.....	91
Figura 29: Representación de los coeficientes de sinérgicos del Sorafenib y Ruxolitinib	92
Figura 30: Acción del Sorafenib sobre los cultivos de células mononucleadas.....	93
Figura 31: Efecto del Sorafenib en células madre CD34 positivas. ....	93
Figura 32: Efectos sinérgicos del Sorafenib y el Ruxolitinib en células mononucleadas	94
Figura 33: Efectos del Sorafenib a 10nM sobre los cultivos de colonias .....	94
Figura 34: Inmunofenotipado de los efectos del Sorafenib en cultivos de colonias eritroides. ....	95
Figura 35: Resultados del análisis de por CBAs de los cultivos de colonias eritroides tratadas con Sorafenib.....	96
Figura 36: Western blot de las proteínas de la línea HEL tratadas con diferentes concentraciones de Ruxolitinib y Sorafenib .....	96
Figura 37: Efectos del KNK437 sobre las líneas celulares estudiadas.....	97
Figura 38: Efectos sinérgicos del Ruxolitinib y KNK437 en las líneas celulares .....	97
Figura 39: Análisis de los efectos del KNK437, solo o con Ruxolitinib en cultivos de la línea celular BA/F3 .....	98

Figura 40: Efectos sinérgicos del KNK437 y el Ruxolitinib en células mononucleadas procedentes de 3 casos de PV.....	99
Figura 41: Acción del Perifosine sobre los cultivos de células mononucleadas. (A y B, contaje de colonias. C y D viabilidad celular). .....	100
Figura 42: Inmunofenotipado de los efectos de Perifosine en cultivos de colonias eritroides, .....	101
Figura 43: Efecto del Perifosine en células madre CD34 positivas.....	101
Figura 44: Efectos del Dasatinib sobre las líneas celulares estudiadas.....	102
Figura 45: Efectos del Dasatinib sobre los modelos secundarios.....	103
Figura 46: Efectos sinérgicos del Ruxolitinib y KNK437 en las líneas celulares. ....	103
Figura 47: Acción del Dasatinib sobre los cultivos de células mononucleadas.....	104
Figura 48: Disminución del número de colonias eritroides en el tratamiento con Dasatinib.....	104
Figura 49: Inmunofenotipado de los efectos de Dasatinib en cultivos de colonias eritroides .....	105
Figura 50: Efecto del Dasatinib en células madre CD34 positivas. ....	106
Figura 51: Efectos sinérgicos del Dasatinib y el Ruxolitinib en células mononucleadas procedentes de 3 casos de PV.....	107
Figura 52: Western blot de las proteínas de la línea BAF3 JAK2 V617F tratadas con diferentes concentraciones de Ruxolitinib y Dasatinib.....	108
Figura 53. Análisis de la respuesta a los distintos fármacos en función de las variables clínicas y biológicas recogidas.....	110
Figura 54 Modelo de acción de nuestros fármacos sobre las cascadas de señalización estudiadas .....	119



## ***ÍNDICE DE TABLAS***

Tabla 1: Criterios diagnósticos de la PV según la WHO 2008. ....	32
Tabla 2: Definición de la Respuesta Clínico hematológica en Policitemia Vera (PV) según el European Leukemia Net 2009. ....	33
Tabla 3: Criterios diagnósticos WHO 2008. Trombocitemia esencial .....	35
Tabla 4: Definición de Respuesta Clínico hematológica en Trombocitemia Esencial (TE) ELN 2009. ....	36
Tabla 5: Características clínicas y de laboratorio en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio de expresión génica. ....	60
Tabla 6: Datos clínicos estudios funcionales .....	61
Tabla 7: Anticuerpos utilizados en citometría de flujo .....	74
Tabla 8: Valores $\beta$ de los genes de la familia SOCS. ....	80
Tabla 9: Resultados de los analisis de expresion .....	1
Tabla 10 : IC50 y Coeficiente Sinérgico para los diferentes compuestos. ....	109



## ***LISTADO DE PUBLICACIONES***

- Gallardo M, **Barrio S**, Toldos O, Ayala R, Albizua E, Jimenez A, Garcia-Martin R M, Redondo S, Bellosillo B, Garcia V, Hernandez J A, Fernandez-Devora F, Gilsanz F, Martinez-Lopez J. Implication of metallo-proteases in MPN: CD44, a novel biomarker of ET JAK2<sup>V617F</sup> negative. In preparation.
- **Barrio S**, Gallardo M, Arenas A, Ayala R, Albizua E., Jimenez A., Hernandez J. A., Gilsanz F., Martinez-Lopez J. Inhibition of related JAK/STAT pathways with molecular targeted drugs shows strong synergy with ruxolitinib in chronic myeloproliferative neoplasm Leukemia 2012 (Submitted).
- Gallardo M., Fernandez M., Paradela A., **Barrio S**., Toldos O., Ayala R., Albizua E., Jiménez A., Redondo S., Garcia-Martin R., Gilsanz F., Albar J.P., Martinez-Lopez J. Proteomic analysis reveals HSP70 has a key role in polycythemia vera. Molecular Cancer Therapeutics 2012 (Accepted).
- **Barrio S**, Gallardo M, Albizua E, Jimenez A, Rapado I, Ayala R, Gilsanz F, Martin-Subero JI, Martinez-Lopez J. Epigenomic profiling in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia shows low levels of aberrant DNA methylation. Journal Clinical Pathology 2011. 64(11):1010-3
- Albizua E., Gallardo M., **Barrio S**., Rapado I., Jiménez A., Ayala R., Rueda D., Sanchez-Espiridion B., Puigdecenet E., Espinet B., Florensa L., Besses C., Martinez-Lopez J. Differential expression of JAK2 and Src kinase genes in response to hydroxyurea treatment in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Annals of Hematology 2011. 90(8):939-46
- Albizua E., Gallardo M., Jiménez A., **Barrio S**., Martinez-Lopez J. Policitemia Vera: cuadro clínico, diagnostico y tratamiento en la era JAK2. Jano. Review. 2010. 1766: 63-69.



## **COMUNICACIONES EN CONGRESOS**

### **Oral**

- **Barrio S.**, Arenas A., Gallardo M., Ayala R., Jimenez A., Hernandez J. A., Gilsanz F., Martinez-Lopez J. Efectos sinérgicos del Ruxolitinib con Dasatinib, Sorafenib y KNK437 en Neoplasias mieloproliferativas philadelphia negativas. LIV AEHH National Reunion. Salamanca 2012. CO-27.
- Gallardo M., **Barrio S.**, Ayala R., et al. CD44 y MMP14 juegan un importante rol en la diferenciación eritroide en la policitemia vera y la trombocitemia esencial. LIII AEHH National Reunion. Zaragoza 2011. CO-027.
- **Barrio S.**, Gallardo M., Albizua E., et al. El perfil de metilación de DNA en neoplasias mieloproliferativas no muestra diferencias entre Policitemia Vera y Trombocitemia Esencial. LII AEHH National Reunion. Las Palmas 2010. CO-100.
- M. Gallardo, **S. Barrio**, E. Albizua, et al. Perfil de expresión génica asociada a la falta de respuesta a Hidroxiurea de neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) JAK2V617F positivas. LI AEHH National Reunion. Barcelona 2009. CO-095
- E. Albizua, M. Gallardo, **S. Barrio**, et al. Implicación de la vía MAPkinasa y de PGDFR/JAK-STAT en la Fisiopatogenia de la Trombocitemia Esencial. L AEHH National Reunion. Murcia 2008.

### **Poster (selección)**

- **Barrio S.**, Arenas A, Gallardo M., Ayala R, Jimenez A., Hernandez J. A, Gilsanz F., Martinez-Lopez J. Inhibition of Related JAK/STAT Pathways with Molecular Targeted Drugs Shows Strong Synergy with Ruxolitinib in Chronic Myeloproliferative Neoplasms 54th ASH Annual Meeting and Exposition ID: 48734 (Submitted)
- **S. Barrio**, M Gallardo, R. Ayala, et al. Análisis funcional de las principales vías proliferativas regidas por JAK2 en células primarias de neoplasias mieloproliferativas crónicas. LIII AEHH National Reunion. Zaragoza 2011.
- M. Gallardo, **S. Barrio**, E. Albizua, et al. Protein profile in chronic myeloproliferative neoplasms (MPN). SEPROT Segovia 2011.

- M. Gallardo, **S. Barrio**, R Ayala et al. Role of metalloproteases in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia erythroid differentiation. 16th congress of EHA. London 2011.
- E Albizua, M Gallardo, **S Barrio**, et al. Differential gene expression profile related to leukocytosis in JAK2 V617F positive Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. 16th congress of EHA. London 2011.
- Gallardo M, Fernandez M, Paradela A, Toldos O, Garcia-Martin R, **Barrio S**, Ayala R, Albizua E, Rapado I, Jimenez A, Candelas M, Gilsanz F, Martinez-Lopez J. Proteomic analysis identifies HSP70 as a novel target therapy to polycythemia vera. Blood (ASH 2011)
- **S. Barrio**, M. Gallardo, E. Albizua, et al. Epigenetic profile of Myeloproliferative Neoplasms shows no aberrant methylation pattern in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. 15th congress of EHA. Barcelona 2010.
- **S. Barrio**, I. Lopez, K. Marin, M. et al. Role of ribosomal genes in myelodysplastic syndromes evolution to acute myeloid leukaemia. 15th congress of EHA. Barcelona 2010.
- M. Gallardo, **S. Barrio**, E. Albizua, et al. Gene expression profile in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) under treatment with Hydroxyurea. 15th congress of EHA. Barcelona 2010
- **S. Barrio**, K. Marin, I. Lopez, et al. Papel de los genes ribosomales RPS4 RPL28 y EE1D en la evolución de síndromes mielodisplásicos a leucemia mieloide aguda. LI AEHH National Reunion. Barcelona 2009.

# Epigenomic profiling in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia shows low levels of aberrant DNA methylation

S Barrio,<sup>1</sup> M Gallardo,<sup>1</sup> E Albizua,<sup>1,2</sup> A Jimenez,<sup>1</sup> I Rapado,<sup>1</sup> R Ayala,<sup>1,3</sup> F Gilsanz,<sup>1,3</sup> J I Martin-Subero,<sup>4</sup> J Martinez-Lopez<sup>1,3</sup>

► An additional figure is published online only. To view this file please visit the journal online (<http://jcp.bmj.com>).

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

<sup>3</sup>Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Anatomic Pathology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Correspondence to

J Martinez-Lopez, Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain; [jmartinezlo@hematologia12octubre.com](mailto:jmartinezlo@hematologia12octubre.com)

Accepted 20 June 2011  
Published Online First  
6 August 2011

## ABSTRACT

**Aims** The purpose of this study was to compare the DNA-methylation signature in classic chronic Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPN), polycythaemia vera (PV) and essential thrombocythaemia (ET), in order to obtain a global insight into DNA-methylation changes associated with these malignancies.

**Methods** Thirty-five MPN samples from 11 ET JAK2 V617F, 12 ET JAK2 wild type (WT) and 12 PV JAK2 V617F patients as well as 12 from healthy donors were analysed. DNA samples extracted from whole peripheral blood were hybridised to the 'HumanMethylation27 DNA Analysis BeadChip.'

**Results** All groups showed a very homogeneous methylation pattern. Only the ZNF577 gene showed a differential methylation profile between PV JAK2 V617F positive and controls. This aberrant methylation was correlated with a differential gene expression of ZNF577. No aberrant hypermethylation was found in the SOCS-1 and SOCS-3 genes.

**Conclusions** According to our results, an aberrant methylation pattern does not seem to play a crucial role in MPN pathogenesis; nor does it justify phenotypical differences between PV and ET.

JAK2 V617F MPN. Novel mutations have been found, though none of them specific of MPN. In addition, postgenomic abnormalities as well as polymorphisms may contribute to phenotypic divergence. Nonetheless many aspects of the pathogenesis of these entities remain unknown.<sup>5,6</sup>

In these malignancies, different epigenetic abnormalities have been described. ITF2357, a novel histone deacetylase (HDAC) inhibitor with anti-tumour activity, was assayed on cells carrying the JAK2 V617F mutation obtained from PV, ET<sup>7</sup> and PMF.<sup>8</sup> As a consequence, a phase II study has been conducted to evaluate the safety and efficacy of ITF2357 in MPN.<sup>9</sup>

An aberrant methylation of individual genes has also been found in MPN. The differential methylation pattern of the suppressors of cytokine signalling (SOCS) genes may contribute to the pathogenesis and differential phenotype of these neoplasias. Teofili *et al* found that SOCS-1 or SOCS-3 hypermethylation can activate the JAK/STAT signalling pathway as an alternative, or together with JAK2 mutations.<sup>10</sup> Hypermethylation of a further gene, CXCR4, down-regulated in primary myelofibrosis, has been found to contribute to the migration of CD34 cells in this disease.<sup>11</sup>

The objective of the present study was to obtain a global insight into DNA-methylation changes associated with PV and ET through a microarray-based DNA methylation assay, in order to improve our knowledge on their pathogenesis.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

A total of 35 samples from classic chronic Ph-negative MPN patients including 11 ET JAK2 V617F, 12 ET JAK2 WT and 12 PV JAK2 V617F, as well as 12 peripheral blood samples from healthy donors were analysed in the present study. Diagnosis were established according to WHO criteria.<sup>12</sup> Out of 35 patients (21 women/14 men), with a mean age of 59.5 years (range: 34–78), three of them presented thrombotic events at diagnosis. The mean platelet count ( $\times 10^9/l$ ) was 421 (201–1328) in PV and 747.5 (455–1896) in ET. The haemoglobin (gr/dl) was 18.7 (17.5–21.7) in PV and 14.8 (11.9–16.2) in ET. Six PV and three ET cases had leucocytosis ( $>12.5 \times 10^6$  leucocytes/l) at diagnosis. The mean leucocyte count ( $\times 10^9/l$ ) in PV was 12.4, range 8–20.1, and in ET 4.8, range 4.8–13.7. All MPN samples contained over 70% of neutrophils.

## INTRODUCTION

Alterations in the epigenetic code, which comprises reversible modifications that affect gene expression without altering the DNA sequence itself, are a molecular hallmark of haematological malignancies.<sup>1</sup> The best-studied epigenetic change is the hypermethylation of tumour suppressor genes, reported to be associated with gene inactivation, while the importance of epigenetics in haematological malignancies is underlined by the use of DNA-demethylating agents to treat myeloid disorders.<sup>2</sup>

BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) including polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are characterised by a clonal expansion of a multipotent haematopoietic progenitor cell.<sup>3</sup> JAK2 V617F mutation results in a constitutive activation of JAK/STAT signalling and occurs in about half of the patients with ET and PMF, and in more than 90% of those with PV.<sup>4</sup> Despite its extraordinary importance, recent studies have demonstrated that JAK2 V617F is neither the sole event nor even sufficient, nor probably the first molecular event in

## Differential expression of JAK2 and Src kinase genes in response to hydroxyurea treatment in polycythemia vera and essential thrombocythemia

Enriqueta Albizua · Miguel Gallardo · Santiago Barrio · Inmaculada Rapado · Ana Jimenez · Rosa Ayala · Daniel Rueda · Beatriz Sanchez-Espiridion · Eulalia Puigdecenet · Blanca Espinet · Lourdes Florensa · Carles Besses · Joaquin Martínez-Lopez

Received: 10 December 2010 / Accepted: 31 January 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** This study investigates the differential gene expression profile of JAK2<sup>V617F</sup>-positive myeloproliferative neoplasm (MPN) patients, with and without response to hydroxyurea (HU) treatment. Twenty-one polycythemia vera, 28 essential thrombocythemia, eight secondary erythrocytosis, and 30 controls were studied. Thirty-four genes were overexpressed in patients who did not respond to HU. Of these, some participate in proliferative pathways: MAPK, AKT, Src kinase (SFK), and JAK2 pathway. JAK2 allele burden was similar between groups of responders and nonresponder. A molecular fingerprint distinguishes JAK2<sup>V617F</sup>-positive MPN

patients without response to HU treatment, with overexpression of JAK2, MAPK14, PIK3CA, and SFK genes.

**Keywords** Polycythemia vera · Essential thrombocythemia · Gene expression profile · RT-PCR · Response to hydroxyurea · JAK2 · Src family kinase (SFK)

### Introduction

The discovery of the JAK2<sup>V617F</sup> point mutation has become a hallmark in the diagnosis of the classic chronic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) namely, polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) [1]. As a result, WHO diagnostic criteria were revised in 2007, and JAK2 mutations and MPL mutations were included as major criteria for the diagnosis of PV, ET, and PMF [2]. Moreover, the JAK2<sup>V617F</sup> allele burden has been included in response criteria for PV and ET by a recent European Leukaemia Net (ELN) consensus conference [3]. Despite the fact that JAK2<sup>V617F</sup> has facilitated the diagnosis of MPN and improved our knowledge on their pathogenesis, there are still a number of unanswered questions [4].

Although formerly believed to be a single-step process, recent evidence has shown that the JAK2<sup>V617F</sup> mutation is neither the sole, nor sufficient molecular event, responsible for MPN. It may also not be the initial one, and other somatic mutations may precede JAK2<sup>V617F</sup> [5–7]. There is evidence of clonal heterogeneity and presence of different mutations in the same patient [8, 9].

The current first line of treatment for PV and ET patients with a high risk of thrombosis is still hydroxyurea (HU) [10]. The cytoreductive activity of HU is based on its anti-

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00277-011-1179-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Albizua · M. Gallardo · S. Barrio · I. Rapado · A. Jimenez · R. Ayala · D. Rueda · J. Martínez-Lopez (✉)  
Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain  
e-mail: jmartinezlo@yahoo.es

E. Albizua  
Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

B. Sanchez-Espiridion  
Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

E. Puigdecenet · B. Espinet · L. Florensa  
Laboratori de Citologia Hematològica/Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, GRETNHE, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

C. Besses  
Servicio de Hematología, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

## **Inhibition of related JAK/STAT pathways with molecular targeted drugs shows strong synergy with ruxolitinib in chronic myeloproliferative neoplasm**

Santiago Barrio<sup>1</sup>, Miguel Gallardo<sup>1-2</sup>, Alicia Arenas<sup>1</sup>, Rosa Ayala<sup>1</sup>, Inmaculada Rapado<sup>1</sup>, Daniel Rueda<sup>1</sup>, Ana Jimenez<sup>1</sup>, Enriqueta Albizua<sup>1-3</sup>, Carmen Burgaleta<sup>4</sup>, Florinda Gilsanz<sup>1</sup> and Joaquin Martinez-Lopez<sup>1</sup>.

### **Author affiliations:**

<sup>1</sup>Hematology Service, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Department of Leukemia, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX.

<sup>3</sup>Hematology Service, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.

<sup>4</sup>Hospital Principe de Asturias. Alcala de Henares, Madrid, Spain

Corresponding authors: Joaquin Martinez-Lopez and Santiago Barrio

[jmartinezlo@hematologia12octubre.com](mailto:jmartinezlo@hematologia12octubre.com), [santibarrío0.3@gmail.com](mailto:santibarrío0.3@gmail.com)

Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Av/ Cordoba s/n

28041 Madrid, Spain. Phone and Fax: 0034+91 3908495