



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

**“DETERMINANTES CELULARES, PLASMÁTICOS Y
GENÉTICOS DE RIESGO DE TROMBOSIS Y
HEMORRAGIA EN PACIENTES CON NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS FILADELFIA
NEGATIVO”**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía por la Universidad de Murcia

M^a José Moreno Belmonte

2010

Abreviaturas

AA	Ácido Araquidónico
AAS	Aspirina
ACV	Accidente cerebro-vascular
ADN	Ácido dexosirribonucleico
AIT	Accidente isquémico transitorio
ARSA-T	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis
CECE	Crecimiento endógeno de colonias eritroides
CEE	Colonias eritroides endógenas
c-MPL	Receptor de Trombopoyetina
DM	Diabetes Mellitus
ECLAP	European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (Colaboración Europea de bajas dosis de aspirina en Policitemia Vera)
EPO	Eritropoyetina
EPO-R	Receptor de eritropoyetina
EvW	Enfermedad de Von Willebrand
FAG	Fosfatasa alcalina granulocítica
EGF	Epidermic growth factor (Factor de crecimiento epidérmico)
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos)
FT	Factor Tisular
FvW	Factor von Willebrand
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos

GP	Glicoproteínas
Hb	Hemoglobina
HTA	Hipertensión arterial
IAM	Infarto agudo de miocárdio
IFMc	Intensidad de fluorescencia media corregida
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 (Factor de crecimiento similar a la insulina 1)
IL-3	Interleucina 3
IRP	Índice de reactividad plaquetaria
IWG-MRT	International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (Grupo internacional de trabajo para el estudio y tratamiento de la Mielofobrosis)
LAM	Leucemia Aguda Mieloblástica
LDH	Lactato deshidrogenasa sérica
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LPS	Lipopolisacárido
MFP	Mielofibrosis Primaria
MPD-RC	Myeloproliferative Diseases-Research Consortium (Consortio para la investigación en enfermedades mieloproliferativas)
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NMPc	Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGF	Platelet-derived growth factor (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)

PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor A (Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas)
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor B (Receptor beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas)
PGE₁	Prostaglandina E ₁
PFA	Platelet function analyzer (Analizador de función plaquetaria)
Ph	Filadelfia
PMN	Polimorfonucleares
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand (Ligando de la selectina-P)
PT	Protrombina
PV	Policitemia Vera
PVSG	Polycythaemia Vera Study Group (Grupo de estudio en Policitemia Vera)
SCF	Stem Cell Factor (Factor de crecimiento de células madre pluripotentes)
SMD	Síndromes Mielodisplásicos
SMPc	Síndromes Mieloproliferativos Crónicos
TE	Trombocitemia Esencial
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TO	Tiempo de obturación
TPO	Trombopoyetina
TVP	Trombosis venosa profunda
TxA₂	Tromboxano A ₂
TxB₂	Tromboxano B ₂

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción	Página
1.- Concepto: Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas	16
2.- Etiopatogenia y bases moleculares	17
3.- Clasificación y criterios diagnósticos	24
3.1. Criterios diagnósticos de Policitemia Vera	26
3.2. Criterios diagnósticos de Trombocitemia Esencial	27
3.3. Criterios diagnósticos de Mielofibrosis Primaria	29
4.- Clínica: Complicaciones trombóticas y hemorrágicas	33
4.1. Trombocitemia Esencial	34
4.2. Policitemia Vera	34
4.3. Complicaciones trombóticas y hemorrágicas	35
4.3.1. Incidencia	35
4.3.2. Fenotipo	37
4.3.2.1. Trombosis arterial	37
4.3.2.2. Trombosis venosa	38
4.3.2.3. Trombosis microvasculares	39
4.3.2.4. Hemorragia	40
5.- Factores de riesgo para el desarrollo de fenómenos trombóticos	41
5.1. Edad e historia previa de trombosis	41
5.2. Leucocitosis	43
5.3. Mutación JAK2 V617F	44
5.4. Factores de riesgo cardiovascular	45
5.5. Polimorfismos hemostáticos	46
5.6. Anticuerpos antifosfolípidos	47
5.7. Grupo sanguíneo ABO	47

	Página
6.- Etiopatogenia de la trombosis en NMPc	48
6.1. Papel de las plaquetas en la patogenia de la trombosis en NMPc	49
6.1.1. Cifra de plaquetas	
6.1.2. Alteración funcional de las plaquetas	51
6.2. Papel de los leucocitos en la patogenia de la trombosis en NMPc	53
6.3. Papel del hematocrito en la patogenia de la trombosis en NMPc	55
7.- Implicaciones de la carga alélica de JAK2 V617F en el perfil clínico de las NMPc	56
7.1. TE y MFP: Implicación de la presencia/ausencia de la mutación JAK2 V617F	56
7.2. Homocigotos vs. heterocigotos para la mutación JAK2 V617F	57
7.3. Cuantificación del alelo mutado JAK2 V617F y sus implicaciones clínicas	59
8.- Tratamiento	60
8.1. Nuevos tratamientos	64
9.- Pronóstico	66
9.1. Mielofibrosis Primaria	66
9.2. Trombocitemia Esencial y Policitemia Vera	66
II. Hipótesis de trabajo	68

	Página
III. Objetivos	70
IV. Pacientes y métodos	72
- Primer objetivo: Estudio del papel de las modificaciones moleculares de proteínas hemostáticas y factores ambientales en el desarrollo de trombosis/hemorragia en NMPc Ph(-)	73
- Segundo objetivo: Análisis de la activación y recuento leucocitario en Trombocitemia Esencial como factor de riesgo trombótico/hemorrágico	85
- Tercer objetivo: Valoración de la funcionalidad plaquetaria y reactividad a Epinefrina en Trombocitemia Esencial	90
V. Resultados	97
- Primer objetivo: Estudio del papel de las modificaciones moleculares de proteínas hemostáticas y factores ambientales en el desarrollo de trombosis/hemorragia en NMPc Ph(-)	98
- Segundo objetivo: Análisis de la activación y recuento leucocitario en Trombocitemia Esencial como factor de riesgo trombótico/hemorrágico	107
- Tercer objetivo: Valoración de la funcionalidad plaquetaria y reactividad a Epinefrina en Trombocitemia Esencial	117
VI. Discusión	125
- Primer objetivo: Estudio del papel de las modificaciones moleculares de proteínas hemostáticas y factores ambientales	

	Página
en el desarrollo de trombosis/hemorragia en NMPc Ph(-)	128
- Segundo objetivo: Análisis de la activación y recuento leucocitario en Trombocitemia Esencial como factor de riesgo trombótico/hemorragico	135
- Tercer objetivo: Valoración de la funcionalidad plaquetaria y reactividad a Epinefrina en Trombocitemia Esencial	141
VII. Conclusiones	144
VIII. Referencias	147
Anexo I: Difusión de los resultados científicos del proyecto de Tesis	
Doctoral	169
1.- Publicaciones	170
2.- Comunicaciones a Congresos Internacionales	172
3.- Comunicaciones a Congresos Nacionales	173
Anexo II: Otras investigaciones no relacionadas con el Proyecto de Tesis Doctoral en las que ha participado la doctoranda durante su periodo de formación post-graduada	176
1.- Artículos	177
2.- Comunicaciones a Congresos Internacionales	178
3.- Comunicaciones a Congresos Nacionales	182

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

I. Introducción	Página
Tabla 1. Síndromes Mieloproliferativos Crónicos (OMS 2001)	17
Figura 1. Estructura de JAK2	20
Figura 2. Esquema del mecanismo fisiológico de acción de JAK2	20
Tabla 2. Clasificación de las Neoplasias Mieloides (OMS 2008)	26
Tabla 3. Criterios de la OMS 2001 para la Policitemia Vera	28
Tabla 4. Criterios de la OMS 2008 para la Policitemia Vera	29
Tabla 5. Criterios de la OMS 2001 para la Trombocitemia Esencial	30
Tabla 6. Criterios de la OMS 2008 para la Trombocitemia Esencial	31
Tabla 7. Criterios de la OMS 2001 para el estadio prefibrótico de la Mielofibrosis Primaria	32
Tabla 8. Criterios de la OMS 2001 para el estadio fibrótico de la Mielofibrosis Primaria	32
Tabla 9. Criterios de la OMS 2008 para la Mielofibrosis Primaria	33
Tabla 10. Fenómenos trombóticos y hemorrágicos al diagnóstico en TE y PV	37
Tabla 11. Fenómenos trombóticos y hemorrágicos durante el seguimiento en TE y PV	38
Tabla 12. Incidencia (%pacientes/año) de trombosis en TE y PV en función de la edad y de eventos trombóticos previos	42
Tabla 13. JAK2 V617F y trombosis en TE	42
Figura 3. Mecanismos que promueven la interacción de plaquetas, neutrófilos, monocitos y la producción de sustancias protrombóticas en NMPc	49

II. Pacientes y métodos

Página

Primer objetivo: Estudio del papel de las modificaciones moleculares de proteínas hemostáticas y factores ambientales en el desarrollo de trombosis/hemorragia en NMPc Ph(-)

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la caracterización de polimorfismos en trombofilia 82

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la identificación el grupo ABO 83

Figura 1. Lectura de geles acrilamida 5% para la identificación del genotipo ABO 83

Tercer objetivo: Valoración de la funcionalidad plaquetaria y reactividad a Epinefrina en Trombocitemia Esencial

Figura 1. Vía de regulación de la fosforilación de VASP 94

III. Resultados

Primer objetivo: Estudio del papel de las modificaciones moleculares de proteínas hemostáticas y factores ambientales en el desarrollo de trombosis/hemorragia en NMPc Ph(-)

Tabla 1. Eventos trombóticos y hemorrágicos en pacientes diagnosticados de NMPc Ph(-) 99

Tabla 2. Factores de riesgo genético para trombosis en NMPcPh(-) 100

Tabla 3. Características clínicas y prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares adquiridas en pacientes con TE 101

Tabla 4. Características clínicas y prevalencia de factores de riesgo en pacientes con TE	Página 102
Figura 1. Prevalencia de la mutación JAK2 V617F en pacientes diagnosticados de NMPc Ph(-)	103
Tabla 5. Características biológicas en pacientes con NMPc en función del genotipo ABO	105
Tabla 6. Características clínicas y prevalencia de los genotipos ABO en pacientes con NMPc	106

Segundo objetivo: Análisis de la activación y recuento leucocitario en Trombocitemia Esencial como factor de riesgo trombótico/hemorrágico

Tabla 1. Eventos trombóticos en pacientes diagnosticados de TE	107
Tabla 2. Eventos hemorrágicos en pacientes diagnosticados de TE	108
Tabla 3. Características clínicas y biológicas de los pacientes según la mutación JAK2 V617F	108
Tabla 4. Cifras en sangre periférica de los pacientes sin tratamiento citorreductor según la mutación JAK2 V617F	109
Figura 1. Expresión de complejos PMN-plaquetas (% positividad)	111
Figura 2. Expresión de complejos monocitos-plaquetas (% positividad)	111
Figura 3. Expresión de CD11b por neutrófilos (IFM)	112
Figura 4. Expresión de CD11b por monocitos (IFM)	112
Figura 5. Expresión de FT por PMN (% de positividad)	113
Figura 6. Expresión de FT por monocitos (% de positividad)	114

Tabla 5. Correlación entre activación de leucocitos/ plaquetas y estado mutacional de JAK2 V617F	Página 115
Figura 7. Correlación de número de CD34 en médula ósea y estado mutacional de JAK2 V617F	116

Tercer objetivo: Valoración de la funcionalidad plaquetaria y reactividad a Epinefrina en Trombocitemia Esencial

Tabla 1. Características clínicas y biológicas de los pacientes (TE)	118
Tabla 2. Expresión basal de CD62 (% de positividad)	119
Tabla 3. PFA-100 en pacientes con TE y controles	119
Tabla 4. TO y clínica hemorrágica en TE sin AAS	120
Tabla 5. Datos clínicos de los pacientes con TE y hemorragia	120
Tabla 6. PFA-100 y JAK2 V617F en TE	121
Tabla 7. Características clínicas de los pacientes y controles	122
Figura 1. Agregación plaquetar en respuesta a varios agonistas en controles (C) y pacientes (TE)	122
Tabla 8. Agregación plaquetar en respuesta a AA en pacientes con TE con o sin aspirina (AAS)	123
Figura 2. Agregación plaquetar en respuesta a varios agonistas en controles (C) y pacientes (TE) respondedores o no a AA	123
Figura 3. Fosforilación de VASP en controles (C) y pacientes (TE) respondedores o no a AA	124

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO: NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS

Los Síndromes Mieloproliferativos Crónicos (SMPc) o, actualmente y tras la revisión de los nuevos criterios diagnósticos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2008, las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas (NMPc) [1], incluyen un conjunto de enfermedades hematológicas con unas características clínicas y evolutivas afines, y de etiopatogenia probablemente común. Se caracterizan por la expansión clonal de la célula madre pluripotente, produciendo como resultado una hiper celularidad medular con predominio de una línea específica. Son enfermedades de evolución lenta que finalmente pueden transformarse a leucemia aguda.

Los SMPc se han dividido clásicamente en dos grandes grupos: Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y el resto de entidades que se englobarían bajo el concepto de SMPc Filadelfia negativo [Ph(-)] [2,3].

La LMC es un SMPc clonal en el que las células proliferantes presentan casi de forma invariable el cromosoma Filadelfia con reordenamiento del gen BCR/ABL, como reflejo de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22) (q34;q11)], que da lugar a la síntesis de una proteína con actividad tirosin cinasa aumentada, la p210, la más frecuentemente implicada en la patogenia de la enfermedad [4].

Dentro del grupo de SMPc Ph(-), se han incluido clásicamente: la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis Idiopática o Mielofibrosis Primaria (MFP), así como otros menos frecuentes como la Leucemia Neutrófila Crónica y Síndrome Hipereosinófilico/Leucemia Eosinófila Crónica [5].

En la clasificación de las neoplasias mieloides elaborada por la OMS en 2001, además de los SMPc clásicos se propuso una nueva categoría: los Síndromes Mieloproliferativos-Mielodisplásicos Crónicos, que abarcan la Leucemia Mielomonocítica Crónica Juvenil, la Leucemia Mielomonocítica Crónica y la Leucemia Mieloide Crónica Atípica (Tabla 1).

Tabla 1. Síndromes Mieloproliferativos Crónicos (OMS 2001)

-
- Leucemia Mieloide Crónica Ph (+) [t(9;22)(q34;q11), BCR/ABL]
 - Leucemia Neutrofílica Crónica
 - Síndrome Hipereosinofílico/ Leucemia Eosinofílica Crónica
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis Crónica Idiopática con Metaplasia Mieloide (Metaplasia Mieloide Agnogénica)
 - Síndromes Mieloproliferativos-Mielodisplásicos Crónicos
 - Síndromes Mieloproliferativos Crónicos no clasificables
-

Estos criterios diagnósticos han sido revisados recientemente apareciendo una nueva nomenclatura y una nueva clasificación que posteriormente se detallará (Apartado 3).

2. ETIOPATOGENIA Y BASES MOLECULARES

La PV fue la primera NMPc descrita; ya Hipócrates identificó un grupo de pacientes que presentaban plétora, pero fue en 1892 cuando Louis Henry Vaquez publicó por primera vez una detallada descripción de un paciente con policitemia, caso que llamó *cianosis con hiperglobulia persistente* [6]. En 1903, William Osler presentó cuatro casos más que reconoció como una nueva entidad [7]. En 1934 Epstein y Goeddel describieron el primer caso de TE

denominándola *Trombocitemia hemorrágica* [8]. La exposición de los dos primeros casos de MFP se llevó a cabo por Heuck en 1879 [9]. Pero no fue hasta 1951 cuando Dameshek introdujo en la nomenclatura hematológica el término de *Síndrome Mieloproliferativo Crónico* para designar una serie de entidades patológicas con posibles vinculaciones nosológicas y que además, por su similitud clínica y evolutiva pudieran plantear problemas de diagnóstico diferencial; pensaba que el responsable de estas entidades era un “estímulo desconocido hasta ese momento, quizá hormonal” [10]. Veinte años más tarde, en 1974 se demostró que una subpoblación de progenitores eritroides tardíos en la PV podía proliferar *in vitro* en ausencia de factores estimuladores como la eritropoyetina (EPO) [11], formando colonias eritroides endógenas (CEE). Se demostró que la formación de CEE no era específica de la PV, observándose también en algunos pacientes con TE, MFP y LMC, y dos años después se describió el origen clonal de este grupo de enfermedades [12].

Aunque inicialmente se creyó que existía un crecimiento “independiente de la EPO”, estudios posteriores revelaron que el fenómeno de las CEE representaba hipersensibilidad a la citocina EPO presente en el suero usado en los cultivos [13]. Estos hallazgos sugerían que las anomalías del receptor de la EPO podrían ser responsables de la PV. Posteriormente se ha descubierto, que con la excepción de algunos casos de eritrocitosis familiar, el receptor de la EPO es completamente normal [14]. Además, estudios posteriores revelaron que las células de la médula ósea y de la sangre de pacientes con PV eran hipersensibles no sólo a la EPO, sino también a otros factores de crecimiento hematopoyéticos, como la interleucina 3 (IL-3), el factor de crecimiento de células madre pluripotentes (SCF), factor de crecimiento de granulocitos-

macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y la trombopoyetina (TPO) [15-18]. Estos hallazgos sugirieron que los acontecimientos posteriores a la unión de estos factores al receptor podrían ser responsables de la formación de CEE.

La fosforilación de las proteínas tirosin cinasas es vital para la transmisión de señales que potencian el crecimiento de una amplia gama de mitógenos celulares. No obstante, con la clonación del receptor de la EPO en 1989 [19] se vio que a diferencia de los receptores de algunos mitógenos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la insulina y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que contienen dominios citoplasmáticos de tirosin-cinasas, el receptor de la EPO no consiguió producir señalización intracelular reconocible. Con la clonación de GM-CSF, de la TPO y de múltiples receptores de interleucinas, nació una familia de receptores denominados receptores de citocinas de tipo I, identificándose posteriormente su mecanismo de señalización. Se observó que éstos usaban un sistema de transmisión de señal conocido como vía de JAK/STAT (JAK: *just another kinase*/ STAT: *signal transducers and activators of transcription*) [20].

Estructuralmente las proteínas JAK se caracterizan por presentar cuatro dominios que incluyen un dominio N-terminal FERM, necesario para la interacción con la porción intracelular de los receptores de citocinas, un dominio SH2 (Src-homólogo 2) seguido de una pseudocinasa JH2 (JAK-homólogo 2) y un dominio cinasa C-terminal JH1 (JAK-homólogo 1) (Figura 1). Dentro del grupo de las proteínas JAK es de señalar JAK2; en condiciones normales, al unirse el ligando al receptor, éste se dimeriza, de forma que las dos moléculas de JAK2 unidas al dominio yuxtamembrana citoplasmático del

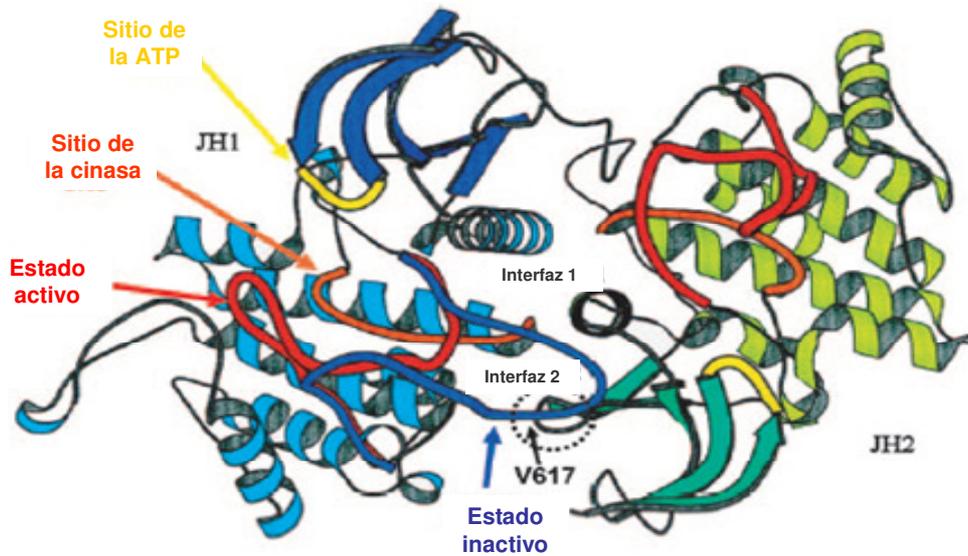


Figura 1. Estructura de JAK2, mostrando (1) los diagramas de cintas de los dominios JH1 y JH2, (2) el asa de activación de JH1 en dos posibles conformaciones; la activa (estado activado) y la inactiva (estado no activado), y (3) con un círculo, el sitio de interacción de JH2 y del dominio de activación de JH1, junto con el emplazamiento de Val617.

Adaptado a partir de Lindauer y col. [21].

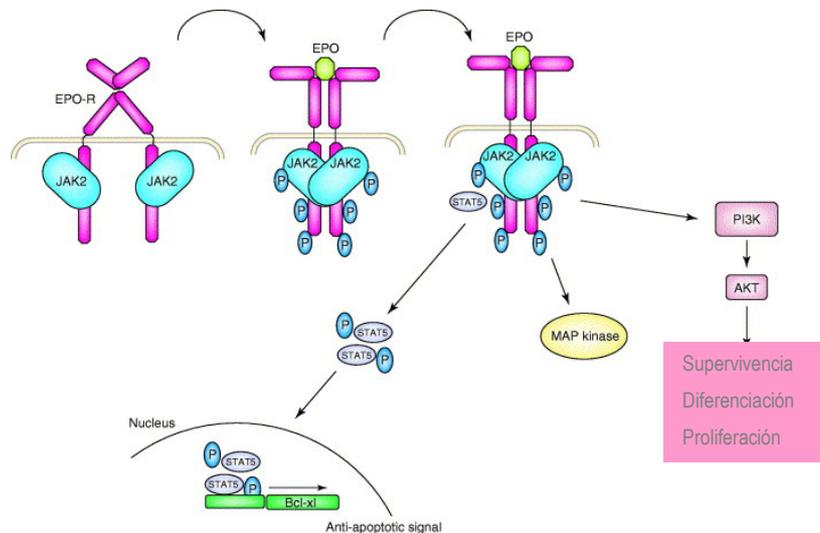


Figura 2. Esquema del mecanismo fisiológico de acción de JAK2. Adaptado a partir de David P y col. [22].

receptor se aproximan y se activan mutuamente por fosforilación. Una vez activado JAK2, recluta las proteínas STAT que se fosforilan y dimerizan, y entran en el núcleo activando la transcripción de genes implicados en la proliferación y supervivencia celular (Figura 2).

En Marzo de 2005, cinco grupos describieron una mutación clonal, adquirida en JAK2 [23-27] que se asienta en el exón 14 y que afecta al nucleótido 1849 provocando el cambio de una guanina por una timidina; como consecuencia se produce un cambio de una valina por una fenilalanina en la porción 617, V617F, de la proteína.

Esta mutación está localizada en el dominio JH2 que tiene actividad pseudocinasa, cuya función es inhibir el dominio cinasa JH1 interaccionando con el bucle de activación. Por lo tanto, con la presencia de la mutación no se inhibirá el dominio cinasa JH1, produciendo una actividad cinasa constitutiva de la proteína JAK2, induciendo una hipersensibilidad a citocinas o una independencia de los factores de crecimiento hematopoyético estimuladores de las diferentes líneas celulares. JAK2 V617F se ha descrito en más del 95% de PV y en un 50-60% de TE y MFP [23,28-30] y ha supuesto, no sólo un importante avance en el conocimiento de la patogenia de estas enfermedades, sino también en su diagnóstico.

La mutación JAK2 V617F se ha descrito en casos de anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis (ARSA-T) [31,32], en un 20% de las NMPc “no clásicas” [33,34], y en un 3% de Leucemias Agudas Mieloblásticas (LAM) *de novo* y Síndromes Mielodisplásicos (SMD) [35-37].

La mutación, sin embargo, no ha sido detectada en neoplasias no mieloides [38,39] ni en casos en los que existe una mieloproliferación reactiva [3].

Otras mutaciones en NMPc descritas en 2006, son las que afectan al aminoácido 515 del gen que codifica para el receptor de la TPO (c-MPL) [40], siendo las primeras alteraciones genéticas detectadas en NMPc que afectan a un receptor de citocinas. El aminoácido 515 forma parte de una región anfipática localizada en el dominio yuxtamembrana que impide la dimerización del receptor en ausencia del ligando. Las mutaciones W515K y W515L, por ello, producen la dimerización del receptor en ausencia del ligando y la activación constitutiva de la vía de transducción de señales dependientes de este receptor. Se sabe que estas mutaciones y JAK2 V617F no son mutuamente excluyentes, y así se han descrito en pacientes JAK2 V617F positivos, e incluso pueden coexistir en un mismo paciente las dos mutaciones de c-MPL, W515K y W515L [41,42]. Es de destacar que no se han descrito mutaciones de c-MPL en pacientes diagnosticados de PV, sí en pacientes con TE (1%) y en pacientes con MFP (5%), lo que iría a favor de que estos cambios podrían estar favoreciendo más el desarrollo de la línea megacariocítica, que el de la eritroide. Así, se ha visto cómo los pacientes con TE con estas mutaciones en c-MPL, presentan cifras más altas de plaquetas y niveles más bajos de hemoglobina que los que son portadores de la mutación V617F de JAK2 [43], y los pacientes diagnosticados de MFP c-MPL W515K/L positivos presentan anemia más severa [44]. Además, se ha demostrado crecimiento endógeno de colonias megacariocíticas, pero no eritroides, en pacientes c-MPL W515K/L positivos.

Otras mutaciones descritas en c-MPL, aunque menos frecuentes son: W515A [45], S204P [46] y S505N [47] (esta última descrita en formas de trombocitosis familiares) [48].

En 2007 se describe que existen casos de PV y eritrocitosis idiopáticas negativas para la mutación JAK2 V617F que pueden presentar mutaciones del exón 12 de JAK2 [49]. Las mutaciones del exón 12 pueden afectar a diferentes nucleótidos y por lo tanto, a diferentes aminoácidos (concretamente a los aminoácidos 538 a 543). Los pacientes diagnosticados de PV con mutaciones en el exón 12 presentan valores más altos de hemoglobina al diagnóstico que los pacientes con la mutación JAK2 V617F, y cifras de plaquetas y leucocitos normales. Es también destacable, que a diferencia de la mutación JAK2 V617F, las del exón 12 son específicas de PV, no habiéndose descrito en casos de TE ni de MFP [49-51]. Así, en todo paciente con sospecha de PV con estudio negativo para la mutación JAK2 V617F se debe realizar un estudio de mutaciones del exón 12 de JAK2 [52].

En el último año se han identificado en neoplasias mieloides (SMD, leucemia aguda y NMPc) mutaciones adquiridas del gen Ten-Eleven Translocation 2 (TET2), gen supresor de tumores localizado en la región 4q24 [53-56]. Concretamente, se ha descrito en un 14-17% de pacientes con NMP (PV, TE y MFP) JAK2 V617F positivos [55], siendo menor su frecuencia entre los pacientes que no presentan el alelo F617 de JAK2. Recientemente aparece publicado un trabajo por Tefferi y col. [55] en el que estudian en 239 pacientes diagnosticados de NMPc (PV, TE, MFP, MF post-PV/TE, y formas evolucionadas a leucemia aguda) la presencia de mutaciones en TET2 y sus posibles implicaciones clínicas; así se observa como la presencia de las mutaciones en TET2 no parece afectar a la supervivencia, ni a la evolución a leucemia ni al desarrollo de eventos trombóticos en este grupo de pacientes; sin embargo sí se asociaron con la edad en todo el grupo de pacientes (más

frecuentes en los pacientes mayores de 60 años) y con niveles más bajos de hemoglobina en los pacientes diagnosticados de MFP.

3. CLASIFICACIÓN Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

La definición de los llamados hasta ahora SMPc Ph(-), descritos inicialmente por William Dameshek [1], está en rápida evolución debido a los continuos avances y caracterización de sus mecanismos patogénicos. Hasta hace relativamente poco tiempo, el diagnóstico de las NMPc negativas para BCR-ABL carecía de un “estándar de oro”, un marcador molecular absoluto. Este déficit ha conducido a una serie de criterios diagnósticos clínico-patológicos que se basan en descartar diagnósticos alternativos a NMPc, como un estado reactivo u otro proceso mielóide maligno, lo que no permitía en múltiples ocasiones, un diagnóstico de seguridad.

El descubrimiento de la mutación activadora de la tirosin-cinasa JAK2 V617F y de otras alteraciones moleculares relevantes (mutaciones del exón 12 de JAK2 y c-MPL W515L/F) ha enriquecido el conocimiento de la patogenia de este grupo de enfermedades. La mejoría de la certeza diagnóstica que proporcionan estos marcadores moleculares ha conducido a la modificación y simplificación de los algoritmos diagnósticos de la OMS.

Estimulados por estos hechos, los miembros del Comité de revisión de la Clasificación de Neoplasias Hematológicas y Linfoides de la OMS contactaron con miembros clave del *International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment* (IWG-MRT), el *Myeloproliferative Diseases-Research Consortium* (MPD-RC) y la *European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera* (ECLAP) para solicitar su colaboración en el desarrollo de

directrices diagnósticas revisadas para los SMPc BCR-ABL negativos. El documento de consenso resultante fue presentado a los miembros del Comité Consultor Clínico para la revisión de la OMS de Neoplasias Mieloides, que evaluó el documento y recomendó la adopción de los nuevos criterios diagnósticos, siendo publicados en 2008 [29,57,58] (Tabla 2).

Así, la palabra “síndrome o enfermedad” fue sustituida por neoplasia, y los SMPc pasaban a ser denominados como Neoplasias Mieloproliferativas crónicas (NMPc). La clasificación de la OMS de 2001 reconocía cuatro grandes categorías dentro de las neoplasias mieloides crónicas [4]:

- Síndromes Mieloproliferativos: incluyendo las cuatro formas clásicas LMC, PV, TE y MFP y además Leucemia Neutrófila Crónica, Leucemia Eosinófila Crónica/Síndrome Hipereosinófilico y las formas de SMPc clasificables.
- Síndromes Mielodisplásicos.
- Síndromes Mielodisplásicos/Mieloproliferativos: Leucemia Mielomonocítica Crónica, Leucemia Mielomonocítica juvenil, LMC atípica y SMD/SMPc clasificables.
- Mastocitosis.

Tabla 2. Clasificación de las Neoplasias Mieloides (OMS 2008)

-
- 1. Leucemia Aguda Mieloblástica**
 - 2. Síndromes Mielodisplásicos**
 - 3. Neoplasias Mieloproliferativas**
 - Leucemia Mieloide Crónica
 - Policitemia Vera
 - Trombocitemia Esencial
 - Mielofibrosis Primaria
 - Leucemia Neutrófilica Crónica
 - Leucemia Eosinófilica Crónica
 - Síndrome Hipereosinofílico
 - Enfermedad de Mastocitos
 - Neoplasias Mieloproliferativas inclasificables
 - 4. SMD/NMPc**
 - Leucemia Mielomonocítica Crónica
 - Leucemia Mielomonocítica Juvenil
 - Leucemia Mieloide Crónica atípica
 - SMD/NMPc inclasificables
 - 5. Neoplasias Mieloides asociadas con eosinofilia y alteraciones de PDGFRA, PDGFRB o FGFR1**
 - Neoplasias Mieloides asociadas con el reordenamiento PDGFRA
 - Neoplasias Mieloides asociadas con el reordenamiento PDGFRB
 - Neoplasias Mieloides asociadas con el reordenamiento FGFR1 (Síndrome Mieloproliferativo 8p11)
-

La característica central y que es común a todas las NMPc es la presencia de una “mieloproliferación” efectiva (con predominio en sangre periférica de una línea específica: mieloide, eritroide o megacariocítica) y la ausencia de diseritropoyesis, displasia granulocítica o monocitosis; la presencia de cualquiera de estas tres últimas características sería indicativo de la presencia de un SMD o un SMD/NMPc [59].

3. 1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE POLICITEMIA VERA

La mayoría de los pacientes con PV, a diferencia de las formas secundarias de policitemia, son portadores de la mutación JAK2 V617F y en su defecto, de

mutaciones en el exón 12; en consecuencia, los criterios A de la OMS de 2001 (Tabla 3) pasan a ser sustituidos por dos criterios mayores en la nueva clasificación (Tabla 4): aumento en la hemoglobina, hematocrito o masa eritrocitaria, y presencia de la mutación JAK2 V617F u otra mutación funcionalmente similar, como mutaciones del exón 12 de JAK2. También los criterios B de la OMS del 2001, quedan reemplazados por tres criterios menores: 1) histología de la médula ósea consistente con una NMPc, 2) niveles de eritropoyetina sérica por debajo del rango normal y 3) presencia de CEE. Según los nuevos criterios, para diagnosticar una PV se requiere la presencia de los dos criterios mayores y al menos un criterio menor o la presencia de una poliglobulia con al menos dos criterios menores.

3.2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE TROMBOCITEMIA ESENCIAL

El primer cambio evidente de los nuevos criterios, es la disminución de la cifra de plaquetas que actúa como punto de corte para el diagnóstico; grupos de expertos defienden que la consideración diagnóstica de $600 \times 10^9/L$ plaquetas compromete la detección de las fases iniciales de la enfermedad debido a que el percentil 95 para el recuento normal de plaquetas ajustado por género y raza, está por debajo de las $400 \times 10^9/L$ [56].

Por este motivo se propuso el cambio del valor límite de las plaquetas para diagnosticar una TE de 600 a $450 \times 10^9/L$. A diferencia de lo que ocurre en PV, la utilidad de la búsqueda de la mutación JAK2 V617F para el diagnóstico de una TE (y una MFP) está limitada por el valor predictivo negativo subóptimo y la falta de especificidad diagnóstica dentro de las neoplasias mieloides [60]. Por lo tanto, para algunos se requiere la realización de biopsia de médula ósea

para ayudar al diagnóstico diferencial entre TE JAK2 V617F negativa y la trombocitosis reactiva, y sería obligada realizarla para diferenciar la TE de otras neoplasias mieloides crónicas, incluida la MFP en fase celular/prefibrótica y los SMD.

Respecto a la del 2001 (Tabla 5), en la nueva clasificación (Tabla 6), además de excluir causas de trombocitosis reactiva, se contempla la presencia de la mutación JAK2 V617F o de otro marcador clonal.

Tabla 3. Criterios de la OMS 2001 para la Policitemia Vera

Criterios A

1. Elevación de la masa eritrocitaria >25% del valor normal, o hemoglobina >18,5 g/dL para los hombres y 16,5 g/dL para las mujeres, o > del percentil 99 en el rango de referencia según edad, sexo y altitud del lugar de residencia
2. Ausencia de causas de eritrocitosis secundaria, incluyendo:
 - a. Ausencia de eritrocitosis familiar
 - b. Ausencia de elevación de eritropoyetina causada por:
 - I. Hipoxia (PO_2 arterial $\leq 92\%$)
 - II. Hemoglobina con elevada afinidad por el oxígeno
 - III. Truncamiento del receptor de la eritropoyetina
 - IV. Producción inadecuada de eritropoyetina de origen tumoral
3. Esplenomegalia
4. Alteración genética clonal diferente del cromosoma Filadelfia o del gen de fusión BCR-ABL en las células de la médula ósea
5. Formación de colonias eritroides endógenas

Criterios B

1. Trombocitosis $>400 \times 10^9/L$
2. Leucocitosis $>12 \times 10^9/L$
3. Biopsia medular que muestre panmielosis con proliferación eritroide y megacariocítica prominente
4. Niveles séricos bajos de eritropoyetina

El diagnóstico requiere la presencia de los dos primeros criterios A junto con cualquier otro criterio A o dos criterios B

Se han descrito alteraciones citogenéticas en TE como del(20q), del(5q) y traslocaciones no equilibradas de brazos completos entre 1q y 7p, y su presencia no excluye el diagnóstico de TE (a no ser que existan hallazgos histológicos de SMD).

3.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MIELOFIBROSIS PRIMARIA

En la anterior clasificación de la OMS (2001) aparecían criterios distintos para la MFP prefibrótica (Tabla 7) y fibrótica (Tabla 8). En la actual clasificación (Tabla 9) se establecen en esta patología tres criterios mayores y cuatro

Tabla 4. Criterios de la OMS 2008 para la Policitemia Vera

Criterios mayores

1. Hemoglobina >18,5 g/dL para los hombres y 16,5 g/dL para las mujeres u otra evidencia de aumento de la masa eritrocitaria (hemoglobina o hematocrito por encima del percentil 99 según la edad, sexo y altitud del lugar de residencia) o hemoglobina >17 g/dL en hombres y >15 g/dL en mujeres si se asocia con un aumento sostenido de al menos 2 g/dL respecto a los niveles basales en ese individuo que no puede atribuirse a la corrección de un déficit de hierro, o masa eritrocitaria elevada por encima del 25% sobre la media normal
2. Presencia de la mutación JAK2 V617F u otra mutación funcionalmente similar, como mutaciones del exón 12 de JAK2

Criterios menores

1. Biopsia medular con hiper celularidad según la edad con crecimiento de las tres series (panmielosis) con proliferación eritrocitaria, granulocitaria y megacariocítica prominentes
2. Niveles de eritropoyetina sérica por debajo del límite de la normalidad
3. Formación de colonias eritroides endógenas *in vitro*

El diagnóstico requiere la presencia de los dos criterios mayores y un criterio menor o la presencia del primer criterio mayor y dos criterios menores

menores. El primer criterio mayor incluye la histología como un elemento diagnóstico clave para la MFP. La presencia de fibrosis con reticulina, aunque

es característica, no es diagnóstica de MFP. En ausencia de fibrosis con reticulina, el primer criterio para diagnosticar una MFP, además de los cambios en los megacariocitos, es la presencia de hiper celularidad en la médula ósea, proliferación granulocitaria y descenso de los precursores eritroides. Los otros dos criterios mayores exponen la necesidad de excluir una mielofibrosis asociada a otra neoplasia mieloide o una forma reactiva, y la demostración de la mutación JAK2 V617F u otro marcador clonal o la presencia de fibrosis no atribuible a un proceso no clonal. Así para su diagnóstico se requiere cumplir los tres criterios mayores y, para mayor fiabilidad diagnóstica, en el contexto de la fase prefibrótica/celular de la enfermedad, dos de los cuatro criterios menores (Tabla 9).

Tabla 5. Criterios de la OMS 2001 para la Trombocitemia Esencial

Criterios positivos

1. Recuento de plaquetas $\geq 600 \times 10^9/L$ sostenidamente
2. Biopsia medular con proliferación sobre todo de la serie megacariocítica con aumento del número y del tamaño de megacariocitos maduros

Criterios de exclusión

1. Ausencia de PV
 - a. Masa eritrocitaria normal o hemoglobina $<18,5$ g/dL en hombres, y $<16,5$ g/dL en mujeres
 - b. Tinción de hierro en medula ósea, niveles séricos de ferritina o volumen corpuscular medio normales
 - c. Si no se cumple la condición previa, falta de respuesta al tratamiento con hierro (no hay aumento de la masa eritrocitaria o de los niveles de hemoglobina hasta el rango de la PV)
 2. Ausencia de evidencia de LMC: sin cromosoma Filadelfia, ni gen de fusión BCR-ABL
 3. Ausencia de MFP:
 - a. No evidencia de fibrosis colágena
 - b. Fibrosis de reticulina mínima o ausente
 4. Ausencia de SMD:
 - a. Ausencia de del(5q), t(3,3)(q21;q26), inv(3)(q21q26)
 - b. Ausencia de displasia granulocítica significativa, micromegacariocitos ausentes o escasos
 5. No evidencia de que la trombocitosis sea reactiva a consecuencia de:
 - a. Inflamación o infección subyacentes
 - b. Neoplasia subyacente
 - c. Esplenectomía previa
-

Tabla 6. Criterios de la OMS 2008 para la Trombocitemia Esencial

1. Recuento de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$ sostenidamente^a
2. Biopsia medular con proliferación sobre todo de la serie megacariocítica con incremento del número y del tamaño de megacariocitos maduros; ausencia de exceso de granulopoyesis neutrofílica o de desviación izquierda
3. No se cumplen los criterios diagnósticos de la OMS para PV^b, MFP^c, LMC^d, SMD^e u otra neoplasia mieloide
4. Demostración de la mutación JAK2 V617F u otro marcador clonal; no evidencia de trombocitosis reactiva^f

El diagnóstico requiere de los cuatro criterios diagnósticos

^a Durante el periodo de diagnóstico

^b Es necesario que el tratamiento de reposición con hierro no logre aumentar los niveles de hemoglobina hasta el rango de la PV en presencia de ferritina sérica disminuida. La exclusión de PV se basa en los niveles de hemoglobina y hematocrito, y no se requiere una medición de la masa eritrocitaria

^c Requiere la ausencia de fibrosis reticular relevante, fibrosis colágena, leucoeritroblastosis en sangre periférica o en médula ósea con marcada hiper celularidad para la edad acompañada de morfología megacariocítica típica de la MFP, con un cociente anormal núcleo/citoplasma y núcleos hipercromáticos o irregulares con conglomerados densos

^d Requiere la ausencia de BCR-ABL

^e Requiere la ausencia de diseritropoyesis y disgranulopoyesis

^f Las causas de trombocitosis reactivas incluyen déficit de hierro, esplenomegalia, cirugía, infección, inflamación, enfermedades del tejido conectivo, cáncer metastático y trastornos linfoproliferativos. Sin embargo, la presencia de un trastorno asociado con trombocitosis asociada no excluye la posibilidad de TE si se cumplen los tres primeros criterios

Tabla 7. Criterios de la OMS 2001 para el estadio prefibrótico de la Mielofibrosis Primaria

Hallazgos clínicos

1. Bazo e hígado: Hepatomegalia y esplenomegalia discretas o ausentes
2. Hematología (variable)
 - Anemia leve
 - Leucocitosis de leve a moderada
 - Trombocitosis de leve a moderada

Hallazgos morfológicos

1. Sangre:
 - Leucoeritroblastosis discreta o ausente
 - Poiquilocitosis de eritrocitos de leve a moderada
 - Dacriocitos escasos o ausentes
2. Médula ósea:
 - Hiper celularidad
 - Proliferación neutrofílica
 - Proliferación megacariocítica
 - Atipia megacariocítica^a
 - Fibrosis de reticulina ausente o mínima

^a Agregados de megacariocitos, núcleos megacariocíticos con lobulaciones anormales, núcleos megacariocíticos desnudos

Tabla 8. Criterios de la OMS 2001 para el estadio fibrótico de la Mielofibrosis Primaria

Hallazgos clínicos

1. Bazo e hígado: Hepatomegalia y esplenomegalia moderada o marcada
2. Hematología (variable)
 - Anemia moderada o marcada
 - Leucocitos aumentados o disminuidos
 - Recuento de plaquetas aumentado o disminuído

Hallazgos morfológicos

1. Sangre:
 - Leucoeritroblastosis
 - Poiquilocitosis eritrocitaria marcada
 - Dacriocitos abundantes
2. Médula ósea:
 - Fibrosis colágena o reticular
 - Celularidad disminuida
 - Dilatación de los senos medulares
 - Hematopoyesis intraluminal
 - Proliferación neutrofílica
 - Proliferación megacariocítica prominente
 - Atipia megacariocítica^a
 - Nueva formación ósea (osteosclerosis)

^a Agregados de megacariocitos, núcleos megacariocíticos con lobulaciones anormales, núcleos megacariocíticos desnudos

Tabla 9. Criterios de la OMS 2008 para la Mielofibrosis Primaria**Criterios mayores**

1. Presencia de proliferación megacariocítica con atipia^a, normalmente acompañada de fibrosis colágena o de reticulina, o, en ausencia de fibrosis reticular significativa, los cambios megacariocíticos deben acompañarse de un aumento de la celularidad de la médula ósea caracterizado por proliferación granulocítica y a menudo disminución de la eritropoyesis (fase celular prefibrótica de la enfermedad)
2. No se cumplen los criterios de la OMS para la PV^b, LMC^c, SMD^d u otra neoplasia mieloide
3. Demostración de la mutación JAK2 V617F u otro marcador clonal (como c-MPL W515K/L) o, en ausencia de un marcador clonal, no evidencia de fibrosis medular debido a un proceso inflamatorio subyacente o a otra enfermedad neoplásica^e

Criterios menores

1. Leucoeritroblastosis^f
2. Aumento de los niveles séricos de lactato deshidrogenasa^f
3. Anemia^f
4. Esplenomegalia palpable^f

El diagnóstico requiere cumplir los tres criterios mayores y dos criterios menores

^a Megacariocitos de pequeños a grandes con un cociente núcleo/citoplasma alterado y núcleos hipercromáticos e irregulares con aglomerados densos

^b Es necesario que el tratamiento con reposición de hierro no logre aumentar los niveles de hemoglobina hasta el rango de la PV en presencia de ferritina sérica disminuida. La exclusión de PV se basa en los niveles de hemoglobina y hematocrito, y no requiere una medición de la masa eritrocitaria

^c Requiere la ausencia de BCR-ABL

^d Requiere la ausencia de diseritropoyesis y disgranulopoyesis

^e Secundarias a infección, trastornos autoinmunes u otras enfermedades inflamatorias crónicas, tricoleucemia u otra neoplasia linfoide, tumor maligno metastásico o mielopatías tóxicas (crónicas). En los pacientes con enfermedades asociadas con mielofibrosis reactiva no se puede descartar de entrada una mielofibrosis primaria y el diagnóstico debe considerarse en estos casos si se cumplen otros criterios

^f El grado de la alteración puede ser marcada o discreta

4. CLÍNICA: COMPLICACIONES TROMBÓTICAS Y HEMORRÁGICAS

La trombosis y el sangrado son parte de la historia natural de las NMPc, representando la principal causa de morbimortalidad en pacientes con TE y PV,

en particular en aquellos mayores de 60 años, y/o con historia previa de trombosis [5].

4.1. TROMBOCITEMIA ESENCIAL

La incidencia de la TE es de 2,5 por 100.000 habitantes/año, siendo la mediana de edad en el momento del diagnóstico de 60 años, existiendo un claro predominio femenino (relación mujer/varón 1,6:1). El 15-20% de los pacientes tienen menos de 40 años.

La trombosis predomina sobre la hemorragia y la trombosis arterial es más frecuente que la venosa. Los territorios afectados por orden de frecuencia son la circulación cerebrovascular, la vascular periférica, la coronaria y, más infrecuente los grandes vasos arteriales y venosos. El 30-40% de los pacientes presentan oclusiones microvasculares o trastornos de la microcirculación, siendo característica la eritromelalgia; otras manifestaciones micro-oclusivas frecuentes son las parestesias, alteraciones visuales atípicas y manifestaciones neurológicas, como el accidente isquémico transitorio (AIT) (aunque hay trabajos en las que incluyen a éstas últimas dentro de las trombosis mayores).

La hemorragia grave es infrecuente y afecta de forma principal al aparato digestivo; las manifestaciones hemorrágicas más frecuentes son cutáneas [61-64].

4.2. POLICITEMIA VERA

Su incidencia varía de 0,5 a 2/100.000 habitantes/año, con predominio masculino en relación 2:1 y edad de presentación de 40 a 75 años (mediana de 60 años).

La mayoría de sus manifestaciones clínicas son consecuencia directa de la proliferación excesiva de las diferentes líneas celulares hematopoyéticas que participan en el proceso neoplásico. Pueden aparecer diversas manifestaciones como astenia, cefalea, molestias epigástricas y gota. El prurito generalizado se manifiesta en aproximadamente la mitad de los pacientes y puede provocarse o exacerbarse después de una ducha o un baño [64-66].

A la exploración física los pacientes pueden presentar aspecto pletórico, inyección conjuntival, coloración rojiza de la piel y mucosas, esplenomegalia e hipertensión arterial.

Las trombosis arteriales inciden fundamentalmente en la circulación cerebral, coronaria y arterial periférica. Las trombosis venosas se asientan sobre todo en las venas profundas de las extremidades inferiores, pudiéndose complicar con embolismo pulmonar; también pueden aparecer en otros territorios como en las venas esplénica, hepática o mesentéricas.

Otras manifestaciones vasculares menos frecuentes en la PV son la eritromelalgia, la isquemia digital con pulsos palpables y la tromboflebitis.

4.3. COMPLICACIONES TROMBÓTICAS Y/O HEMORRÁGICAS

4.3.1. Incidencia

La principal causa de morbimortalidad de este grupo de pacientes (sobre todo de los pacientes con TE y PV), la constituyen las complicaciones trombóticas,

seguidas de las hemorrágicas y de la evolución a mielofibrosis o a leucemia aguda [5].

A pesar de los múltiples trabajos publicados, la incidencia precisa de los fenómenos trombóticos y/o hemorrágicos en estos pacientes es difícil de establecer. Sí se sabe con certeza que los fenómenos trombóticos son más frecuentes que los hemorrágicos y que las trombosis arteriales son más frecuentes que las venosas (tanto al diagnóstico como durante el seguimiento) [64].

Al diagnóstico, la incidencia de trombosis y de hemorragia en TE oscila de un 11-25% a un 3,6-37%, respectivamente; en PV la incidencia es de 12-39% y 1,7 a 20% (Tablas 10 y 11) [67]. Las diferencias en la incidencia de estas complicaciones entre los diversos estudios se justifican por la disparidad en los diferentes criterios de selección de los pacientes, por la variedad a la hora de definir los diferentes eventos (trombóticos/ hemorrágicos), por la precisión en la recogida de los datos y por el efecto que pudieran estar jugando los distintos tratamientos empleados.

De todos los estudios en los que se evalúa la incidencia de trombosis y/o hemorragia en NMPc, sólo hay uno en TE, en el que aparea a los enfermos a un grupo control (del mismo sexo y edad y con similares factores de riesgo cardiovascular) con el que se compara dicha incidencia [62]; así en este trabajo el riesgo de trombosis y hemorragia en pacientes con TE es de un 6,6%/paciente/año y 0,33% paciente/año, respectivamente, vs. 1,2% / paciente/año y 0% en el grupo control.

Tabla 10. Fenómenos trombóticos y hemorrágicos al diagnóstico en TE y PV [67]

	n	T. mayores (%)	T. arteriales mayores (%)	T. venosas mayores (%)	T. pequeño vaso (%)	Hemorragias (%)
TE						
Fenaux et al (1990)	147	18	83	17	34	18
Cortelazzo et al (1990)	100	11	91	9	30	9
Colombi et al (1991)	103	23	87	12	33	3,6
Besses et al (1999)	148	25	ND	ND	29	6,1
Jensen et al (2000)	96	14	85	15	23	9
Wolanskyj et al (2006)	322	26,3	ND	ND	ND	ND
Campbell et al (2005)	776	9,7	82,7	7,3	ND	ND
Carobbio (2006)	439	29,4	68,2	31,8	ND	ND
PV						
GISP (1995)	1213	34	66	33	ND	ND
Passamonti et al (2002)	163	34	64	36	24	3
Barbui (2003) (ECLAP)	1638	38,6	75	25	ND	8,1
Najean et al (1987)	58	12	29	71	ND	1,7
Passamonti et al (2003)	70	24,3	70,6	29	15,7	4,3
Marchioli et al (2005)	1638	38,6	75	25	ND	ND
Gangat et al (2007)	459	22	64	42	ND	ND

ND: No disponible. T: Trombosis

4.3.2. Fenotipo

4.3.2.1. Trombosis arterial

Las trombosis en pacientes con TE y PV tienen lugar tanto en territorio arterial, venoso como en la microcirculación. Las trombosis arteriales en el territorio cerebrovascular o los eventos trombóticos cardiovasculares e intraabdominales (portal y hepático) son más frecuentes en pacientes con PV, mientras que en TE son características las trombosis en la microcirculación [64]. Las trombosis arteriales mayores constituyen la principal causa de morbimortalidad en estos pacientes; los territorios que se ven afectados con más frecuencia son el territorio cerebral y el coronario.

Tabla 11. Fenómenos trombóticos y hemorrágicos durante el seguimiento en TE y PV [67]

	n	T. mayores (%)	T. arteriales mayores (%)	T. venosas mayores (%)	T. pequeño vaso (%)	Hemorragias (%)
TE						
Fenaux et al (1990)	147	13,6	86	14	4,1	ND
Cortelazzo et al (1990)	100	20	71	29	ND	ND
Colombi et al (1991)	103	11	91	9	27,7	8,7
Besses et al (1999)	148	22	94	6	16,7	11,5
Jensen et al (2000)	96	17	69	31	ND	13,6
Chim (2005)	231	10	91	9	ND	6,5
Passamonti (2004)	435	11	72	28	ND	ND
Wolanskyj et al (2006)	150	31	ND	ND	ND	10
Campbell et al (2005)	776	8	74	26	ND	4,1
Carobbio (2006)	439	18	65	35	ND	ND
PV						
GISP (1995)	1213	19	62	37	ND	ND
Passamonti et al (2002)	163	18	80	15	10	ND
Barbui (2003) (ECLAP)	1638	11	70	30	ND	ND
Najean et al (1987)	58	10	33	67	ND	1,7
Passamonti et al (2003)	396	8	59	41	ND	ND

ND: No disponible. T: Trombosis

El infarto cerebral sigue siendo la causa más frecuente de muerte en pacientes con PV sin tratamiento (supone un 30-40% de todos los eventos trombóticos en pacientes con esta patología) [68].

El síndrome coronario agudo es menos frecuente, sobre todo durante el seguimiento de pacientes con PV correctamente tratados, pero aún así hay descritos casos de infartos agudos de miocardio (IAM), incluso con arterias coronarias normales [69].

4.3.2.2. Trombosis venosa

Las trombosis venosas profundas de miembros inferiores y el tromboembolismo pulmonar suponen en casi todas las series (aunque no en todas) los fenómenos trombóticos venosos más frecuentes [70].

Son también frecuentes las tromboflebitis superficiales en miembros inferiores y las trombosis en territorios inusuales para la población general.

En PV, las trombosis venosas son relativamente frecuentes y constituyen un tercio de todos los eventos trombohemorrágicos. Las trombosis de senos cerebrales y del territorio esplénico (venas portal y hepáticas) se describen con cierta frecuencia en mujeres jóvenes [71].

La patología que coexiste más frecuentemente en el síndrome de Budd-Chiari (trombosis de la vena hepática) son las NMPc; estas enfermedades también se identifican en un gran número de pacientes con trombosis en el eje esplenoportal. La mayor frecuencia en estos territorios se ha explicado por su particular localización anatómica con un flujo portal incrementado, esplenomegalia congestiva y hematopoyesis extramedular hepática [72]. Varios estudios han analizado la prevalencia de la mutación JAK2 V617F en estas complicaciones [73-76]. La frecuencia de la mutación osciló entre el 17 y el 58%, variación que puede ser debida a la diferente sensibilidad de las técnicas empleadas para la detección de la mutación, al tipo de fuente de ADN o incluso a la selección de pacientes. Cabe destacar el estudio publicado por Kiladjian y col. [77] en el que la adición del estudio de la mutación JAK2 V617F a la biopsia y al cultivo de colonias eritroides supuso un incremento del 20% en la detección de una NMPc en pacientes que desarrollan este tipo de trombosis.

4.3.2.3. *Trombosis microvasculares*

Los fenómenos trombóticos de pequeño vaso constituyen las manifestaciones trombóticas más típicas en los pacientes con TE y PV, siendo los más comunes la eritromelalgia, alteraciones visuales y auditivas, fenómeno de Raynaud y cefalea. Estos síntomas se han explicado por la formación de acúmulos de plaquetas en los vasos arteriales más distales.

La eritromelalgia, sin embargo, no aparece en las formas de trombocitosis secundarias o reactivas, aunque la cifra de plaquetas sea muy alta, fenómeno que sugiere que en estos pacientes exista una alteración no sólo cuantitativa sino cualitativa de las plaquetas [78,79]. Otras manifestaciones clínicas características y secundarias a trombosis arterial de pequeño vaso serían los accidentes isquémicos transitorios (AIT) e isquemias retinianas.

4.3.2.4. Hemorragia

Las manifestaciones hemorrágicas tanto en TE como en PV aparecen con más frecuencia en piel y mucosas, incluyendo equimosis, epistaxis, menorragia y gingivorragia, sugiriendo afectación en la hemostasia primaria [80]. Las hemorragias gastrointestinales aparecen con menos frecuencia pero pueden ser graves y en ocasiones se han asociado con el uso de aspirina [81]. Así, la profilaxis antitrombótica con antiagregantes o anticoagulantes incrementa el riesgo hemorrágico [82]. Una mayor frecuencia de sangrados se ha relacionado también con cifras altas de plaquetas por la posibilidad de desarrollar una enfermedad de von Willebrand (EvW) adquirida [83], ésta suele ser de carácter leve y muy poco frecuente en pacientes con recuentos plaquetarios $<1000 \times 10^9/L$, pero se incrementa cuando los valores de las plaquetas superan esta

cifra. En pacientes con trombocitosis reactivas, sin embargo, la incidencia de hemorragia es baja [84].

En los enfermos con TE y trombocitosis muy marcadas pueden acontecer hemorragias graves, siendo en algunos casos recomendable conseguir una citorreducción urgente con la realización de plaquetoaféresis [84].

Por otro lado, en ocasiones los sangrados en este grupo de pacientes se han relacionado directa o indirectamente con complicaciones trombóticas concomitantes (por ejemplo, aparición de sangrado de varices esofágicas asociado a hipertensión portal por una trombosis en territorio abdominal) [85].

5. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE FENÓMENOS TROMBÓTICOS

Todavía existe una gran controversia acerca de qué factores se podrían considerar de riesgo para el desarrollo de fenómenos trombóticos en pacientes con NMPc, tal y como se comentará a continuación.

5.1. EDAD E HISTORIA PREVIA DE TROMBOSIS

Tanto en TE como en PV han sido dos los factores que clásicamente se han considerado de riesgo para el desarrollo de eventos trombóticos, la edad [62,68,86-89] y una historia previa de trombosis [62,68,86-88] (Tabla 12). Así, en un estudio epidemiológico en el que se incluyeron 1213 pacientes con PV [66], se observó como existía un riesgo de desarrollar trombosis de un 1,8 por cada 100 pacientes cuando la edad era inferior a 40 años, y que la incidencia aumentaba a un 5,1% pacientes/año cuando la edad era superior a 70 años.

Tabla 12. Incidencia (% pacientes/año) de trombosis en TE y PV en función de la edad y de eventos trombóticos previos

	Policitemia Vera		Trombocitemia Esencial	
	GISP [66]	Marchioli y col. [68]	Cortelazzo y col. [62]	Carobbio y col. [86]
Pacientes (n)	1213	1638	100	439
Edad				
< 40 años	1,8	2,1	1,7	ND
40-60 años	2,8	ND	6,3	ND
> 60 años	5,1	4,9	15,1	2,3
Trombosis previa	4,8	5,0	ND	2,3

ND: No disponible

Datos similares se han publicado para TE; así por ejemplo en un estudio en el que se reclutaron 100 pacientes con TE, la incidencia observada de trombosis entre los pacientes con una edad menor a 40 años era del 1,7% pacientes/año y aumentaba a un 15,1% cuando la edad era superior a 60 años [62].

Adicionalmente, a edad mayor de 60 años, eventos trombóticos previos son factores predictivos independientes para la recurrencia de la trombosis, así como para su localización, pues estas suelen acaecer en el mismo territorio inicial [68,87,90], constituyendo, hasta hace muy poco tiempo estos dos factores, la piedra angular para la estratificación del riesgo y el inicio del tratamiento citorreductor.

5.2. LEUCOCITOSIS

En los tres últimos años, publicaciones adicionales presentan como tercer factor de riesgo para el desarrollo de trombosis una cifra de leucocitos elevada al diagnóstico [86-89].

Así, en TE destaca un estudio de 439 pacientes [86] que muestra cómo la leucocitosis al diagnóstico incrementa en dos veces el riesgo de trombosis, reduciéndose éste con el empleo de tratamiento citorreductor. Quizás como hallazgo más relevante, los pacientes que habían sido clasificados de bajo riesgo de trombosis (pacientes jóvenes y sin historia previa de trombosis), pero que presentaban leucocitosis mostraron un riesgo trombótico incluso mayor al de los pacientes con criterios clásicos de alto riesgo en tratamiento. Todo ello reforzaría la hipótesis de que la activación leucocitaria tiene un papel importante en la patogenia de la trombosis en las NMPc, tal y como se describirá más adelante (Apartado 6.2.).

También en pacientes diagnosticados de PV, dos estudios [87,91] (n=1638 y 459, respectivamente) asocian un mayor riesgo trombótico a aquellos pacientes con una cifra de leucocitos elevada al diagnóstico. En el primer estudio [87] los pacientes que al diagnóstico presentaban más de $15 \times 10^9/L$ leucocitos (comparados con los que presentaban menos de $10 \times 10^9/L$) tenían un riesgo significativamente mayor de sufrir un IAM. En el segundo estudio [91] también la leucocitosis al diagnóstico (igual o mayor a $15 \times 10^9/L$) se establece como factor de riesgo independiente para el desarrollo de fenómenos trombóticos, en este caso venosos.

5.3. MUTACIÓN JAK2 V617F

Desde la descripción de la mutación JAK2 V617F, han sido numerosos los grupos de trabajo interesados en estudiar si ésta se asocia o no a un mayor riesgo de trombosis, aunque hasta el momento dicha asociación es controvertida [92] (Tabla 13).

Tabla 13. JAK2 V617F y trombosis en TE [92]

Series	Trombosis	JAK2 V617F	JAK2 WT	<i>p</i>
Wolanskyj y col. 2005 (n=150)	Al diagnóstico	17/73 (23%)	15/77 (20%)	0,57
	Seguimiento	24/73 (33%)	22/77 (29%)	0,57
Campbell y col. 2005 (n=776)	Al diagnóstico			
	Arterial	38/414 (9,2%)	24/362 (6,6%)	0,2
	Venosa	11/414 (2,7%)	2/362 (0,55%)	0,04
	Seguimiento			
	Arterial	25/414 (6%)	21/362 (5,8%)	0,8
	Venosa	12/414 (2,9%)	4/362 (1,1%)	0,06
Cheung y col. 2006	Sin trombosis	16/29 (62%)	8/31 (25,8%)	0,009
	Previo diagnóstico	11/29 (37,9%)	3/31 (9,7%)	
	Seguimiento	7/29 (24,1%)	5/31 (16,1%)	NS
	Arterial	20/29 (69%)	13/31 (41,9%)	
	Venosa	7/29 (24,1%)	2/31 (6,5%)	NS
Antonili y col. 2005	Sin trombosis	17/74 (17,6%)	13/56 (23,2%)	NS
Heller y col. 2006	Sin trombosis	11/24 (46%)	1/26 (4%)	0,0006

NS: No significativo

Es interesante, por otro lado, la asociación de la mutación JAK2 V617F con la aparición de episodios trombóticos en localizaciones atípicas; de hecho, un 58% de los síndromes de Budd-Chiari idiopáticos van a presentar dicha mutación, en ausencia de otras características clínicas o hematológicas propias de una NMPc. Esta mutación también ha sido identificada en un 18-35% de pacientes con trombosis de las venas portal o mesentérica [93]. En este sentido, se ha sugerido que la mutación JAK2 V617F podría actuar como un marcador diagnóstico de formas “latentes” u “ocultas” de NMPc.

Ha sido también analizada la influencia de JAK2 V617F en la afectación biológica del sistema hemostático. Esta mutación se ha relacionado con una mayor activación plaquetaria, con un aumento de la expresión de la selectina-P tanto basal como tras estimulación con ácido araquidónico (AA) [94], observándose posteriormente y de acuerdo con estos primeros resultados, un efecto dosis de su carga alélica sobre parámetros de activación plaquetaria (selectina P soluble y CD40 ligando soluble) [95,96] y un mayor porcentaje de complejos leucoplaquetares en los pacientes con la mutación [97]. Por otro lado, la presencia de JAK2 V617F se ha relacionado también con una mayor activación leucocitaria, tanto en neutrófilos (con un aumento de la fosfatasa alcalina granulocitaria y de CD14, como un incremento del porcentaje de complejos neutrófilos-plaquetas) [97,98], como en monocitos, con mayor expresión de CD11b y de factor tisular (FT) tras estimular con lipopolisacárido (LPS) [94].

Junto a estos resultados, y a favor del posible papel protrombótico de la mutación, se ha descrito también un aumento de la resistencia a la proteína C activada adquirida en pacientes con PV y TE JAK2 V617F positivos, especialmente en homocigotos [99], junto con una mayor concentración plasmática de FT y menor concentración de proteína S, factor II, factor V e inhibidor de la ruta del factor tisular [99,100].

5.4. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

En NMPc (PV y TE) es controvertido hasta ahora el papel que podrían estar jugando en el desarrollo de trombosis los factores de riesgo cardiovasculares (hipertensión arterial -HTA-, tabaquismo, diabetes mellitus -DM- e

hipercolesterolemia); en parte la variabilidad en cuanto a los resultados puede deberse al escaso número de pacientes incluidos en los trabajos publicados.

En TE, mientras un trabajo retrospectivo señala sólo la hipercolesterolemia como un factor de riesgo independiente en estas complicaciones [61], otro estudio identifica sólo al tabaquismo como factor de riesgo [101]. Adicionalmente, diferentes estudios no confirman las diferentes asociaciones encontradas en los trabajos previos [62,63,102].

En PV, la influencia que pudieran ejercer los factores de riesgo cardiovasculares clásicos ha sido analizada recientemente en el estudio ECLAP [87], donde se estudian 1636 pacientes con PV, observándose en el análisis multivariado cómo el tabaquismo aumenta de manera independiente el riesgo de desarrollar complicaciones trombóticas arteriales ($p= 0,012$), no describiéndose el mismo efecto para la HTA [65], de manera similar a lo descrito también recientemente en TE [89].

5.5. POLIMORFISMOS HEMOSTÁTICOS

Existe un amplio número de trabajos que muestran el efecto de polimorfismos hemostáticos funcionales en el desarrollo de eventos trombóticos, aunque se desconoce cuál es su verdadera relevancia en pacientes diagnosticados de NMPc. Esto se debe, a que los estudios publicados en esta patología hasta ahora, incluyendo en general un escaso número de pacientes reclutados presentan en ocasiones, resultados contradictorios.

Hay dos estudios prospectivos con pocos pacientes ($n=43$ y 42 , respectivamente) [103,104] diagnosticados de TE, que evalúan la frecuencia de polimorfismos protrombóticos como el factor V Leiden, la protrombina G20210A

y la metilene tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), no encontrándose correlación entre estos determinantes genéticos y las complicaciones trombóticas. Sin embargo, posteriormente, se han publicado otros trabajos donde se recluta un mayor número de pacientes (178 PV y 126 TE) observándose una mayor incidencia de trombosis venosas en el grupo de portadores de la mutación del factor V Leiden [105], aunque no de trombosis arterial [106]. Recientemente aparece publicado un trabajo en el que se incluyen 132 pacientes con TE en los que se observa que la mutación del factor V Leiden o la protrombina G20210A aumenta el riesgo de desarrollar una trombosis en el subgrupo de pacientes con la mutación JAK2 V617F [107].

5.6. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDOS

Respecto a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos en NMPc, a pesar del reducido número de pacientes incluidos en estos estudios, se describe una mayor prevalencia de éstos en pacientes con TE (22%) [108] y una asociación entre este factor y una mayor incidencia de trombosis [109], aunque las limitaciones de estos trabajos no permiten establecer conclusiones definitivas.

5.7. GRUPO SANGUINEO ABO

Son numerosos los estudios publicados que demuestran que los individuos del grupo no-O presentan un riesgo significativamente mayor de presentar fenómenos trombóticos tanto venosos (TVP, TEP) [110-115] como arteriales (IAM, enfermedad vascular periférica) [116]. Por el contrario, las diátesis hemorrágicas son más frecuentes en individuos del grupo O [117]. Este mayor

riesgo trombótico de los individuos del grupo no-O, se ha explicado por presentar niveles más elevados de Factor von Willebrand (FvW) (aproximadamente un 25% más); sin embargo el mecanismo por el cual el grupo sanguíneo ABO determina estos niveles de FvW no es del todo claro [118].

Por ahora no existe publicado ningún estudio en el que se investigue el papel que pudiera estar jugando el grupo sanguíneo ABO en el desarrollo de eventos trombóticos en NMPc.

6. ETIOPATOGENIA DE LA TROMBOSIS EN NMPc

La patogenia de la trombosis en estas entidades es difícil de definir, pero parecen estar implicados numerosos y diferentes factores como el aumento de la masa celular (en PV), la masa plaquetaria, la activación de leucocitos y plaquetas y la formación de complejos leucoplaquetares, así como factores endoteliales y protrombóticos circulantes.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la potencial influencia de la mutación JAK2 V617F en la patogenia de la trombosis, como se expondrá a continuación.

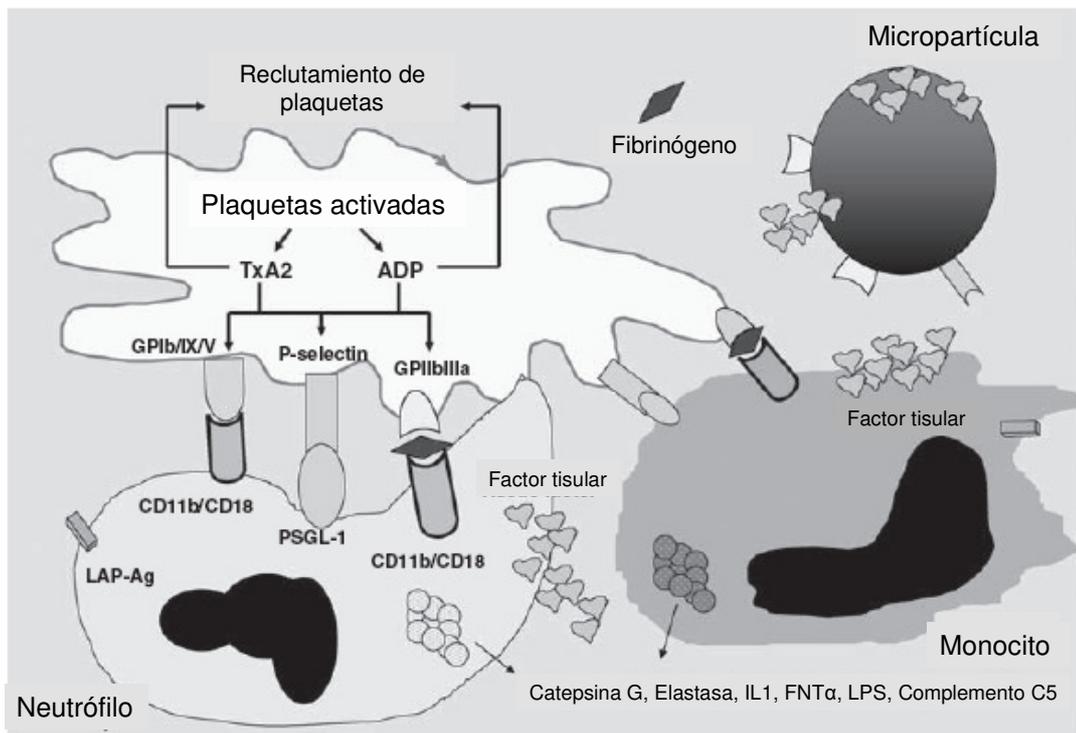


Figura 3. Mecanismos que promueven la interacción de plaquetas, neutrófilos y monocitos y la producción de sustancias protrombóticas en NMPc. Adaptado a partir de Landolfi y col. [67]

6.1. PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN LA PATOGENIA DE LA TROMBOSIS EN NMPc

La afectación clonal de la línea megacariocítica tiene repercusión sobre las alteraciones morfológicas, metabólicas y funcionales que presentan las plaquetas en las NMPc [119]. Así, se ha sugerido la participación de las plaquetas en el desarrollo de los eventos trombóticos en base a:

- a/ Estudios histológicos que muestran cómo la eritromelalgia resulta del depósito de microagregados plaquetarios en la microcirculación, y la respuesta excelente a la administración de aspirina [62].
- b/ La disminución de la cifra de plaquetas con el uso del tratamiento citorreductor disminuye la incidencia de trombosis [120].

c/ El beneficio del uso de tratamiento antiagregante en la disminución del riesgo de sufrir eventos cardiovasculares [68].

6.1.1. Cifra de plaquetas

Como se ha comentado, en NMPc, la trombocitosis severa ($> 1000 \times 10^9/L$) se asocia más a fenómenos hemorrágicos que a eventos trombóticos [121], por el posible desarrollo de una EvW adquirida [122].

Respecto a la trombocitosis *per se*, no existe una correlación obvia con el riesgo de complicaciones vasculares mayores, aunque se ha descrito una mejoría clínica de las alteraciones de la microcirculación y/o de la función de las plaquetas tras el control de la trombocitosis [78,123]. En PV, en el estudio PVSG, el recuento de las plaquetas no se relacionaba con la ocurrencia de complicaciones trombóticas, como tampoco en el estudio ECLAP [124]. En TE, el ensayo conocido como MCR-PT1 (*Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1*), distribuyó de forma aleatoria a 809 pacientes con TE de alto riesgo para recibir hidroxiurea o anagrelida, además de dosis bajas de aspirina; a pesar de recuentos de plaquetas similares, los pacientes con hidroxiurea tenían una probabilidad menor de desarrollar trombosis arteriales o muerte de origen vascular que los pacientes en tratamiento con anagrelida; sin embargo, la frecuencia de trombosis venosa se redujo de forma significativa en aproximadamente un 25% en el segundo grupo [125]. Al igual que en TE, en PV el tratamiento citorreductor disminuye la incidencia de trombosis [68], lo que en su conjunto sugiere que el efecto beneficioso de este fármaco, adicionalmente a la reducción de cifras de plaquetas, pudiese deberse al efecto mielosupresor con disminución de la cifra de hematocrito y leucocitos [120].

Además, recientemente ha aparecido publicado un trabajo en el que se incluyeron 1063 pacientes con TE, observándose que una cifra de plaquetas al diagnóstico superior a $1000 \times 10^9/L$ se acompaña de un riesgo bajo de desarrollar fenómenos trombóticos [126].

Considerados en su conjunto, estos datos no parecen ir a favor de la relación entre trombocitosis y desarrollo de trombosis, pero no alteran el valor de diversas líneas de evidencia que apoyan la contribución de las plaquetas al riesgo trombótico.

6.1.2. Alteración funcional de las plaquetas

Han sido descritas diferentes alteraciones en las glicoproteínas (GP) de la membrana y receptores plaquetarios tales como, una disminución de la expresión de GPIb (receptor de FvW), GPIIb/IIIa (receptor de fibrinógeno), y un aumento de la expresión de la GPIV (receptor de trombospondina y colágeno) [67,127,128], pero sin una correlación con suficiente consistencia entre estas alteraciones y la clínica de los pacientes con TE y/o PV. Se han estudiado también diferentes polimorfismos de las GP buscando su asociación en estos pacientes con mayor presencia de trombosis; hasta la fecha sólo la presencia del alelo HPA-1b de GPIIIa se ha asociado con un incremento del riesgo de trombosis arterial en PV [103], resultado que necesita ser validado con estudios en los que se incluyan más pacientes.

Aproximadamente dos terceras partes de los pacientes con TE tienen pruebas de agregación plaquetaria defectuosas [129,130]. La respuesta a la epinefrina es la más frecuentemente afectada; por el contrario es raro detectar un defecto de la respuesta al ácido araquidónico (AA) en ausencia de ingesta de aspirina.

Estas respuestas defectuosas se han relacionado fundamentalmente con dos alteraciones diferentes:

a/ Disminución o ausencia de los receptores para la epinefrina o el colágeno.

b/ Presencia de un defecto de almacenamiento de contenido granular.

Ningún estudio hasta ahora, ha relacionado los defectos de agregación, la prolongación del tiempo de hemorragia ni el sangrado en pacientes con TE [131]. Por ello, es posible que los defectos de agregación no justifiquen por sí mismos la diátesis hemorrágica, que podría estar más relacionada con tratamientos antiagregantes, o con el desarrollo de una EvW adquirida [84]. La teoría más aceptada defiende la existencia de plaquetas hipersensibles en circulación que condicionaría pequeños agregados en los vasos más distales con la secreción del contenido granular; a esto seguiría una desagregación, que daría como resultado plaquetas circulantes “gastadas” y degranuladas, con una disminución funcional detectable en las pruebas de agregación [84].

En este sentido, en TE el análisis de la síntesis de metabolitos finales del ácido araquidónico (AA) objetiva un incremento en la producción de metabolitos activos, específicamente el tromboxano B₂ (TxB₂), lo que parece reflejar la hiperactividad plaquetaria [84,131]. También apoya una mayor activación *in vivo* de las plaquetas la demostración de incrementos en los niveles plasmáticos de factor 4 plaquetario o de β-tromboglobulina [84].

En PV, las anomalías funcionales plaquetarias son muy similares a las descritas para la TE [84], con mayor generación de TxA₂, lo que tampoco se correlaciona con las complicaciones hemorrágicas. Los niveles altos del hematocrito parecen influir en el deterioro de la agregación; se ha observado

cómo las pruebas de agregación inicialmente alteradas pueden corregirse cuando el hematocrito se normaliza [84].

La mayor activación *in vivo* de las plaquetas en NMPc puede condicionar un efecto trombogénico al interactuar con leucocitos y células endoteliales [84,119]. La sobreexpresión de la selectina-P y de la trombospondina, procedentes de los gránulos α , en la membrana plaquetaria, da lugar a la formación de agregados leucoplaquetares. Las plaquetas activadas tienen un efecto directo sobre la producción por las células endoteliales de la proteína 1 quimiotáctica de los monocitos, y de moléculas de adhesión; la adhesión de monocitos y plaquetas puede modificar las funciones de ambos, induciendo la activación de plaquetas con un aumento en la producción del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y en la expresión del FT de los monocitos.

El PFA-100 (Platelet function analyzer) es un método semiautomático que valora la función de las plaquetas que ha sido poco empleado en el análisis de las trombopatías asociadas a NMPc. Aproximadamente un 75% de pacientes con TE van a presentar resultados con el PFA-100 alterado, tanto al usar cartuchos con Colágeno/ADP (Col/ADP) como con Colágeno/Epinefrina (Col/EPI); la mayor alteración se encuentra al usar Col/EPI, ensayo que se encuentra prolongado en más de un 65% de los pacientes [129]. Un único trabajo ha analizado el tiempo de obturación (TO) en relación con la presencia o no de la mutación JAK2 V617F, no encontrando diferencias significativas [97].

6.2. PAPEL DE LOS LEUCOCITOS EN LA PATOGENIA DE LA TROMBOSIS EN NMPc

La relación de los leucocitos con la trombogénesis y con el daño endotelial ha sido objeto de estudio en distintos procesos (como en IAM y en accidente cerebro-vascular) [132,133]. Los neutrófilos activados pueden afectar a la hemostasia con la producción de sustancias oxidantes y por su interacción con plaquetas, monocitos y células endoteliales. Los neutrófilos activados liberan citocinas (G-CSF y GM-CSF), factor de necrosis tumoral (FNT) y moléculas de adhesión; liberan también proteasas intracelulares (elastasa y catepsina-G), que pueden actuar sobre las células endoteliales y las plaquetas, modificando el balance hemostático hacia un estado protrombótico y desencadenando reacciones de oxidación que inducen daño endotelial.

La adhesión de los leucocitos a las plaquetas se hace inicialmente a través de la selectina-P plaquetaria y su ligando leucocitario (PSGL-1) y posteriormente los leucocitos se unen, a través de las moléculas de adhesión CD11b/CD18, con las GP de membrana GPIb y GPIIb/IIIa, dando lugar a los agregados leucocitos/plaquetas, que se unen a la pared del vaso (a través del ICAM-1 endotelial) y se asocian a riesgo trombótico (Figura 3).

En los pacientes con TE y PV existe una activación leucocitaria con un aumento en la expresión de moléculas de adhesión CD11b/CD18 y de la selectina-L [134,135]. Esta activación de los neutrófilos va acompañada de un aumento de elastasa y mieloperoxidasa en plasma y una liberación de trombomodulina y FvW endoteliales [135]. La expresión de CD11b/CD18 en neutrófilos y monocitos disminuye en pacientes tratados con aspirina, lo que va a favor de la activación de neutrófilos secundaria a la activación plaquetaria [86]. Los pacientes con TE, además de un incremento en parámetros de activación plaquetaria (selectina-P), leucocitaria (CD11b, CD18) y de formación

de complejos leucoplaquetares, exhiben una mayor expresión de FT en monocitos [94].

Respecto a la relevancia de de la mutación JAK2 V617F en parámetros de activación celular en pacientes con NMPc se han publicado diferentes trabajos abordando este asunto [94-96,98], con resultados que irían a favor de una mayor activación leucocitaria y plaquetaria en aquellos pacientes que presentan dicha mutación, como se ha comentado previamente (Apartado 5.3).

Muy recientemente, Pieri y col. [136], han estudiado por primera vez, el papel que podrían estar jugando los basófilos y mastocitos en NMPc y su relación con la presencia de JAK2 V617F; concretamente estudian un grupo de pacientes con PV observando un aumento en la activación de los basófilos de forma basal y tras su estimulación y su correlación con el porcentaje de alelo mutado de JAK2 V617F. La carga mutacional también se ha correlacionado en este trabajo con la presencia de prurito acuógeno, tan característico en este grupo de pacientes, datos que apoyarían la participación de la mutación JAK2 V617F en la activación celular descrita en NMPc y su posible implicación en el desarrollo de fenómenos trombóticos.

6.3. PAPEL DEL HEMATOCRITO EN LA PATOGENIA DE LA TROMBOSIS EN NMPc

En PV se ha demostrado que valores elevados de hematocrito se relacionan con un mayor riesgo de sufrir episodios trombóticos, por un aumento de la viscosidad sanguínea [137]. En los pacientes con PV sin tratamiento la mayoría de los fenómenos trombóticos tienen lugar en el territorio cerebrovascular, especialmente sensible a la hiperviscosidad sanguínea [138].

También, tanto en TE como en PV, se han descrito cambios bioquímicos y del contenido de la membrana de los glóbulos rojos [139]; estas alteraciones pueden de forma independiente, alterar el flujo sanguíneo con la formación de agregados de glóbulos rojos obstruyendo el flujo sanguíneo en los pequeños vasos, contribuyendo al desarrollo de isquemia e infarto, especialmente en el flujo sanguíneo cerebral. Además, la formación de estos agregados facilita la formación de complejos leucoplaquetares, interaccionando con la pared del vaso [140]. Sin embargo las poliglobulias secundarias, a igualdad de hematocrito, exhiben un menor riesgo trombótico, y en las NMPc la terapia citorreductora es más eficaz que las sangrías para prevenir los fenómenos trombóticos, lo que hace sospechar tanto alteraciones cuantitativas como cualitativas en glóbulos rojos y otros elementos celulares en estas enfermedades.

7. IMPLICACIONES DE LA CARGA ALÉLICA DE JAK2 V617F EN EL PERFIL CLÍNICO DE LAS NMPc

Los estudios iniciales distinguían entre individuos positivos/negativos para la mutación JAK2 V617F e individuos heterocigotos u homocigotos. Trabajos posteriores han evidenciado una mayor complejidad, al demostrar que en un mismo individuo pueden existir células en heterocigosis, en homocigosis y no mutadas; por dicho motivo, es más correcto emplear el término de carga celular de alelo mutado [141].

7.1. TE y MFP: IMPLICACIÓN DE LA PRESENCIA/ AUSENCIA DE LA MUTACIÓN JAK2 V617F

Ha sido en TE donde se han publicado y estudiado más trabajos acerca de las implicaciones de la presencia de la mutación JAK2 V617F; así, de acuerdo con la presencia/ausencia del alelo JAK2 V617F, la TE se ha dividido en dos subtipos. Los pacientes que presentan la mutación se caracterizan por presentar niveles más elevados de hemoglobina, más leucocitosis y menor cifra de plaquetas; además se ha descrito un mayor riesgo de trombosis venosas y una médula hipercelular con una mayor activación de la mielopoyesis [142]. Aún así, su relación con el desarrollo de trombosis es controvertida. Por lo tanto las TE JAK2 V617F positivas presentan características que se acercan más a las de PV.

En MFP, la presencia de la mutación JAK2 V617F se ha asociado con una mayor leucocitosis y menor supervivencia [143]; sin embargo, en otro trabajo el cambio génico no tuvo impacto en el último parámetro, pero sí que se asoció a una mayor incidencia de trombosis [144]. En un estudio más reciente se observó cómo la presencia de la mutación se relacionó con niveles de hemoglobina más elevados, mayor leucocitosis y mayor mortalidad [145]; sin embargo ninguno de estos resultados fueron confirmados por Tefferi y col. [146] en un estudio posterior. Por lo tanto en MFP, la implicación pronóstica del alelo JAK2 V617F continúa estando debatida.

7.2. HOMOCIGOTOS VS. HETEROCIGOTOS PARA LA MUTACIÓN JAK2 V617F

El estado mutacional se ha definido semicuantitativamente en base a la cantidad de alelo mutado; así la presencia de más de un 50% del alelo JAK2 V617F se considera como homocigosis.

El estudio más amplio ha sido el publicado por Vannucchi y col. [147], en el que se reclutaron 323 pacientes con PV (67,8% heterocigotos y 32,2% homocigotos) y 639 con TE (40,2% negativos para la mutación JAK2 V617F, 57,7% heterocigotos y 2,1% homocigotos). Tanto en PV como en TE los homocigotos presentaban un aumento de la mielo y eritropoyesis, mientras que la cifra de plaquetas era inferior comparada con los individuos heterocigotos. Los pacientes homocigotos presentaban una mayor incidencia de esplenomegalia y mayor uso de tratamiento citorreductor y sufrían un mayor riesgo de transformación fibrótica que los heterocigotos. En PV, los pacientes homocigotos exhibían también una mayor presencia de prurito (42%).

En los pacientes homocigotos con TE se observó una mayor incidencia de trombosis, sin embargo en PV no se encontró tal diferencia. Así los pacientes con TE homocigotos presentaban un riesgo 3,97 veces mayor a un individuo sin la mutación de sufrir un evento trombótico; la asociación significativa encontrada entre la homocigosis y una mayor incidencia de fenómenos cardiovasculares en TE, se mantuvo tras realizar el análisis multivariado, que incluía los ya establecidos como factores de riesgo (edad e historia previa de trombosis) [148] y otros más novedosos como la leucocitosis ($>8,7 \times 10^9/L$) [86].

Otro trabajo abordó esta cuestión en pacientes con MFP, incluyendo 193 pacientes JAK2 V617F positivos (84 homocigotos y 109 heterocigotos) [145]; los individuos homocigotos presentaban de forma estadísticamente significativa mayor leucocitosis, más esplenomegalia y mayor necesidad de iniciar

tratamiento citorreductor; se observó que existía un 10% de pacientes heterocigotos para JAK2 V617F que evolucionó a homocigosis, fenómeno que se ha interpretado como un factor pronóstico en cuanto a la evolución (mayor severidad clínica, y transformación leucémica), lo que no ha sido confirmado en otros trabajos [149].

7.3. CUANTIFICACIÓN DEL ALELO MUTADO JAK2 V617F Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS

Se ha investigado si la carga alélica se podría correlacionar con diferencias clínicas y un mayor riesgo de desarrollar complicaciones trombóticas en pacientes con NMPc.

En PV, Vannucchi y col. [150] publicaron en 2007 un trabajo que incluía 173 pacientes, seguidos prospectivamente, en los que se determinó la carga alélica al diagnóstico mediante PCR cuantitativa; en este estudio el porcentaje de alelo mutado se correlacionó con mayor eritropoyesis, leucocitosis, así como con una mayor expresión de marcadores de activación leucocitaria. En este mismo trabajo, los portadores de más del 75% de alelos mutados tenían un riesgo más alto de complicaciones trombóticas mayores durante la evolución de la enfermedad; además una carga alélica superior al 75% actuaba como un factor de riesgo independiente para iniciar tratamiento citorreductor. También en otro estudio [151] la carga mutacional se asoció no sólo con leucocitosis sino también con la duración de la enfermedad, con el grado de esplenomegalia y una mayor incidencia de trombosis venosas en los individuos que presentaban más del 80% de alelo mutado. Por el contrario Tefferi y col. [152] en un grupo

de 77 pacientes no encontraron relación en el nivel de carga alélica con el nivel de hemoglobina, y sí con la aparición de prurito y trombosis de pequeño vaso.

En pacientes con TE, el estudio que más pacientes incluye es el publicado por Antonioli y col. [153] donde estudiaron 165 pacientes con TE JAK2 V617F positivos; los pacientes que presentaban más de un 25% de alelo mutado tenían mayor riesgo de desarrollar trombosis arteriales al diagnóstico (RR: 3,0) y de presentar fenómenos de pequeño vaso (RR: 2,2).

Los datos en MFP son más escasos y controvertidos; así, en un estudio en el que se incluyeron 129 pacientes [146], se observó cómo los pacientes con menor cantidad de alelo mutado presentaban menor supervivencia y un menor tiempo de evolución a leucemia comparados con aquellos con mayor carga mutacional y con los que no presentaban la mutación JAK2 V617F, resultado contrario al reportado previamente [145].

8. TRATAMIENTO

La historia natural de las NMPc conlleva un riesgo de complicaciones vasculares variable y un riesgo a largo plazo de transformación a una fase mielofibrótica o incluso a leucemia aguda. Los tratamientos disponibles hasta ahora no suelen alterar la historia natural de la enfermedad, tan sólo se consigue paliar los síntomas o disminuir el riesgo de complicaciones vasculares.

Tras el diagnóstico de una NMPc, las decisiones tomadas en su manejo clínico se deciden en función del pronóstico global de la enfermedad y del riesgo de complicaciones vasculares. Los pacientes con TE y PV se definen de alto riesgo si han presentado un episodio trombotico previo o si tienen una edad

superior de 60 años; serán pacientes de bajo riesgo aquellos que no cumplen ninguno de los dos criterios previos (y tienen una cifra de plaquetas $<1000 \times 10^9/L$, en TE). Los pacientes de riesgo intermedio carecen de los criterios de riesgo ya descritos pero presentan factores de riesgo cardiovasculares. Los nuevos factores de riesgo descritos recientemente, para el desarrollo de trombosis como la presencia de leucocitosis en el momento del diagnóstico y la carga mutacional alélica JAK2 V617F elevada, no se sabe si deben incluirse o no definitivamente para la estimación del riesgo vascular y se requiere de más estudios.

En MFP están mejor establecidos los modelos pronósticos para supervivencia global, en la que los criterios de Lille (basados en anemia, y la cifra de leucocitos) [154] y a los que posteriormente se añaden, por el grupo de la Clínica Mayo, la trombopenia ($<100 \times 10^9/L$) y la monocitosis ($>1 \times 10^9/L$) [155], tienen importante relevancia clínica. Recientemente, ha aparecido publicada por el IGW-MRT [156] una nueva estratificación de factores pronósticos adversos en la supervivencia, que pretende definir mejor los distintos grupos de riesgo (define hasta cuatro grupos diferentes) para adecuar de esta manera, de forma más selectiva, el tratamiento más eficaz para cada paciente (estos criterios incluyen: edad superior a 65 años, la presencia de síntomas constitucionales, hemoglobina <10 g/dL, una cifra de leucocitos superior a $25 \times 10^9/L$ y más de un 1% de blastos en sangre periférica).

El manejo de los pacientes con PV incluye el control de la eritrocitosis, mediante flebotomías, y cuando no existe contraindicación, el empleo de dosis bajas de aspirina (AAS) tal y como se derivó del estudio ECLAP [157]. Tradicionalmente se ha establecido como criterio de realizar o no flebotomías,

mantener un hematocrito inferior al 42% para las mujeres e inferior al 45% para hombres. Un análisis reciente retrospectivo de las complicaciones trombóticas en los pacientes incluidos en el ensayo ECLAP sugiere que puntos de corte más elevados (hematocritos del 55%) pueden no aumentar el riesgo de complicaciones trombóticas [158].

En cuanto al tratamiento citorreductor, hay ensayos clínicos aleatorizados que han demostrado la utilidad de la hidroxiurea en la prevención de eventos trombóticos en pacientes con TE de alto riesgo [120]. El ensayo del MRC PT-1 comparó de forma aleatorizada la hidroxiurea y la anagrelida en pacientes con TE (con dosis bajas de AAS de forma conjunta con cada uno de ellos), demostrando que la combinación de hidroxiurea y AAS era superior en términos de prevención de trombosis arterial, hemorragia y transformación hacia mielofibrosis post-TE [125]. No existen datos de estudios aleatorizados similares para PV de alto riesgo para el empleo de hidroxiurea u otros fármacos mielosupresores; aún así la hidroxiurea continúa siendo el fármaco más empleado en la práctica clínica. Aunque existen dudas sobre si la hidroxiurea puede acelerar la transformación leucémica de estas enfermedades, ésto no se ha demostrado cuando se emplea como agente único [148].

Recientemente y con el fin de seleccionar una segunda línea de tratamiento tras el fracaso con hidroxiurea, se han elaborado unos criterios de resistencia/intolerancia a ésta, que permiten reconocer a los tres meses de tratamiento la existencia de resistencia; o bien cuando aparecen manifestaciones clínicas inaceptables con cualquier dosis (úlceras maleolares, fibrosis en relación con el fármaco) o la aparición de leucopenia o anemia graves asociadas al tratamiento [159]

En la práctica clínica es también frecuente el uso de anagrelida, cuya principal indicación es en pacientes jóvenes con elevado riesgo trombótico y en aquellos pacientes resistentes a hidroxiurea. La agencia europea del medicamento (EMA) aprobó su uso como segunda línea de tratamiento en pacientes de alto riesgo que no toleran o no reducen la cifra de plaquetas con el tratamiento de primera línea. Sus efectos secundarios más frecuentes son cefalea, palpitaciones y taquicardia [160]. En ensayo del MRC PT-1 [125], anteriormente comentado, demostró que anagrelida era superior a hidroxiurea en la reducción de trombosis venosas y, por otro lado y hasta la fecha, no se ha documentado ningún caso de transformación aguda asociado a éste fármaco [161].

[89]El empleo de Interferon alfa 2a (IFN- α 2a) pegilado es un fármaco activo y mejor tolerado en comparación con el tradicional, sobre todo en pacientes con PV; aún no existen estudios que comparen de forma aleatorizada el empleo de hidroxiurea con el IFN. En general, pacientes con NMPc en los que está contraindicado el empleo de hidroxiurea, sobre todo embarazadas con TE que precisen citorreducción, se tratarán con IFN- α .

Importante es también el tratamiento sintomático en estos pacientes:

- Tratamiento del prurito: antihistamínicos y el empleo de inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina.
- Eritromelalgia: AAS.
- Astenia: ningún tratamiento ha demostrado su efectividad, se recomienda el ejercicio físico.
- Citopenias: algunos pacientes se pueden beneficiar del uso de eritropoyetina [162], andrógenos [163] y/o corticoides.
- Esplenomegalia dolorosa: hidroxiurea [164], cladribina [165].

Ningún tratamiento ha demostrado ser curativo, con la excepción del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Entre las NMPc, el trasplante está más indicado en pacientes con MFP de elevado riesgo, por la peor supervivencia de este grupo. Publicaciones recientes describen supervivencias a los tres años del 58%, con una tasa de mortalidad relacionada con el procedimiento del 32% [166]. Dada la alta toxicidad asociada al trasplante alogénico mieloablativo en MFP, se ha ensayado el empleo de acondicionamientos de intensidad reducida [167] lo que ha demostrado una menor mortalidad relacionada con el procedimiento y un rango más amplio de edad de los pacientes que pueden ser sometidos a dicho procedimiento. Sin embargo, aún se asocia con un riesgo elevado de enfermedad de injerto contra huésped (aproximadamente un 33%), y su beneficio depende del pronóstico a largo plazo del paciente.

8.1. NUEVOS TRATAMIENTOS

El grupo de fármacos inmunomoduladores inhibidores de citocinas y antiangiogénicos (IMiD) constituyen una opción terapéutica en MFP y en mielofibrosis post-PV/ TE. Los estudios iniciales usaron la talidomida con dosis inicialmente de 100 mg/día [168] y posteriormente de 50 mg/día con prednisona [169], asociándose a una buena respuesta para la anemia (67%), la trombocitopenia (75%), y la esplenomegalia (33%), sin demostrar ninguna mejoría en la médula ósea o en las alteraciones megacariocíticas.

Posteriormente, ha sido evaluada la lenalidomida, observándose aquí una mejoría en la histología de la médula ósea en algunos de los pacientes

respondedores (4 de los 68 pacientes incluidos) [170]. Con estos resultados se ha puesto en marcha un estudio aleatorizado y controlado con pomalidomida vs. placebo con o sin prednisona, en pacientes con MFP o con Mielofibrosis post-PV/ TE.

Los ensayos con los inhibidores de la tirosin cinasa han tenido resultados modestos [171].

Aunque las alteraciones moleculares hasta ahora identificadas en las NMPc, no explican todas las cuestiones sobre su patogenia, sí pueden proporcionar nuevas dianas terapéuticas [5]. Así, existen publicaciones y numerosas comunicaciones a congresos sobre fármacos en desarrollo que son capaces de inhibir la ruta de JAK2 V617F, así como el fenotipo no mutado de JAK2, como TG101209 [172], Go6976 [173], erlotinib [174], CEP-701 [175]. En células primarias de pacientes con el fenotipo no mutado de JAK2 que tienen c-Mpl W515L/K, puede conseguirse una inhibición del crecimiento similar a las de JAK2 V617F con inhibidores como TG101209 [172]; estudios *in vitro* sugieren también la respuesta en pacientes con mutaciones del exón 12 de JAK2 al inhibidor TG101348 [176]. Aparecen resultados publicados, entre otros, del inhibidor ICNB018424 en pacientes con MFP y Mielofibrosis post-PV/TE, consiguiendo una disminución de la esplenomegalia, los síntomas constitucionales y reducción del porcentaje de alelo mutado, aunque el tratamiento no está exento de efectos secundarios como la trombopenia [177]. Todo esto sugiere la posibilidad de que en los pacientes con NMPc con fenotipo no mutado de JAK2 exista una dependencia de la vía JAK-STAT para el crecimiento celular, y los agentes dirigidos contra esta vía pueden ser activos independientemente del estado mutacional de JAK2.

9. PRONÓSTICO

Mientras que la MFP se ha asociado a una disminución de la esperanza de vida [154,178-185], la TE afecta más a la calidad de vida de los pacientes que a su supervivencia, mientras que la PV se ha asociado tanto a una mayor morbilidad, como a una menor esperanza de vida [66,186,187].

9.1. MIELOFIBROSIS PRIMARIA

La mediana de supervivencia oscila entre 4 y 5,5 años en las series más recientes [154,178-185] .

Las causas de muerte más frecuentes entre estos pacientes son la evolución a leucemia aguda, las infecciones y sangrados secundarios a un fallo medular, al desarrollo de hipertensión portal o a un fallo hepático secundario a trombosis hepática/esplenoportal, trombosis en otros territorios y fallo cardíaco [155,188].

9.2. TROMBOCITEMIA ESENCIAL Y POLICITEMIA VERA

En un estudio que incluía un total de 831 pacientes (TE y PV), con un seguimiento de 10 años, se observó que la esperanza de vida de los pacientes con PV era inferior al de la población control, mientras que era similar para los pacientes con TE [189]; un estudio posterior de la Clínica Mayo con 322 pacientes diagnosticados de TE, confirmó estos resultados para los primeros diez años desde su diagnóstico, pero mostró como tras la segunda década de evolución de la enfermedad la supervivencia disminuía. [89]

La supervivencia de pacientes con PV y TE, viene marcada mayoritariamente por complicaciones relacionadas con la propia enfermedad como la aparición

de fenómenos vasculares (trombosis y hemorragia) y con la transformación a mielofibrosis o a leucemia. La incidencia de la aparición de estas complicaciones varía también en función de la enfermedad; así los pacientes con PV presentan una mayor incidencia de fenómenos trombóticos y de evolución a mielofibrosis o a leucemia, que los pacientes con TE [88,189-191]. En PV la incidencia de trombosis es de aproximadamente 1,8% personas/año y de un 0,5% personas/año de transformación a mielofibrosis o leucemia; en los pacientes con TE, la incidencia de trombosis es de 1,2% personas/año, con evolución de 0,16% personas/año a mielofibrosis y 0,12% personas/año a leucemia [192,193].

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Trabajos recientes han sugerido un papel del componente celular (hematíes, plaquetas y leucocitos), de marcadores genéticos y de proteínas anticoagulantes en la patogenia de la trombosis en pacientes con TE o PV, pero muchos de ellos no han sido validados y así los datos son escasos y contradictorios. Los estudios de estas variables en la patología hemorrágica es aún más limitada. Nuestra hipótesis es que se podrían buscar y definir biomarcadores de riesgo de trombosis y de hemorragia, tanto a nivel celular, plasmático, como genético, que ayudarían a trazar el perfil individual de riesgo de complicaciones hemostáticas, que constituyen la principal causa de morbimortalidad en estos pacientes.

OBJETIVOS

1.- ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS MODIFICACIONES MOLECULARES DE PROTEÍNAS HEMOSTÁTICAS Y FACTORES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO DE TROMBOSIS/ HEMORRAGIA EN NMPc Ph(-)

2.- ANALIZAR EN NUESTRA SERIE EL PAPEL DE LA ACTIVACIÓN Y RECUENTO LEUCOCITARIO EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL COMO FACTOR DE RIESGO TROMBÓTICO/ HEMORRÁGICO

3.- VALORAR LA FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA Y LA REACTIVIDAD A EPINEFRINA EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL

PACIENTES Y MÉTODOS

I. Primer objetivo: ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS MODIFICACIONES MOLECULARES DE PROTEÍNAS HEMOSTÁTICAS Y FACTORES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO DE TROMBOSIS/ HEMORRAGIA EN NMPc Ph(-)

1. PACIENTES Y CONTROLES

Se incluyeron un total de 219 pacientes provenientes del Hospital J.M. Morales Meseguer de Murcia y del Hospital del Mar de Barcelona (en colaboración con el Dr C. Besses), 95 hombres y 124 mujeres, con una media \pm DE de edad de 63,5 \pm 16,5 años y una mediana de seguimiento de cinco años con el diagnóstico de NMPc Ph(-) (136 con TE, 73 con PV, y 10 con MFP).

Los pacientes fueron diagnosticados siguiendo los criterios de PVSG y/o los de la OMS de 2001.

De estos pacientes fueron incluidos para el análisis de JAK2 V617F y de los polimorfismos hemostáticos 212 pacientes (128 TE, 74 PV, y 10 MFP) 94 hombres, 118 mujeres, con una media \pm DE de edad de 67,0 \pm 13,7 años, con rango de 21–85 años.

Fueron incluidos todos los pacientes (n=219) en el análisis del grupo ABO como factor de riesgo para el desarrollo de trombosis.

2. VARIABLES CLÍNICAS ANALIZADAS

Se revisaron todas las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio recogiendo las siguientes variables clínicas:

2.1. FENÓMENOS TROMBÓTICOS ARTERIALES Y VENOSOS DE

PEQUEÑOS Y GRANDES VASOS DESARROLLADOS AL DIAGNÓSTICO Y/O DURANTE EL SEGUIMIENTO

Como trombosis mayores se han definido: trombosis del sistema nervioso central, incluyendo el accidente cerebrovascular (ACV) y el accidente isquémico transitorio (AIT), trombosis de los vasos de la retina, enfermedades cardiovasculares (angina e IAM) (documentado por elevación de las enzimas y cambios en el electrocardiograma, según criterios de la OMS), trombosis intra-abdominales, como el Síndrome de Budd-Chiari y trombosis del territorio espleno-portal, trombosis periféricas, como la claudicación intermitente de extremidades inferiores, trombosis venosas profundas (TVP) y el tromboembolismo pulmonar (TEP).

Como trombosis menores se han considerado: los casos de eritromelalgia y las tromboflebitis superficiales en extremidades.

No se han incluido como eventos trombóticos los episodios descritos como acroparestesias, tinnitus, mareo o cefalea. Tampoco se consideraron como eventos trombóticos las pérdidas fetales.

2.2. FENÓMENOS HEMORRÁGICOS PREVIOS AL DIAGNÓSTICO Y/O DURANTE EL SEGUIMIENTO

Se han considerado como fenómenos hemorrágicos: sangrados cutáneos espontáneos y en mucosas (incluyendo equimosis, epistaxis, menorragia, gingivorragia) y hemorragia gastrointestinal, sin existir causa subyacente.

2.3. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Se consideran como factores de riesgo cardiovascular adquiridos: la presencia de HTA, hipercolesterolemia, tabaquismo y DM.

2.4. PRESENCIA DE ANTECEDENTES FAMILIARES DE NMPc

Se documentó la existencia de antecedentes familiares de NMPc en relativos de primer grado.

2.5. TRATAMIENTO

Se registró la terapia prescrita a estos pacientes, tanto el tratamiento citorreductor, antiagregante y anticoagulante.

3. VARIABLES BIOLÓGICAS ANALIZADAS:

Las extracciones de sangre se realizaron tras obtener el Consentimiento Informado de cada uno de los pacientes con NMPc. Se extrajo sangre venosa antecubital con un ligero torniquete; tras desechar 4,5 mL de la muestra sanguínea, se llenó un tubo de 4,5 mL que contenían EDTA (sistema vacutainer, Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) y 2 tubos de 4,5 mL que contenía citrato [0,109 M, 3,2%, sistema vacutainer (Becton Dickinson)].

Se realizaron recuentos celulares en un contador celular automático [HmX hematology analyzer (Beckman Coulter, San Jose, CA, EEUU)] de los pacientes y controles incluidos.

La sangre citratada se empleó para la valoración de parámetros coagulométricos analizados en plasma pobre en plaquetas mediante un coagulómetro automatizado (ACL Top, Instrumentation Laboratory -IL-, Milan, Italia):

- TP: Se utilizó una tromboplastina de alta sensibilidad compuesta de factor tisular recombinante humano (ISI= 0,98) (RecombiPlasTin 2G, Hemos IL™, Madrid). En el test de TP, la adición del reactivo al plasma del paciente, en presencia de iones calcio, inicia la activación de la vía extrínseca de la coagulación con la conversión del fibrinógeno en fibrina, y la formación de un gel sólido. Los valores de referencia de normalidad de nuestro laboratorio se consideran con una ratio de 0,8 a 1,2.

- TTPa: El test de tromboplastina parcial activada utiliza un activador de contacto (sílica) que estimula la producción de factor XII_a. Dicho activador proporciona una superficie de contacto ideal que permite actuar funcionalmente al quinínogeno de alto peso molecular, calicreína y al factor XI_a. Esta activación por contacto se realiza a 37°C. La adición de cloruro cálcico desencadena las reacciones posteriores que producirán la formación del coágulo. Los fosfolípidos son necesarios para la formación de los complejos que activarán al factor X y a la Protrombina. El reactivo TTPa utilizado, APTT-SP (Hemos IL™) contiene fosfolípidos sintéticos y sílica que aseguran una muy alta reproducibilidad y una gran estabilidad del producto. El rango de valores considerado como normales es de 25,4 a 36,9 segundos.

- Dímero D: Se emplea el reactivo Látex Dímero-D HS Fibrinógeno-C (Hemos IL™), suspensión de partículas de látex de poliestireno de tamaño uniforme, a las que se les ha unido el fragmento F(ab') de un anticuerpo monoclonal

altamente específico contra el dominio Dímero D contenido en los derivados solubles de la fibrina. Cuando se mezcla un plasma con el reactivo Látex y el Tampón de reacción (Hemos IL™), las partículas aglutinan de forma directamente proporcional a la concentración de Dímero-D contenida en el plasma; los agregados causan un descenso de la luz transmitida (inmunoensayo turbimétrico). Se consideran valores normales de 0 a 234 ng/mL.

- Fibrinógeno: Se llevó a cabo la determinación cuantitativa de fibrinógeno por el método de Clauss. El Test Fibrinógeno-C (Hemos IL™) utiliza un exceso de trombina para convertir el fibrinógeno en fibrina en plasma diluido; a concentraciones altas de trombina y bajas de fibrinógeno el nivel de la reacción está en función de la concentración de fibrinógeno. Se consideran valores normales en el rango 238-498 mg/dL.

- Factor VIII: La actividad del Factor VIII en el plasma del paciente se determina llevando a cabo una prueba modificada del TTPa. El plasma del paciente se diluye y se añade a un plasma deficiente en Factor VIII (Hemos IL™). La corrección del tiempo de coagulación prolongado del plasma deficiente es proporcional a la concentración (% actividad) del factor en el plasma del paciente, que se obtiene a partir de una curva de calibración. Se consideran valores dentro de la normalidad una actividad del FVIII del 50-150% (0,50-1,50 UI).

- Factor von Willebrand antigénico (FvW:Ag): Para cuantificar el FvW:Ag se empleó una técnica de inmunoturbimetría amplificada con partículas de látex. La mezcla de un plasma que tiene FvW:Ag con el Reactivo Látex (Hemos IL™) al que se ha unido un anticuerpo específico contra FvW y el Tampón de

reacción (Hemos IL™) indica una aglutinación de las partículas de látex directamente proporcional a la concentración de FvW:Ag contenida en el plasma y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causado por los agregados.

Se consideran como valores normales, en individuos del grupo O un rango 42,0%-140,8%, y en individuos con grupos A, B o AB con rango: 66,1%-176,3%.

4. GENOTIPADO DE LOS PACIENTES CON NMPc

4.1. PURIFICACIÓN DE ADN

Para la purificación de ADN se extrajo un tubo de sangre anticoagulado con EDTA

4.1.1. Purificación de ADN total

El ADN se extrajo usando un Kit comercial (Qiagen Iberia SL, Madrid); para la obtención de ADN total se siguieron los siguientes pasos: a 300 µL de sangre total se le añadieron 900 µL de tampón de lisado de hematíes, incubando 3 minutos y centrifugando posteriormente durante 5 minutos a 340 x *g* para recuperar las células blancas. Tanto para la obtención de ADN total como granulocítico, posteriormente se añadieron 300 µL de un tampón de lisis celular al tapón celular, incubándolo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a continuación 100 µL de solución de precipitación de proteínas centrifugando durante 5 minutos a 10000 x *g*; el sobrenadante se mezcló con

500 μ L de isopropanol centrifugando a 10000 x *g* otros 5 minutos, añadiendo posteriormente 500 μ L de etanol al 70% y volviendo a centrifugar a 10000 x *g* durante 5 minutos. Finalmente el "pellet" o tapón se resuspendió en 50 μ L de tampón 10 mM Tris pH 8,0.

4.1.2. Purificación de ADN granulocítico

4.1.2.1. Separación de granulocitos

A los 4,2 mL restantes de sangre se añadió 1 ml de metilcelulosa al 1% (en tampón salino) incubando a temperatura ambiente durante 45 minutos, precipitando de este modo los hematíes; el sobrenadante se mezcló con 2 ml de Ficoll (Sigma, Madrid) atemperado; se centrifugó a 650 x *g* durante 20 minutos a 22°C. Tras la centrifugación, se recuperó el anillo intermedio que contenía los linfocitos, monocitos y plaquetas, así como el "pellet" o tapón que contenía los granulocitos y los hematíes residuales. Los hematíes fueron lisados mediante incubación con 1 mL de tampón de lisis (Becton Dickinson) durante 5 minutos. La muestra se centrifugó a 340 x *g* durante 4 minutos. Finalmente, se eliminó el sobrenadante.

4.1.2.2. Purificación de ADN granulocítico

Se añadieron 300 μ L de un tampón de lisis celular al "pellet" o tapón de granulocitos, incubándolo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a continuación 100 μ L de solución de precipitación de proteínas centrifugando durante 5 minutos a 10000 x *g*; el sobrenadante se mezcló con 500 μ L de isopropanol centrifugando a 10000 x *g* otros 5 minutos, añadiendo

posteriormente 500 μ L de etanol al 70% y volviendo a centrifugar a 10000 x *g* durante 5 minutos. Finalmente el tapón se resuspendió en 50 μ L de tampón 10 mM Tris pH 8.0.

4.2. ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN JAK2 V617F POR PCR Y ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN (ASRA)

La identificación de la mutación JAK2 V617F se llevó a cabo mediante PCR con los oligonucleótidos 5'-GGGTTTCCTCAGAACGTTGA-3' y 5'-TCATTGCTTTCCTTTTTTCACAA-3' usando ADN granulocítico.

Tras un primer ciclo de desnaturalización a 96°C durante 5 minutos se realizaron 45 ciclos de PCR con una temperatura de anillamiento de 57°C, en un termociclador (Robocycler Gradiente 96, Stratagene, La Jolla, CA, EEUU), obteniéndose un fragmento amplificado de 460 pares de bases (pb) que fue digerido con la enzima de restricción BsaXI (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido) durante 4 horas a 37°C. El patrón de restricción fue analizado en un gel de acrilamida al 5% con tinción con plata (Sigma-Aldrich, Madrid); el alelo mutado no se digirió, mientras que el no mutado se digirió en fragmentos de 241 pb, 189 pb y 30 pb [23].

4.3. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS CON TROMBOSIS Y HEMORRAGIA

Se analizaron polimorfismos relacionados con riesgo de TVP (FV Leiden, Protrombina G20210A, y ZPI R67Stop), trombosis arterial (HPA-1 localizado en la GPIIIa, HPA-2 localizado en el receptor del factor von Willebrand GPIb α , GPIa C807T, y PSGL-1 VNTR), o hemorragia (FVII -323 Del/Ins y TUBB1

Q43P localizado en el gen que codifica para una isoforma específica presente en megacariocitos y plaquetas). Para realizar las PCRs se emplearon los oligonucleótidos y las temperaturas de anillamiento descritos en la Tabla 1.

El análisis se llevó a cabo mediante separación de los fragmentos de digestión o de la PCR intacta en geles de poliacrilamida al 5% o 10% y tinción por plata.

4.4. GENOTIPADO ABO

Además de los polimorfismos recogidos en el apartado anterior, también estudiamos, como un posible factor que podría estar implicado en el aumento de la incidencia de eventos trombóticos y/o hemorrágicos en NMPc, el grupo ABO.

Se usó ADN total de los pacientes.

Se realizaron dos PRCs (PCR 1 y PCR 2) usando los pares de oligonucleótidos indicados en la Tabla 2 con las condiciones siguientes:

Tras someter la muestra a 95°C durante 2 minutos, se realizaron 12 ciclos (94°C durante 20 segundos y 65°C durante 90 segundos) seguidos de otros 23 ciclos (94°C durante 30 segundos, 61°C durante 40 segundos y 72°C durante 9 segundos). Finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 3 minutos.

Se mezclaron 3 µL de la PCR 1 con 10 µL de la PCR 2. Esta mezcla se digirió empleando las enzimas de restricción MspI y KpnI [194].

Los productos de digestión se visualizaron en un gel de acrilamida tras una tinción con plata.

La Figura 1 muestra los diferentes patrones de restricción para cada uno de los genotipos ABO.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la caracterización de polimorfismos en trombofilia

Polimorfismo	Secuencia (5'→3')	T ^a Anillamiento	Técnica de restricción o tamaño fragmentos de PCR
FV Leiden	ACCCACAGAAAATGATGCCAG TGCCCCATTATTTAGCCAGGAG	55°C	PCR ASRA (Mnl I)
PT G20210A	TCTAGAACAGTTGCCTGGC ATAGCATCTGGGAGCATTGAAGC	60°C	PCR ASRA (Hind III)
ZPI R67X	GCAGCTGAAGGGAGGCACTC AAGACCATGTTGCCATCGTG	66°C	PCR ASRA (Sat I)
HPA-1	TCTCTCCCATGGCAAAGAGT TTCTGATTGCTGGACTTCTCTT	50°C	PCR ASRA (MspI)
HPA-2	GTC TCC TTCAACCGGCTGACC GCTTTGGTGGGGAAGCTTGACC	59°C	PCR ASRA (AcyI= BsaHI=Hin I)
GP1a C807T	ATGGTGGGGACCTCACAAACAGATT GATTTAACTTTCCGAGCTGCCTTC	57°C	PCR ASRA (Hinf I)
PSGL-1	CCTGTCCACGGATTCAGC GGGAATGCCCTTGTGAGTAA	72°C	PCR por tamaño (A 558pb, B 528pb, C 498pb)
FVII -323 Del/Ins	AGAGCGGACGGTTTTGTT AGGCTCTCTTCAAATAATTACATC	55°C	PCR por tamaño (normal 202pb, mutado 212pb)
TUBB1 Q43P	CAACGAAGCCTACGGTAGGAA TGTCATCGTCCCAGGTTCT	60°C	PCR ASRA (Pvu II)

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la identificación del grupo ABO

Nombre de oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	PCR
mo-46:	CGGAATTCACTCGCCACTGCCTGGGTCTC	1
mo-57:	CGGGATCCATGTGGGTGGCACCCTGCCA	1
mo-71:	GGGCCTAGGCTTCAGTTACTC	2
mo-101:	CGGGATCCCCGTCCGCCTGCCTTGCAG	2

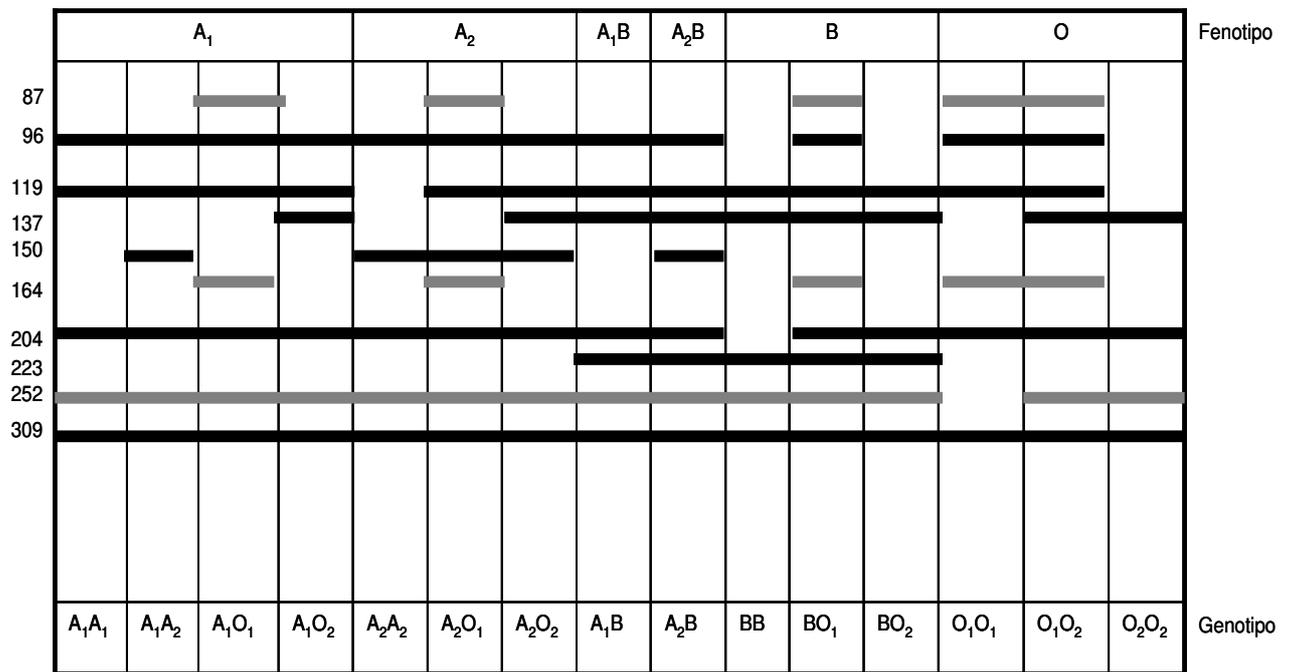


Figura 1. Lectura de geles acrilamida al 5% para la identificación del genotipo ABO. Adaptado a partir de Olsson y col. [194].

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante análisis multivariado usando el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, EEUU) y/o análisis univariado usando el software GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, San Diego, EEUU). En el análisis de variables cualitativas se empleó la χ^2 , mientras que en variables cuantitativas la *t*-student. Los resultados, salvo excepciones, se expresan como media \pm error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0,05$.

II. Segundo objetivo: ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA ACTIVACIÓN Y RECuento LEUCOCITARIO EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL COMO FACTOR DE RIESGO TROMBÓTICO/HEMORRÁGICO

1. PACIENTES Y CONTROLES

1.1. PACIENTES

Para los estudios funcionales, se incluyeron 72 pacientes diagnosticados de TE siguiendo los criterios de PVSG y/o los de la OMS de 2001, con una media \pm DE de edad de 63,2 \pm 19,7 años; 36 eran mujeres y 36 hombres, en cualquier estadio de su evolución. Se valoró la presencia de determinadas variables clínico-biológicas (trombosis, hemorragia, esplenomegalia, recuento hemoperiférico) y los determinantes biológicos expuestos a continuación.

Ningún paciente fue estudiado durante la fase aguda de la trombosis ni del episodio hemorrágico.

En 26 pacientes se analizó la muestra del aspirado medular obtenida al diagnóstico como se detallará a continuación.

1.2. CONTROLES SANOS

Se analizaron en paralelo muestras de controles sanos para cuantificar las variaciones fenotípicas. Se incluyeron 31 voluntarios sanos, con una media \pm DE de edad de 57,7 \pm 18,5 años, entre los que se encontraban trabajadores del Hospital J.M. Morales Meseguer, donantes de sangre y pacientes nuevos

remitidos a consultas de Hematología general en los que se descartó patología. Todos fueron incluidos en el estudio tras obtener su Consentimiento Informado.

2. MUESTRAS DE SANGRE

2.1. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Las extracciones de sangre se realizaron en el laboratorio del Hospital J. M. Morales Meseguer de 8 a 9 horas de la mañana, tras obtener el Consentimiento Informado de cada uno de los pacientes con NMPc y de los controles sanos. Se extrajo sangre venosa antecubital con un ligero torniquete; tras desechar 4,5 mL de la muestra sanguínea, se llenaron 3 tubos de 4,5 mL que contenían citrato (0,109 M, 3,2%, sistema vacutainer, Becton Dickinson), realizándose los estudios de citometría de flujo en la hora siguiente a su extracción.

2.2. MUESTRAS DE SANGRE MEDULAR

Tras realizar un aspirado medular, se resuspendieron 4 mL de sangre medular en 2 mL de medio 199 (Gibco, Life Technologies, Reino Unido) y 5000 UI de Heparina sódica (Rovi, Madrid).

3. ESTUDIOS DE ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

3.1. DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS LEUCOPLAQUETARES

Para la determinación de los complejos neutrófilos-plaquetas y monocitos-plaquetas, utilizamos 50 μ L de sangre total que se incubó con 5 μ L del anticuerpo monoclonal anti GPIIb/IIIa plaquetaria CD42b-FITC (Becton Dickinson) y 5 μ L del anticuerpo panleucocitario CD45-PerCP (Becton Dickinson), de acuerdo con los trabajos previos [195]. Como control negativo se realizó un marcaje en paralelo con una IgG murina-FITC irrelevante y con CD45-PerCP. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, los hematíes fueron lisados durante 3 minutos con solución lisante (Becton Dickinson); las muestras fueron centrifugadas (340 x *g* durante 4 minutos), y resuspendidas en 1 mL de salino.

El análisis se llevó a cabo con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson), adquiriendo un total de 20000 eventos. Los histogramas generados por la fluorescencia PerCP sirvieron para identificar los leucocitos por su positividad para CD45. La discriminación de los neutrófilos y los monocitos se realizó en base a la dispersión característica frontal y lateral de luz, y al grado de positividad para CD45. Los agregados neutrófilos-plaquetas y monocitos-plaquetas fueron considerados como las partículas con perfiles de dispersión frontal y lateral típicas y con expresión de CD42b por encima del control inespecífico.

3.2. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA

Para el estudio de marcadores de activación leucocitaria, se emplearon 50 μL de sangre total incubándose con 5 μL del anticuerpo anti-Mac-1 (CD11b-FITC) (Becton Dickinson), con el anticuerpo dirigido contra el receptor del lipopolisacárido (CD14-FITC) (Becton Dickinson), o con el anticuerpo contra el factor tisular (CD142-PE) (Becton Dickinson), y en todos los casos con el anticuerpo panleucocitario CD45-PerCP.

Se emplearon anticuerpos IgG de ratón inespecíficos marcados con FITC o PE junto con CD45-PerCP para fijar los controles negativos.

Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se lisaron las células con solución lisante (Becton Dickinson) y fueron procesadas como se ha especificado previamente.

Al igual que lo descrito en el apartado anterior, las regiones de neutrófilos y monocitos se seleccionaron para análisis en base a la dispersión frontal y lateral de luz y fluorescencia de CD45.

4. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS CD34

Las células CD34 en médula ósea se cuantificaron según hemos descrito previamente [196].

Para el análisis de las muestras medulares se emplearon $1,5 \times 10^6$ células nucleadas incubándose con 20 μL de CD14-FITC, CD34-PE y CD45-PerCP (Becton Dickinson), o con controles irrelevantes, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se procedió entonces a lisar los hematíes con solución lisante (Becton Dickinson), las muestras se centrifugaron a $340 \times g$ durante 4 minutos, y se resuspendieron en 1 mL de suero salino. La adquisición se realizó con el programa CellQuest en un citómetro de flujo FACScalibur, y el

análisis con el programa Paint-A-Gate, excluyendo las células CD34+/CD14+, CD34+/CD45++, y aquellas con características de dispersión frontal y lateral no características.

El porcentaje de eventos inespecíficos fueron sustraídos en el cálculo del porcentaje de positividad de las células.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante análisis multivariado usando el software SPSS y/o análisis univariado usando el software GraphPad Prism v4.0. En el análisis de variables cualitativas se empleó la χ^2 , mientras que en variables cuantitativas la *t*-student. Los resultados, salvo excepciones, se expresan como media \pm error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0,05$.

III. Tercer objetivo: VALORACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA Y REACTIVIDAD A EPINEFRINA EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL

1. PACIENTES Y CONTROLES

En los estudios funcionales (PFA-100 y citometría de flujo) se incluyeron muestras de los mismos pacientes y controles a los descritos en el Objetivo II.

Para los estudios de agregación y de fosforilación de VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein), incluimos 24 pacientes con TE (11 varones, 13 mujeres con una media de edad \pm DE de 57,2 \pm 19,7 años). Dieciocho (75%) tenían prescrito AAS, con o sin hidroxiurea. Estudiamos 10 voluntarios sanos como grupo control (5 varones y 5 mujeres con una media \pm DE de edad de 45,3 \pm 11,2 años).

2. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Las extracciones de sangre se realizaron de forma similar a la descrita en el apartado para el estudio de activación leucocitaria anterior (segundo objetivo), con 3 tubos de 4,5 mL que contenían citrato [0,109M, 3,2%, sistema vacutainer (Becton Dickinson)]; con estas muestras se realizaban los estudios en la hora siguiente a su extracción.

3. ESTUDIOS DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La sangre citratada se diluyó 1:10 con salino, realizándose el ensayo en sangre total no centrifugada para minimizar la activación [196].

A 5 μ L de sangre total y 45 μ L de salino se le añadieron 5 μ L del anticuerpo anti-GPIIb α plaquetaria CD42-FITC y 5 μ L de anti-selectina-P CD62-PE (Becton Dickinson). Como control, a los 50 μ L de sangre diluida 1:10 se añadieron 5 μ L de CD42b-FITC y 5 μ L de un anticuerpo IgG policlonal inespecífico-PE.

Las muestras se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron en 1 mL de salino y se analizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson).

La población plaquetaria se seleccionó en base a la positividad para el anticuerpo anti GPIIb α (CD42b), y una dispersión frontal y lateral característica, considerando eventos CD62 positivos aquellos con fluorescencia superior al 1% de eventos del control inespecífico.

4. ESTUDIOS DE PFA-100

El PFA-100[®] es un método *ex vivo* alternativo al tiempo de sangría, para el estudio global de la hemostasia primaria. Este se basa en un sistema de flujo sanguíneo sometido a un elevado coeficiente de cizalladura ($5000-6000 \text{ s}^{-1}$), que simula el flujo arteriolar, mediante el paso de sangre total citratada a través de un orificio (147 μ m de diámetro) de una membrana cubierta con agonistas plaquetarios: colágeno+ADP (ADP; 50 μ g) (Col/ADP) o colágeno+epinefrina (EPI; 10 μ g) (Col/EPI). El valor a medir es el tiempo que tarda en obturarse la membrana, o tiempo de obturación (TO).

En nuestro centro, los valores de referencia son 57-100 segundos (para Col/ADP) y 76-131 segundos (para los cartuchos Col/EPI). El alargamiento del TO con Col/EPI detecta disfunción plaquetar inducida por defectos plaquetarios intrínsecos, EvW o agentes antiagregantes plaquetares. La membrana Col/ADP no es sensible a la disfunción plaquetar inducida por aspirina o análogos, lo que permite descartar los alargamientos de Col/EPI debidos a la aspirina. Otros fármacos que interfieren en la función plaquetar por mecanismos diferentes a la aspirina pueden producir TO largos con ambas membranas. Su resultado puede también alterarse por la disminución de la cifra de plaquetas o del hematocrito [197].

5. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

5.1. PREPARACIÓN DE LAS PLAQUETAS

Sangre extraída en citrato se centrifugó a 150 x g durante 12 minutos a temperatura ambiente para recuperar el plasma rico en plaquetas (PRP). El plasma pobre en plaquetas (PPP) preparado mediante centrifugación adicional a 1000 x g durante 10 minutos se utilizó para ajustar la concentración del PRP.

5.2. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

El PRP a $300 \times 10^9/L$ plaquetas se estimuló a 37°C con los siguientes agonistas: ácido araquidónico (AA, 1,6 mM), ADP (10 μ M), epinefrina (EPI, 5 μ M), TRAP (25 μ M). La respuesta de agregación fue registrada durante 300s mediante un

agregómetro (Aggrecoorder II, Menarini Diagnostics, Florencia, Italia) que mide de forma continua el porcentaje de luz transmitida, tras fijar los valores de referencia del PRP (0%) y del PPP (100%).

6. TEST PARA LA DETECCIÓN DE VASP- pSer²³⁹

El test del VASP está diseñado específicamente para la monitorización de los antagonistas específicos del receptor plaquetario del ADP, el P₂Y₁₂ [198]. Tal como muestra la Figura 1, el VASP es una proteína plaquetaria intracelular que no está fosforilada en condiciones basales. Su fosforilación está regulada por la vía del AMPc que se activa por la acción de Prostaglandina E₁ (PGE₁) y se inhibe por el ADP a través de los receptores P₂Y₁₂. En las condiciones de la prueba, la fosforilación del VASP se asocia a la inhibición del receptor P₂Y₁₂, mientras que la forma de VASP no fosforilado se asocia al estado activo del receptor P₂Y₁₂.

Este ensayo se ha empleado fundamentalmente para el análisis de resistencia a las tienopiridinas tales como el clopidogrel. El test del VASP evidencia el efecto de las tienopiridinas por la persistencia de la forma fosforilada del VASP inducido por PGE₁ a pesar de la activación simultánea de ADP.

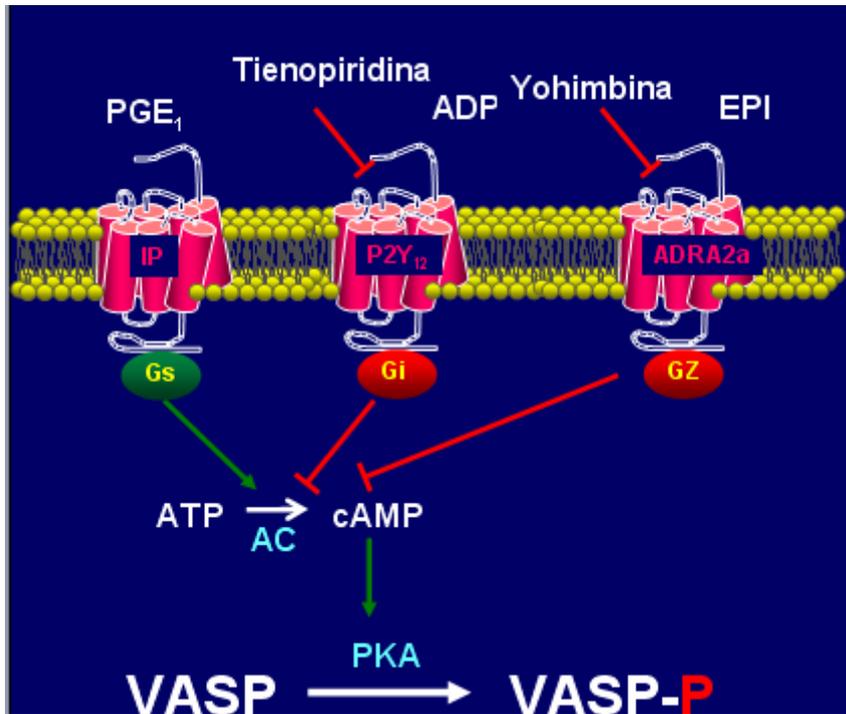


Figura 1. Vía de regulación de la fosforilación de VASP

6.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

En nuestro estudio empleamos el test del VASP para valorar la funcionalidad del receptor de la epinefrina ADRA2A, en base a la potencial implicación de este receptor en la vía de señalización de VASP (Figura 1) y también en un estudio previo que muestra que la epinefrina regula la señal del VASP [199].

El test del VASP se realizó usando el kit PLT VASP/P₂Y₁₂ de Biocytex (Marsella, Francia) siguiendo las instrucciones contenidas en el ensayo.

Básicamente, el experimento consistió en realizar los pasos siguientes:

Se prepararon 3 tubos en los cuales se añadieron a 10 µL de sangre los reactivos siguientes:

T1: IgG Anti-VASP-P + PGE₁

T2: IgG Anti-VASP-P + PGE₁ + ADP o Epinefrina

T3: IgG isotipo (control negativo) + PGE₁ + ADP o Epinefrina

La adquisición de los datos se realizó empleando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). El análisis de los datos se realizó calculando el valor de las intensidades de fluorescencia medias corregidas (IFMc) de los tubos T1 y T2.

La IFMc se obtiene restando el valor de IFM obtenido en el control negativo (tubo T3) a los valores de IFM obtenidos con IgG anti-VASP-P (los tubos T1 o T2).

$$\text{IFMc (PGE}_1) = \text{IFMc (T1)} = \text{IFM (T1)} - \text{IFM (T3)}$$

$$\text{IFMc (PGE}_1 + \text{ADP o Epinefrina)} = \text{IFMc (T2)} = \text{IFM (T2)} - \text{IFM (T3)}$$

El índice de reactividad plaquetaria (IRP) se calculó a partir de las IFMc de la muestra estudiada en presencia de PGE₁ sola o de PGE₁ + ADP, según la fórmula siguiente:

$$\text{IRP} = [(\text{IFMc PGE}_1 - \text{IFMc (PGE}_1 + \text{ADP o epinefrina)}) / \text{IFMc PGE}_1] \times 100$$

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante análisis multivariado usando el software SPSS y/o análisis univariado usando el software GraphPad Prism v4.0. En el análisis de variables cualitativas se empleó la χ^2 , mientras que en variables cuantitativas la *t*-student. Los resultados, salvo excepciones, se expresan como

media \pm error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

I. Primer objetivo: ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS MODIFICACIONES MOLECULARES DE PROTEÍNAS HEMOSTÁTICAS Y FACTORES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO DE TROMBOSIS/ HEMORRAGIA EN NMPc Ph(-)

1. POLIMORFISMOS HEMOSTÁTICOS, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MUTACIÓN JAK2 V617F, COMO FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE TROMBOSIS ARTERIALES EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL

Estudiamos la prevalencia de la mutación JAK2 V617F y de nueve alteraciones genéticas adicionales (FV Leiden, PT G20210A, y ZPI R67Stop, HPA-1, HPA-2, GPIa C807T, PSGL-1 VNTR, FVII -323 Del/Ins y TUBB1 Q43P) en 212 pacientes con el diagnóstico de NMPc.

1. 1. CLÍNICA: COMPLICACIONES TROMBÓTICAS Y HEMORRÁGICAS EN PACIENTES CON NMPc Ph(-)

Dentro de las complicaciones trombóticas se incluyeron trombosis venosas (n=13), trombosis arteriales mayores (n=42) así como alteraciones de la microcirculación (n=17).

Varios pacientes presentaron 2 episodios de eventos vasculares: 5 pacientes desarrollaron tanto trombosis venosas como trombosis arteriales mayores, mientras que dos pacientes con eritromelalgia desarrollaron un episodio de trombosis arterial mayor.

Quince pacientes presentaron episodios hemorrágicos.

Se consideraron pacientes asintomáticos aquellos que no presentaron ni eventos trombóticos ni hemorrágicos durante su seguimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Eventos trombóticos y hemorrágicos en pacientes diagnosticados de NMPc Ph(-)

	PV (n= 74) % (n)	TE (n= 128) % (n)	MFP (n=10) % (n)
Pacientes asintomáticos	67,1 (47)	63,7 (79)	60 (6)
Trombosis venosa	9,5 (7)	4,7 (6)	(0)
Trombosis arterial mayor	21,4 (15)	20,2 (25)	20 (2)
Trombosis pequeño vaso	5,7 (4)	10,5 (13)	(0)
Hemorragia	5,8 (4)	7,3 (9)	20 (2)

PV: Policitemia Vera; TE: Trombocitemia Esencial; MFP: Mielofibrosis Primaria

1. 2. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON TROMBOSIS ARTERIAL

Debido al escaso número de casos (n=13), los pacientes con trombosis venosas no fueron incluidos en el análisis. Centrando el estudio en aquellos pacientes que habían desarrollado un evento trombótico arterial, observamos que respecto a los polimorfismos asociados a desarrollo de trombosis venosas, ningún paciente presentó la mutación del Factor V Leiden, un único paciente tenía la mutación de la protrombina (PT) G20210A, mientras que existía una tendencia, no significativa, a la presencia de la variante ZPI R67 stop en este tipo de pacientes (Tabla 2).

Respecto a los alelos asociados a trombosis arteriales (HPA-1b, HPA-2b, GPIaT807 y PSGL-1 VNTR), la prevalencia de estos cambios genéticos fue

muy similar entre pacientes con y sin trombosis, al igual que la de aquellos asociados a riesgo hemorrágico (FVII-323Ins y TUBB1 P43).

Por ello, los polimorfismos hemostáticos estudiados no parecen jugar un papel importante en el desarrollo de trombosis arteriales en este grupo de pacientes.

Tabla 2. Factores de riesgo genético para trombosis en NMPc Ph(-)

Alelo polimórfico	Pacientes asintomáticos (n=132) % (n)	Trombosis arterial (n= 42) % (n)	<i>p</i>
FV Leiden	0,8 (1)	0 (0)	-
PT A20210	1,5 (2)	2,6 (1)	0,654
ZPI stop 67	1,6 (2)	5,4 (2)	0,190
HPA-1b	41,7 (55)	38,1 (16)	0,682
HPA-2b	24,2 (32)	26,2 (11)	0,799
GPIa T807	63,6 (84)	52,4 (22)	0,193
PSGL-1 (VNTR)	31,1 (41)	28,6 (12)	0,760
FVII-323Ins	25,8 (33)	22,5 (9)	0,676
TUBB1 P43	9,8 (13)	9,5 (4)	0,951

χ^2 para estudio estadístico entre los distintos grupos

1. 3. ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON TE Y TROMBOSIS ARTERIAL

De los 128 pacientes incluidos en el estudio con diagnóstico de TE, analizamos la presencia de factores adquiridos de desarrollo de eventos cardiovasculares que habían desarrollado trombosis arterial (n=25) y en los que habían permanecido asintomáticos (n=79).

Observamos que en el análisis univariado el sexo, la edad, la HTA y la hipercolesterolemia fueron factores predisponentes para el desarrollo de trombosis (Tabla 3).

Tabla 3. Características clínicas y prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares adquiridos en pacientes con TE

	Pacientes asintomáticos (n=79)	Trombosis arterial (n=25)	<i>p</i> *
Hombres % (n)	36,7 (29)	54,5 (9)	0,016
Edad			
Rango (años)	21-85	32-84	-
Media ± DE	58,2 ± 16,5	66,0 ± 13,7	0,001
Fumadores % (n)	20,3 (16)	20,0 (5)	0,978
Hipertensión % (n)	30,4 (24)	68,0 (17)	0,001
Hipercolesterolemia% (n)	20,3 (16)	48,0 (12)	0,006
Diabetes % (n)	12,7 (10)	16,0 (4)	0,670

Fumadores: individuos que fuman >10 cigarrillos al día. Hipertensión: tensión arterial sistólica >140 mm Hg o 90 mm Hg de diastólica en repetidas tomas durante 3 meses o si el paciente está con tratamiento hipertensivo de forma crónica. Diabetes: glucemias >126 mg/dL en dos días diferentes

**t*-student o χ^2 para estudio estadístico entre los distintos grupos. Los valores de *p* <0,05 se consideraron significativos.

En este grupo de pacientes, el análisis logístico de regresión mostró a la HTA como el único factor de riesgo cardiovascular adquirido que aumentó el riesgo (OR 3,70) de forma independiente de desarrollar trombosis arteriales (Tabla 4).

1. 4. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN JAK2 V617F EN PACIENTES CON TE Y TROMBOSIS ARTERIAL

Aunque han sido numerosos los grupos de trabajo que han estudiado si la mutación JAK2 V617F se asocia o no a un mayor riesgo de trombosis en NMPc, dicha asociación actualmente continúa siendo controvertida.

Tabla 4. Características clínicas y prevalencia de factores de riesgo en pacientes con TE

	Pacientes asintomáticos (n=79) % (n)	Trombosis arterial (n=25) % (n)	<i>p</i> *	Adj. <i>p</i>	OR** 95%IC
Hombres % (n)	36,7 (29)	54,5 (9)	0,016	0,103	-
Edad					
Rango (años)	21-85	32-84	N/A	-	-
Media ± DE	58,2 ± 16,5	66,0 ± 13,7	0,001	0,093	-
Fumadores % (n)	20,3 (16)	20,0 (5)	0,978	-	-
Hipertensión % (n)	30,4 (24)	68,0 (17)	0,001	0,017	3,70 1,26-10,85
Hipercolesterolemia%(n)	20,3 (16)	48,0 (12)	0,006	0,064	-
Diabetes % (n)	12,7 (10)	16,0 (4)	0,670	-	-
Alelo JAK2 617 F % (n)	45,6 (36)	72,0 (18)	0,02	0,04	3,17 1,05-9,57

Valores son media ± EEM o porcentaje de individuos.

Fumadores: individuos que fuman >10 cigarrillos al día. Hipertensión: tensión arterial sistólica >140 mm Hg o 90 mm Hg de diastólica en repetidas tomas durante 3 meses o si el paciente está con tratamiento hipertensivo de forma crónica. Diabetes: glucemias >126 mg/dL en dos días diferentes.

t-test o χ^2 usado para evaluar diferencias estadísticas entre grupos.

OR Odds ratio, IC Intervalo de confianza.

** Odds ratio calculados por regresión logística multivariada ajustando los factores de riesgo con $p < 0,15$ (OR ajustada); IC 95%: Intervalo de confianza.

* $p < 0,05$ se consideró significativa

Estudiamos por este motivo, el papel que pudiera estar jugando la presencia del alelo JAK2 F617 en el desarrollo de eventos trombóticos arteriales en pacientes diagnosticados de TE; excluimos de este análisis a los pacientes con

PV, por la alta prevalencia de la mutación JAK2 V617F (aproximadamente 90%) (Figura 1). La prevalencia de la mutación JAK2 V617F en los pacientes con TE fue de un 51,7% (Figura 1).

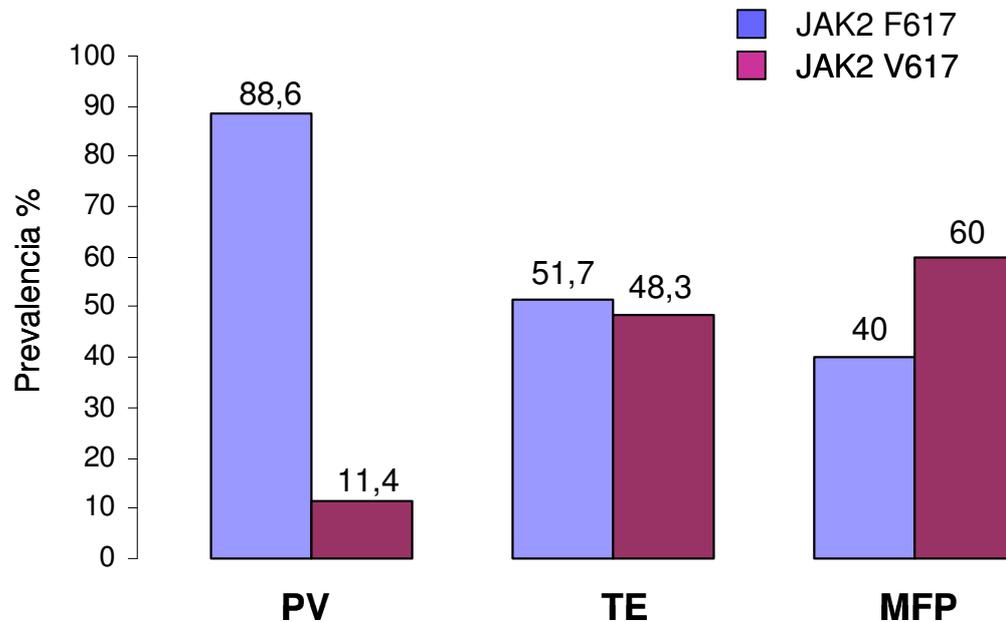


Figura 1. Prevalencia de la mutación JAK2 V617F en pacientes diagnosticados de NMPc Ph(-). PV: Policitemia Vera (n=74); TE: Trombocitemia Esencial (n= 128); MFP: Mielofibrosis Primaria (n=10).

La mutación JAK2 V617F se identificó en un 72% de los pacientes con TE que habían presentado algún evento trombótico y en un 46% de los pacientes asintomáticos. Esta mutación aumentaba el riesgo de trombosis ($p= 0,02$; Tabla 4). El análisis multivariado tras ajustar para los factores de riesgo con $p < 0,15$, mostró que la mutación JAK2 V617F aumentaba más de tres veces el riesgo de sufrir un episodio trombótico arterial (OR=3,17, $p= 0,04$).

No se pudo evaluar el papel de la mutación JAK2 V617F en trombosis venosas debido al número reducido de pacientes, pero los seis pacientes con esta complicación eran portadores del alelo JAK2 F617.

2. ANALISIS DEL GRUPO ABO COMO FACTOR DE RIESGO TROMBOTICO Y/O HEMORRÁGICO EN NMPc Ph(-)

Se estudió en 219 pacientes diagnosticados de NMPc Ph(-), la posible relación entre el grupo ABO y variables tanto clínicas (complicaciones trombóticas y hemorrágicas y factores de riesgo cardiovasculares) como biológicas [recuentos leucocitarios y plaquetarios y su perfil de activación leucocitaria (% agregados leucoplaquetares, expresión de CD11b) o plaquetaria (expresión de CD62, PFA-100 Col-ADP y Col-EPI), cifra de hematocrito, TP, TTPa, fibrinógeno, dímero D].

El 52% (n=114) de pacientes eran del grupo no OO [incluyendo los genotipos: A₁A₁, A₁A₂, A₁O₂, o A₁O₁ (39,5%); BO₁ y BO₂ (10%); BB (0,5%) y A₁B, A₂B (2%)] y el 48% (n=105) del grupo O [incluyendo los genotipos: O₁O₁, O₁O₂ (28%), y A₂O₁, A₂O₂ y A₂A₂ (20%)]. Incluimos en el grupo O los pacientes con genotipo A₂O basándonos en datos de estudios previos [110,112] en los que el alelo A₂ se ha asociado con niveles de FvW y FVIII similares a los que presentan los individuos con fenotipo O. No se evidenció diferencias en las variables biológicas, en función del grupo sanguíneo (Tabla 5).

Tabla 5. Características biológicas en pacientes con NMPc en función del genotipo ABO

	OO +A ₂ (n= 105)	No-OO (n=114)	<i>p</i>
TTPa (ratio)	1,17	1,05	0,90
AP (%)	86,3	86,1	0,97
IFM CD11b-PMN	445	357	0,26
IFM CD11b-mono	608	498	0,14
% PMN-Plaq	41,5	41,4	0,96
% Mono-Plaq	67,7	65,5	0,57
% CD62	6,35	5,1	0,21
PFA Col-EPI	220,3	228,3	0,69
PFA Col-ADP	114,3	122,2	0,59

AP: Actividad de protrombina; IFM: Intensidad de fluorescencia media; PMN: Polimorfonuclear; Plaq: Plaqueta

En la Tabla 6 se muestran las características clínicas de los pacientes según el grupo sanguíneo ABO. Como se puede observar la distribución de las características clínicas y biológicas eran similares en ambos grupos (O vs no-O); no existían diferencias significativas en cuanto a sexo, edad, la distribución del subtipo de enfermedades, factores de riesgo, a la cifra de leucocitos ni de plaquetas entre los individuos del grupo O y los del grupo no-O.

Respecto a la incidencia de episodios trombóticos, fue similar entre en los individuos con grupo sanguíneo O (27,1%) y los pacientes con grupo no-O (21,9%) ($p= 0,33$) (Tabla 6). El hecho de que nuestro estudio sólo se recogieron 13 casos de trombosis venosas, pudo reducir la probabilidad de detectar dicha asociación, más evidente en este contexto que en el de la trombosis arterial.

Tabla 6. Características clínicas y prevalencia de los genotipos ABO en pacientes con NMPc

	OO +A ₂ (n= 105)	No-OO (n=114)	<i>p</i>
Hombres n (%)	49 (46)	46 (40,3)	0,42
Edad			
Rango (años)	25-84	21-85	ND
Media ± DE	61,9 ± 15,2	60,7 ± 17,3	0,55
Diagnóstico n (%)			
TE	68 (64,8)	68 (59,7)	0,44
PV	35 (33,3)	38 (33,3)	1
MFP	2 (1,9)	8 (7,0)	0,07
Diabetes (%)	14 (14,6)	15 (13,8)	0,95
Hipertensión (%)	40 (41,6)	38 (35,2)	0,41
Tabaquismo (%)	13 (13,5)	20 (18,5)	0,43
Hipercolesterolemia(%)	22 (77,1)	22 (79,6)	0,78
Trombosis n (%)	29 (27,1)	25 (21,9)	0,33
Arterial	25 (23,8)	21 (18,4)	0,31
Venosa	7 (6,7)	6 (5,3)	0,64
Contajes celulares			
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	9,5 ± 4,9	10,0 ± 5,0	0,39
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	677 ± 332	675 ± 319	0,96

Fumadores: individuos que fuman >10 cigarrillos al día. Hipertensión: tensión arterial sistólica >140 mm Hg o 90 mm Hg de diastólica en repetidas tomas durante 3 meses o si el paciente está con tratamiento hipertensivo de forma crónica. Diabetes: glucemias >126 mg/dL en dos días diferentes.

t-test ó χ^2 se usaron para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos.

El grupo O incluye los genotipos O₁O₁, O₁O₂, y O₂O₂. El grupo No OO incluye los genotipos A₁A₁, A₁A₂, A₂A₂, A₁O₁, A₁O₂, A₂O₂, A₁B, A₂B, BO₁, BO₂, y BB. El grupo A₂ incluye los genotipos A₂O₁, A₂O₂, y A₂A₂.

**II. Segundo objetivo: ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA ACTIVACIÓN Y
RECUENTO LEUCOCITARIO EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL COMO
FACTOR DE RIESGO TROMBÓTICO/HEMORRÁGICO**

**1. RELACIÓN DE JAK2 V617F CON CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS
CD34+ EN MÉDULA ÓSEA Y CON RECuento Y ACTIVACIÓN
LEUCOCITARIA**

**1.1. CLÍNICA, RECuentOS EN SANGRE PERIFÉRICA Y ESTADO
MUTACIONAL DE JAK2 V617F**

De los 72 pacientes con TE incluidos en este estudio, 32 desarrollaron un evento trombótico, mientras que 12 pacientes presentaron un proceso hemorrágico (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Eventos trombóticos en los pacientes diagnosticados de TE

	Número de pacientes*
Eritromelalgia	11
ACV	9
IAM	6
AIT	4
Isquemia arterial periférica	3
Infarto esplénico	1
TVP	4
TEP	3
Trombosis de arteria central de la retina	1
Trombosis de seno cavernoso	1

ACV: Accidente cerebro-vascular. IAM: Infarto agudo de miocardio. AIT: Accidente isquémico transitorio. TVP: Trombosis venosa profunda. TEP: Tromboembolismo pulmonar.

* Algunos pacientes presentaron más de un tipo de evento trombótico: Eritromelalgia y trombosis de seno cavernoso (n=1), ACV y AIT (n=1), ACV, TVP y TEP (n=1), ACV e IAM (n=1), ACV y trombosis de la arteria central de la retina (n=1), Isquemia arterial periférica, TVP y TEP (n=1).

Tabla 2. Eventos hemorrágicos en los pacientes diagnosticados de TE

	Número de pacientes
Gingivorragia	4
Epistaxis	2
HDA	3
HDB	2
Metrorragia	1

HDA: Hemorragia digestiva alta. HDB: Hemorragia digestiva baja.

Durante el estudio, 39 de los 72 pacientes estaban en tratamiento citorreductor con hidroxiurea y 46 con tratamiento antiagregante con AAS.

De los 72 pacientes estudiados, 37 presentaron la mutación JAK2 V617F (54,4%), no encontrándose diferencias en las edades y/o sexo de los pacientes, ni en el porcentaje de sujetos bajo tratamiento antiagregante o citorreductor en función del estado mutacional de JAK2 (Tabla 3).

Tabla 3. Características clínicas y biológicas de los pacientes según la mutación JAK2 V617F

	JAK2 V617 (n=35)	JAK2 F617 (n=37)	<i>p</i>
Mediana de edad (rango)	69 (35-84)	65 (21-83)	NS
Sexo (varón/mujer)	16/19	20/17	NS
Aspirina (%)	59%	65%	0,8116
Hidroxiurea (%)	66%	45%	0,1333

NS: No significativo. *t*-student.

En los pacientes que no se encontraban en tratamiento citorreductor con hidroxiurea (n=33), la mutación JAK2 V617F se asoció a recuentos leucocitarios superiores a $10 \times 10^9/L$ (68,2% vs. 16,6%; $p= 0,026$), pero no a concentraciones de hemoglobina o recuento plaquetario diferentes ($p= 0,213$ y $p= 0,314$, respectivamente) (Tabla 4).

Tabla 4. Cifras en sangre periférica de los pacientes sin tratamiento citorreductor según la mutación JAK2 V617F

	JAK2 V617	JAK2 F617	<i>p</i>
Leucocitos ($>10 \times 10^9/L$)	16,6%	68,2%	0,026
Hemoglobina ($>14 \text{ g/L}$)	27,3%	50%	0,213
Plaquetas ($>800 \times 10^9/L$)	72,7%	54,5%	0,314

t-student.

1. 2. EXPRESIÓN DE COMPLEJOS LEUCOPLAQUETARES

Los pacientes con TE presentan una disfuncionalidad plaquetaria, posiblemente secundaria a una hiperreactividad inicial de estas células. Teniendo en cuenta que los complejos leucoplaquetares son una variable sensible a la activación plaquetaria, analizamos si existían variaciones en este parámetro en pacientes que habían desarrollado, o no, eventos trombóticos y respecto a los controles.

Los pacientes expresaron niveles significativamente superiores de complejos neutrófilos-plaquetas y monocitos-plaquetas respecto a los controles ($45,3\% \pm 2,4\%$ vs $20,8\% \pm 0,9\%$; $p= 0,0001$, y $74,9\% \pm 3,0\%$ vs. $44,7\% \pm 1,6\%$; $p=$

0,0001); sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la formación de complejos leucoplaquetares, entre aquellos pacientes que desarrollaron un evento trombótico respecto a aquellos que no lo hicieron (Figuras 1 y 2).

La expresión de los complejos leucoplaquetares pudiera estar influenciada tanto por la ingesta de AAS como por el tratamiento citorreductor con hidroxiurea; analizamos por este motivo el porcentaje de pacientes con/ sin trombosis en relación, en primer lugar con el tratamiento antiagregante. Paradójicamente, el 75% de pacientes sin trombosis estaban en tratamiento con AAS, frente al 44% que habían desarrollado algún evento trombótico ($p=0,0151$). Respecto al tratamiento citorreductor, el análisis también reflejó que el 42% de los pacientes que habían desarrollado trombosis estaban en tratamiento con hidroxiurea, frente al 67% de aquellos que sin haber presentado ningún episodio trombótico se encontraban bajo dicho tratamiento ($p=0,0385$). Por ello, la ausencia de formación de mayores complejos leucoplaquetares en los pacientes que han presentado eventos trombóticos no es justificable por una tasa superior de tratamiento antiagregante ni citorreductor.

1.3. EXPRESIÓN DE CD11b POR LEUCOCITOS

Al igual que en el apartado anterior, quisimos también evaluar la expresión de CD11b en pacientes con/sin trombosis y en controles, al ser éste un parámetro de activación leucocitaria no tan influenciado como la formación de complejos leucoplaquetares por fármacos antiagregantes.

Respecto a los controles, los pacientes expresaron niveles significativamente superiores de CD11b tanto en neutrófilos como en monocitos (IFM $305,3 \pm 33,1$ vs. $262,6 \pm 30,6$; $p= 0,025$, y $426,8 \pm 30,2$ vs. $389,7 \pm 27,6$; $p= 0,004$).

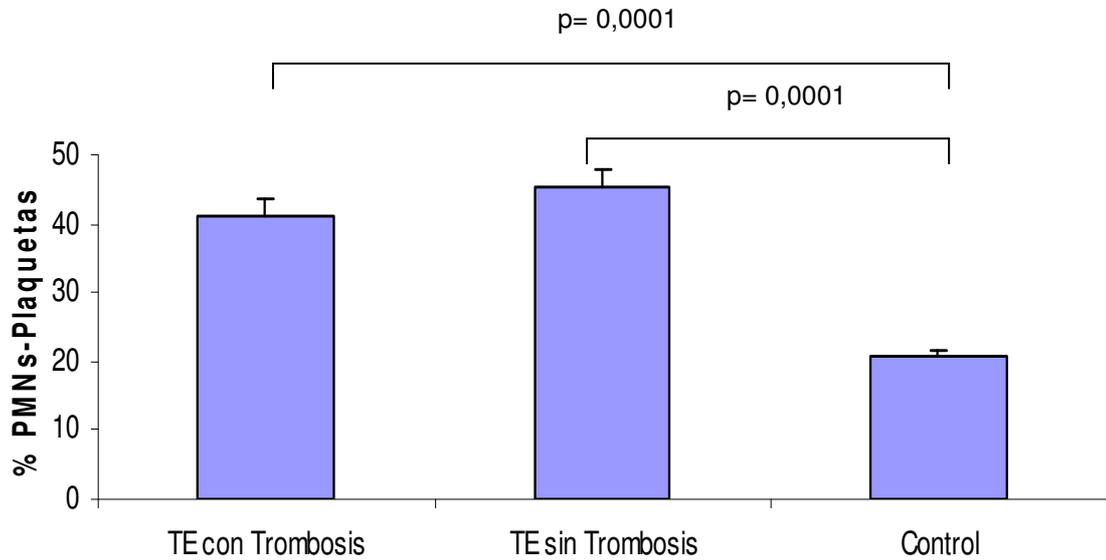


Figura 1. Expresión de complejos PMN-plaquetas (% de positividad).

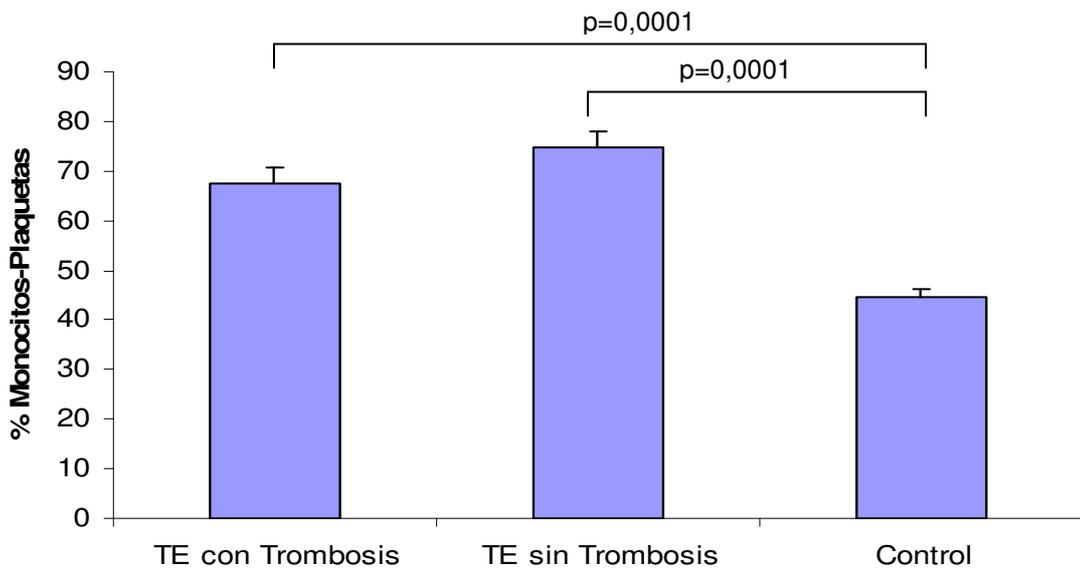


Figura 2. Expresión de complejos monocitos-plaquetas (% de positividad).

Hallamos diferencias en la expresión de CD11b entre los pacientes que habían presentado trombosis y los controles, aunque no con los pacientes asintomáticos (Figura 3). El estudio de la expresión de CD11b en monocitos, mostró diferencias significativas entre pacientes con eventos trombóticos respecto a los que permanecían asintomáticos y respecto a los controles (Figura 4).

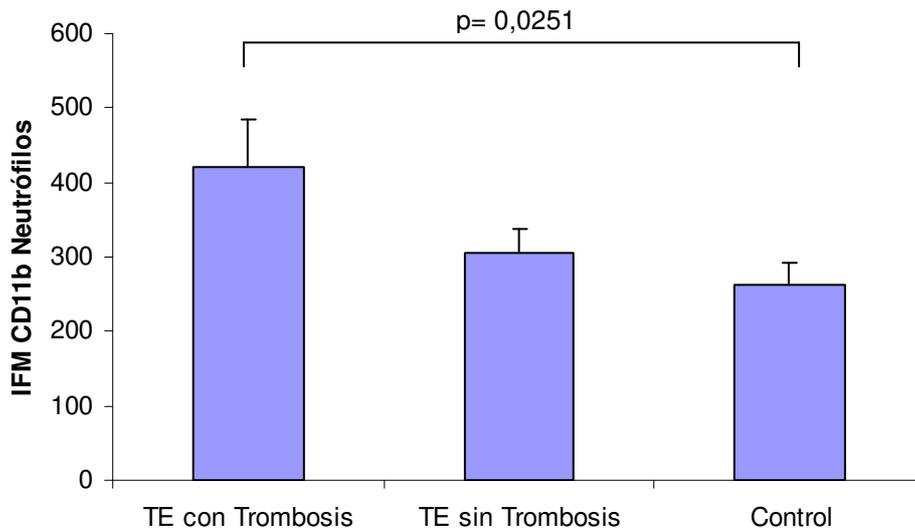


Figura 3. Expresión de CD11b por neutrófilos (IFM).

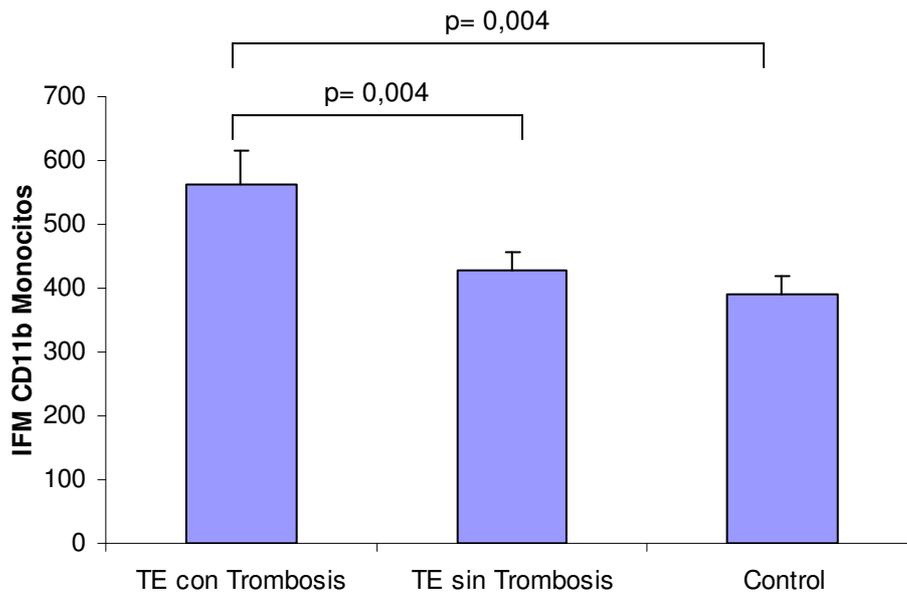


Figura 4. Expresión de CD11b por monocitos (IFM).

1.4. EXPRESIÓN DE FACTOR TISULAR EN LEUCOCITOS

El FT es una glicoproteína de membrana sintetizada, entre otras células, por monocitos, considerada el mayor iniciador de la coagulación y de la formación del trombo. Se ha descrito su implicación en trombosis en diferentes condiciones [200], aunque sigue siendo escasa la información sobre su participación en el desarrollo de eventos trombóticos en NMPc. Evaluamos el papel que podría estar jugando el FT en el desarrollo de fenómenos trombóticos en nuestro grupo de pacientes diagnosticados de TE.

Como muestran las Figuras 5 y 6, los pacientes con TE tanto con trombosis como sin trombosis expresaron niveles significativamente superiores de FT tanto en neutrófilos como en monocitos respecto a los controles. Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas en los pacientes con TE en función de la presencia o no de episodios trombóticos.

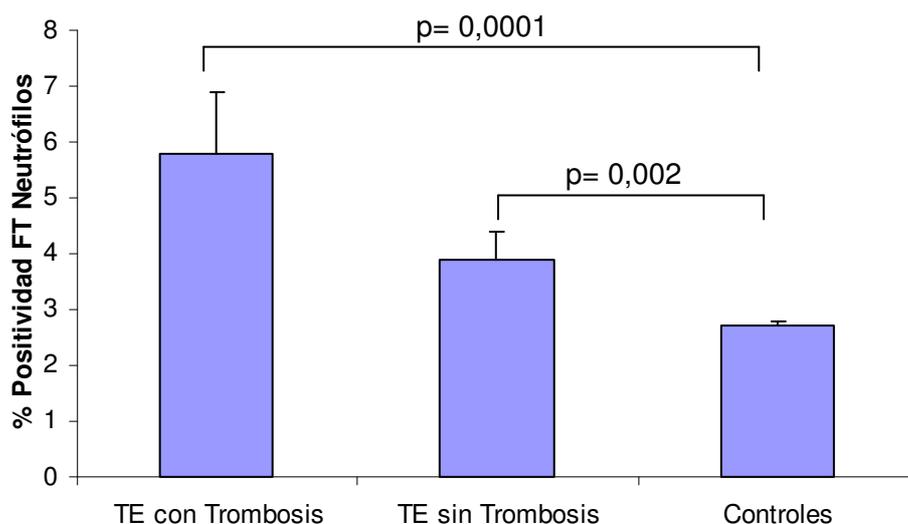


Figura 5. Expresión de FT por PMN (% de positividad).

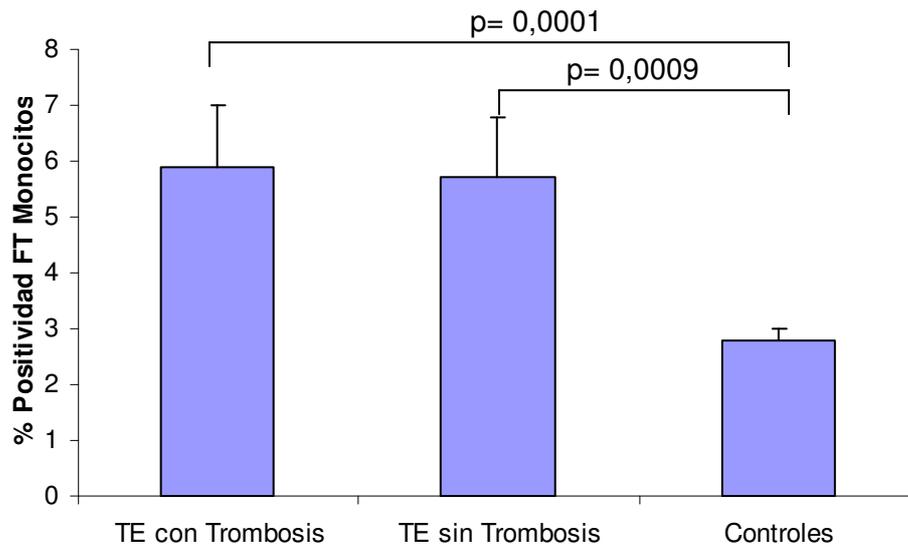


Figura 6. Expresión de FT por monocitos (% de positividad).

1.5. CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE ACTIVACIÓN DE LEUCOCITOS Y PLAQUETAS Y EL ESTADO MUTACIONAL DE JAK2 V617F

Teniendo en cuenta que el papel de la mutación JAK2 V617F en activación celular y desarrollo de eventos trombóticos continúa siendo controvertido, y no plenamente establecido, quisimos analizar la asociación del cambio génico con parámetros de activación plaquetaria (CD62, complejos leucoplaquetares) y leucocitaria (complejos leucoplaquetares, expresión de CD11b y de FT por neutrófilos y monocitos, y de CD14 por neutrófilos).

Mientras que la mutación JAK2 V617F se asoció a un mayor porcentaje de complejos neutrófilos-plaquetas ($46,3\% \pm 2,1$ vs. $39,0\% \pm 2,8$; $p= 0,043$), y de neutrófilos que expresan CD14 ($11,7\% \pm 1,6$ vs. $6,1\% \pm 1,1$; $p= 0,010$), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de variables analizadas (Tabla 5).

Tabla 5. Correlación entre activación de leucocitos/ plaquetas y estado mutacional de JAK2 V617F

	V 617 (n= 35)	F 617 (n= 37)	<i>p</i>
CD 62 (%)	6,9 ± 0,9	7,1 ± 1,1	0,948
Complejos Neutrófilo-Plaquetas (%)	39,0 ± 2,8	46,3 ± 2,1	0,043
Complejos Monocito-Plaquetas (%)	68,4 ± 3,4	72,3 ± 3,2	0,409
CD11-Neutrófilos (IFM)	360,9 ± 52,5	361,9 ± 47,3	0,988
CD11-Monocitos (IFM)	490,0 ± 43,3	491,7 ± 45,1	0,978
FT-Neutrófilos (%)	4,2 ± 0,6	5,3 ± 0,8	0,360
FT-Monocitos (%)	5,4 ± 1,1	5,8 ± 1,1	0,978
CD14-Neutrófilos (%)	6,1 ± 1,1	11,7 ± 1,6	0,010

t-student. Resultados son media ± EEM. FT: Factor tisular. IFM: Intensidad de fluorescencia media.

1.6. CORRELACIÓN DE NÚMERO DE CD34 EN MÉDULA ÓSEA Y ESTADO MUTACIONAL DE JAK2 V617F

De las 26 muestras medulares analizadas al diagnóstico de la enfermedad, 16 mostraban la mutación JAK2 V617F. De forma llamativa, se observó una relación significativa entre las concentraciones de células CD34+ en médula ósea (MO) al diagnóstico y la presencia de la mutación JAK2 V617F (Figura 7).

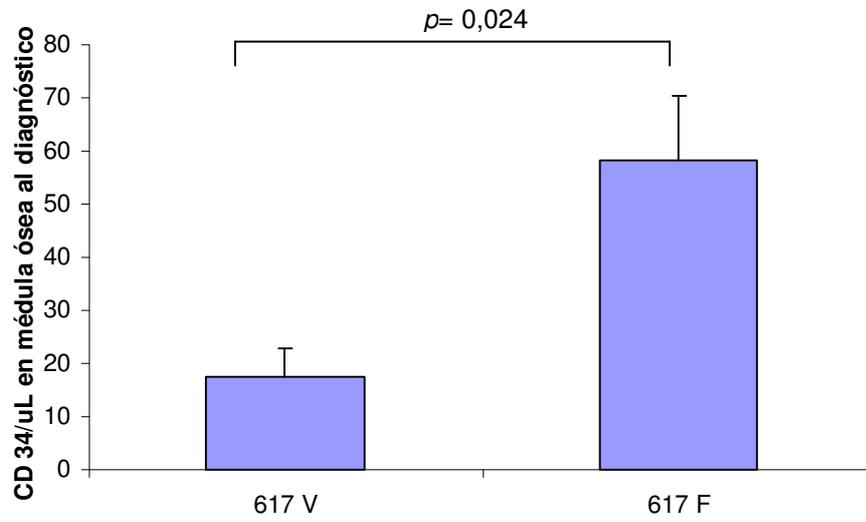


Figura 7. Correlación de concentración de células CD34 en médula ósea y JAK2 V617F

III. Tercer objetivo: VALORACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA Y REACTIVADA A EPINEFRINA EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL

1. ACTIVACION PLAQUETARIA Y FUNCION HEMOSTATICA PRIMARIA EN PFA-100 EN PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL: EFECTO DE LA MUTACION JAK2 V617F

1.1. CLÍNICA, RECUENTOS PLAQUETARIOS EN SANGRE PERIFÉRICA Y ESTADO MUTACIONAL DE JAK2 V617F

Las características clínicas y biológicas de los pacientes incluidos en función del estado mutacional de JAK2 V617F se muestran en la Tabla 1.

1. 2. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA (% CD62-P)

Como medida de activación plaquetaria, analizamos la expresión de la glicoproteína granular selectina-P en la superficie de la membrana plaquetaria de controles y de enfermos en situación basal (muestras no estimuladas con agonistas).

Tabla 1. Características clínicas y biológicas de los pacientes (TE)

	F 617 (n=37)	V 617 (n=35)	<i>p</i>	Controles (n=31)
Varón/mujer (n)	22/18	13/19		13/30
Varones (%)	59,5	37,1	0,713	41,9
Edad				
Rango (años)	21-83	35-84	0,150	27-81
Media±DE	62,9±16,7	63,5±16,5		57,7±14,6
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	12,5 (4,6-41,9)	9,3 (3,7-14,1)	0,163	6,6 (3,7-12)
Hemoglobina (g/dL)	14,3 (8,2-17,3)	13,2 (11,3-15,7)	0,135	13,1 (10,3-14,9)
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	565 (226-2180)	738 (304-2580)	0,140	251 (98-625)
Niveles FvW (%)	133 (32-263)	132 (75-281)	0,943	ND
Trombosis (n)	21	11	0,226	0
Hemorragias (n)	8	4	0,736	0
AAS (%)	65	59	0,812	0
Citorreducción (%)	45	66	0,133	0

t-student. Datos son medias y rango. NS: No significativo. ND: No determinado. FvW: Factor von Willebrand. El valor de *p* muestra la comparación entre el grupo JAK2 617V y 617F

Aunque existía una tendencia a una mayor expresión de CD62-P basal en pacientes con/sin trombosis respecto a los controles, dicha diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,278$) (Tabla 2).

Tampoco observamos diferencias mayores en la externalización a superficie de selectina-P en función de la presencia/ausencia de la mutación JAK2 V617F en los pacientes con TE ($7,1 \pm 1,1\%$ vs $7,0 \pm 1,0\%$; $p= 0,948$).

Tabla 2. Expresión basal de CD62 (% de positividad)

	CD62 (% Positividad)
TE con trombosis (n= 32)	7,0 ± 0,8
TE sin trombosis (n= 40)	6,9 ± 1,2
Controles (n= 31)	5,3 ± 0,7
Medias ± EEM	

1. 3. ESTUDIO CON PFA-100 EN PACIENTES CON TE

Hasta ahora, los datos de reactividad plaquetar analizados con el sistema automatizado PFA-100 son escasos [97,129], por lo que nos propusimos estudiar en nuestro grupo de pacientes la relación entre tiempo de obturación (TO) en PFA-100 y reactividad plaquetaria en NMPc.

Analizamos la respuesta de adhesión/agregación a alto flujo mediante la cuantificación de TO de PFA-100 tanto con cartuchos Col/ADP como con Col/EPI, por lo que este estudio se llevó a cabo en los pacientes con TE que no se encontraban bajo tratamiento antiagregante.

Los pacientes mostraron TO tanto para Col/ADP como para Col/EPI más largos que los controles (Tabla 3).

Tabla 3. PFA-100 en pacientes con TE y controles

Cartucho PFA-100	TE sin AAS (n=23)	Controles (n=31)	<i>p</i>
TO Col/ADP	114,2 ± 61,3	71,8 ± 10,2	0,004
TO Col/EPI	167,5 ± 62,7	98,0 ± 13,8	0,0001

Medias ± EEM. *t*-student

Sin embargo, no hubo relación significativa entre los TO y el desarrollo de eventos trombóticos; por el contrario, sí aparecía una tendencia hacia TO más prolongados con cartuchos Col/EPI, entre aquellos pacientes que habían presentado episodios hemorrágicos, aunque sin llegar alcanzar valores estadísticamente significativos (Tabla 4).

Tabla 4. Tiempos de obturación y clínica hemorrágica en TE sin AAS

Cartucho PFA-100	TE con hemorragia (n=6)	TE sin hemorragia (n=17)	<i>p</i>
TO Col/ADP	110 ± 50	116 ± 68	0,81
TO Col/EPI	206 ± 74	154 ± 54	0,08

Medias ± EEM. *t*-student.

Teniendo en cuenta la influencia de la cifra de plaquetas, del hematocrito y de los niveles de FvW en los tiempos de oclusión de PFA, analizamos si estas variables pudieran estar justificando la prolongación de los TO con Col/EPI en pacientes con TE que habían sufrido hemorragia. Como se refleja en la Tabla 5, las variables citadas, no parecen estar justificando los hallazgos descritos.

Tabla 5. Datos clínicos de pacientes con TE y hemorragia

	TE con hemorragia (n=6)	TE sin hemorragia (n= 17)	<i>p</i>
FvW	127,8 ± 49,5	145,5 ± 64,0	0,55
Hematocrito (%)	40,8 ± 4,7	43,9 ± 9,9	0,44
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	694 ± 246	834 ± 586	0,55

Medias ± EEM. *t*-student.

Cuando analizamos la mutación JAK2 V617F, asociada a mayor incidencia de eventos trombóticos en nuestro grupo, en relación a reactividad plaquetar en

sistema PFA, observamos que los pacientes portadores del alelo JAK2 617F mostraron TO Col/ADP y Col/EPI más cortos a aquellos sin la mutación, aunque los resultados no resultaron ser estadísticamente significativos (Tabla 6).

Tabla 6. PFA-100 y JAK2 V617F en TE

Cartucho PFA-100	JAK2 V617	JAK2 F617	<i>p</i>
TO Col/ADP	131,5 ± 81,2	105,5 ± 51,2	0,35
TO Col/EPI	184,0 ± 90,0	158,8 ± 44	0,38

Medias ± EEM. *t*-student.

2. ANÁLISIS DE LA HIPO-REACTIVIDAD PLAQUETARIA A EPINEFRINA EN LA TROMBOCITEMIA ESENCIAL: COMPARACIÓN DEL TEST DE VASP FRENTE A LA AGREGOMETRÍA Y EL PFA-100

En este apartado pretendimos aclarar porqué en TE se ha descrito paradójicamente, tanto una activación plaquetar aumentada, como una hipo-reactividad a agonistas solubles, en particular a la epinefrina. Los trabajos que estudian dicha hipo-reactividad son escasos y los mecanismos responsables están por aclarar.

Las características clínicas de los pacientes con TE incluídos, tratados o no con AAS y de los controles sanos analizados en paralelo están descritas en la Tabla 7.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes y controles

	AAS (n=18)		No AAS (n=6)		Controles (n=10)
	Hidroxiurea (n=10)	Sin hidroxiurea (n=8)	Hidroxiurea (n=3)	Sin hidroxiurea (n=3)	-
Edad (media±DE)	67,8 ± 12,8	47 ± 19,3	71,3 ± 14,6	35,3 ± 14,3	45,3 ± 11,2
Sexo masculino n (%)	5 (50,0)	5 (62,5)	0	1 (33,3)	5 (50,0)
Trombosis n (%)	6 (60)	3 (37,5)	0	1 (33,3)	0
Hemorragia n (%)	2 (20)	0	2 (66,7)	1 (33,3)	0
JAK2 V617F n (%)	3 (33,3)	4 (50)	2 (66,7)	2 (66,7)	0

2.1. AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PACIENTES CON TE

Globalmente los pacientes (con y sin AAS) mostraron una agregación plaquetaria (AP) máxima significativamente menor que los controles para todos los agonistas (AA, 41 ± 41 vs. 94 ± 3 , $p=0,0003$; ADP, 70 ± 20 vs. 91 ± 3 , $p=0,0009$; EPI, 25 ± 23 vs. 91 ± 3 , $p<0,0001$; TRAP, 82 ± 17 vs. 95 ± 2 , $p=0,023$) tal como aparece en la Figura 1.

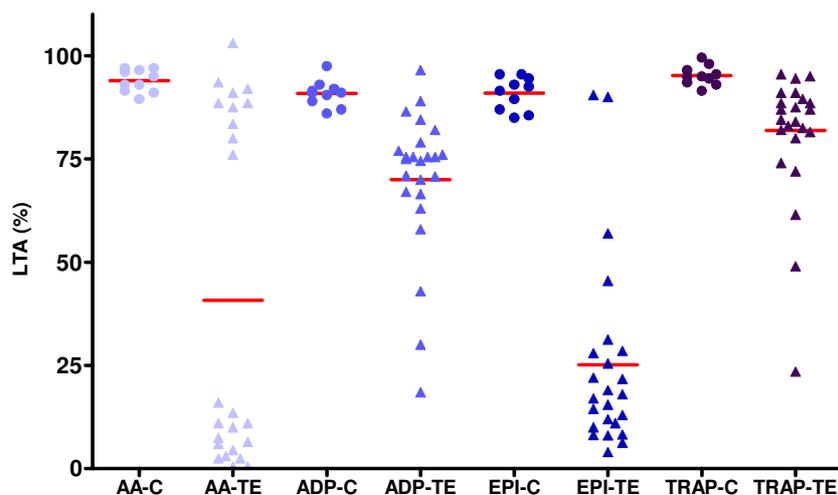


Figura 1. Agregación plaquetar (LTA%) en respuesta a varios agonistas en controles (C) y pacientes (TE)

Llamativamente 5 de los 18 pacientes con prescripción de AAS respondieron normalmente a AA ($LTA-AA > 25\%$). Por el contrario, uno de los 6 pacientes con TE sin prescripción de AAS no respondía a este agonista en los ensayos de agregación ($LTA-AA < 25\%$) (Tabla 8).

Tabla 8. Agregación plaquetar en respuesta a AA en pacientes con TE con o sin aspirina (AAS)

Prescripción	Agregación ácido araquidónico <25%, n (%)	Agregación ácido araquidónico >25%, n (%)
AAS (n=18)	13 (72,2)	5 (27,8)
No AAS (n=6)	1 (16,7)	5 (83,3)

En base a este dato, clasificamos a los pacientes como respondedores a AA ($LTA-AA > 25\%$) o no respondedores ($LTA-AA < 25\%$).

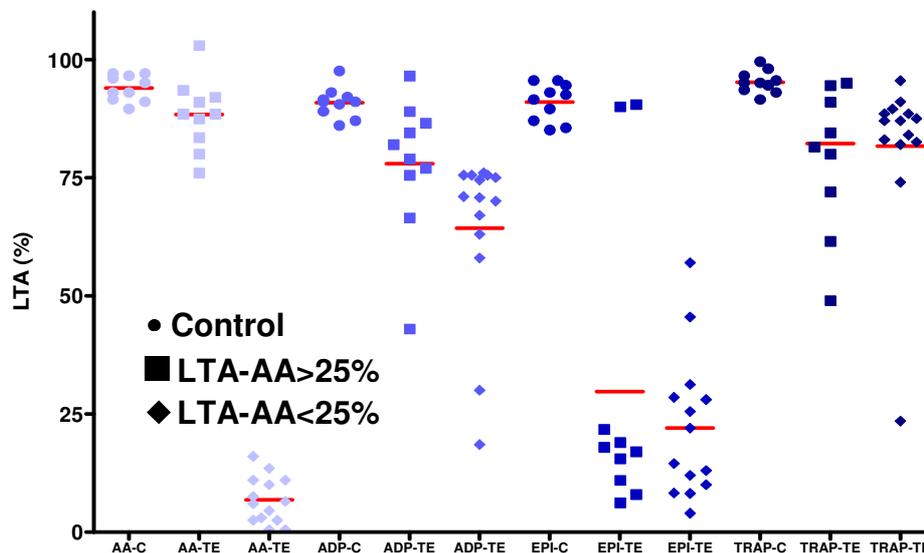


Figura 2. Agregación plaquetar (LTA%) en respuesta a varios agonistas en controles (C) y pacientes (TE) respondedores o no a AA

Como muestra la Figura 2, al considerar este criterio observamos que la agregación con ADP y TRAP de los pacientes con $LTA-AA > 25\%$ y $LTA-$

AA<25% estaban en promedio moderadamente reducida con respecto a los controles. Por el contrario, la agregación con epinefrina estaba reducida en más del 65% en todos los pacientes con LTA-AA>25% excepto en dos de ellos.

2.2. ESTUDIO DE FOSFORILACIÓN DE VASP- pSer²³⁹ POR CITOMETRÍA

En los ensayos de fosforilación de VASP tras activar las plaquetas con EPI o ADP encontramos que los valores de IRP-ADP e IRP-EPI en los pacientes fueron sólo ligeramente inferiores a los controles (Figura 3). Como se esperaba, la ingesta de AAS no marcó diferencia entre pacientes reflejando que el test es insensible al antiagregante.

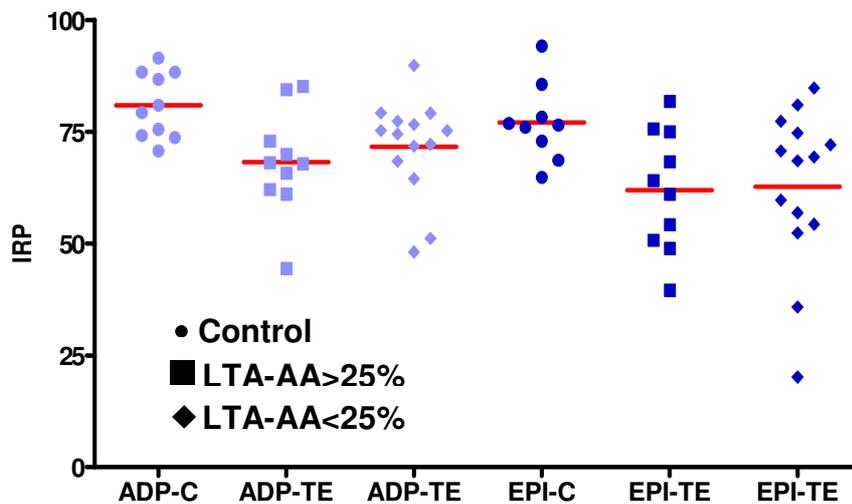


Figura 3. Fosforilación de VASP (índice de reactividad plaquetaria -IRP-) en controles (C) y pacientes (TE) respondedores o no a AA

DISCUSIÓN

El curso clínico de la TE y de la PV se caracteriza por una incidencia incrementada de complicaciones vasculares y una tendencia a la progresión a mielofibrosis o a leucemia aguda. En la patogenia de la trombosis, están implicadas varias causas, incluyendo factores relacionados con el paciente y con la propia enfermedad. Está plenamente aceptado, que la edad y los eventos tromboticos previos, son factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones vasculares mayores, tanto en TE como en PV [62,68,86-89]. Sobre esta base, los pacientes en la actualidad se estratifican en bajo riesgo y en alto riesgo, y el empleo de fármacos citorreductores se recomienda en el grupo de alto riesgo. Por el contrario, todavía existe una gran controversia acerca del papel jugado por los factores de riesgo vascular convencionales, como la DM, HTA, hipercolesterolemia y tabaquismo, puesto que muchos análisis multifactoriales no han mostrado con consistencia su papel patogénico independiente, y todavía menos aclarado está el papel de factores de riesgo genético para la trombosis.

Más recientemente, se han considerado los factores relacionados con la enfermedad, incluyendo la presencia de la mutación JAK2 V617F, y el recuento basal de leucocitos. Este último es un predictor independiente de trombosis mayores, en particular, de síndromes coronarios agudos [87]. Sin embargo, si la leucocitosis es simplemente un marcador de enfermedad vascular o si el nivel elevado de leucocitos contribuye de forma directa a dicho efecto, por el momento se desconoce.

Adicionalmente, son bien conocidas, las alteraciones funcionales en los leucocitos y en las plaquetas en estos síndromes, y estudios recientes sugieren que bien por la propia enfermedad, o bien en relación con la mutación JAK2

V617F, este estado de hiperactivación podría ser el evento inicial que contribuye al desarrollo de eventos trombóticos.

En este trabajo hemos pretendido evaluar tanto la relación de factores de riesgo cardiovascular adquiridos y genéticos, el efecto de la mutación JAK2 V617F, como la funcionalidad leucocitaria y plaquetaria, en el desarrollo de trombosis en nuestro grupo de pacientes con NMPc.

Por otra parte, se puede especular que el estudio de hiperactivación observada podría modificar la respuesta inadecuada a la aspirina que más adelante discutiremos

**I. Primer objetivo: ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS MODIFICACIONES
MOLECULARES DE PROTEÍNAS HEMOSTÁTICAS Y FACTORES
AMBIENTALES EN EL DESARROLLO DE TROMBOSIS/ HEMORRAGIA EN
NMPc Ph(-)**

Existe un amplio número de trabajos que muestra el efecto de polimorfismos hemostáticos funcionales en el desarrollo de eventos trombóticos en la población general, tanto en el desarrollo de trombosis venosas (factor V Leiden, PT G20210A, ZPI R67stop) [201,202], trombosis arteriales (HPA-1b, HPA-2b, GPIa C87T, PSGL-1) [195,203-206]; o de hemorragia (FVII-323 Del/ins, TUBB1 Q43P) [207,208]. Sin embargo, se desconoce cuál es la verdadera relevancia de estas variaciones génicas en el desarrollo de complicaciones trombóticas y/o hemorrágicas en pacientes diagnosticados de NMPc. Esto se debe a que los estudios publicados hasta ahora al respecto incluyen, en general, un escaso número de pacientes reclutados y se analizan un número muy limitado de polimorfismos hemostáticos, como ya se ha comentado en la Introducción, con resultados hasta el momento contradictorios.

Con esta finalidad analizamos la presencia de las nueve variaciones genéticas descritas previamente en la población general. Incluimos para el primer análisis estadístico todos los pacientes que habían presentado algún evento trombótico arterial (tanto de pequeño como de gran vaso) (n=59), no considerando sin embargo, los episodios trombóticos de tipo venosos, por ser un número muy limitado de pacientes (n=13). A este respecto los polimorfismos más estudiados han sido el factor V Leiden y la PT G21210A. Los resultados en este contexto son controvertidos, puesto que inicialmente se describe el factor V Leiden como

factor de riesgo en TE o PV en el desarrollo de TVP (16 frente 3%), y en la mayor tasa de recurrencia de este tipo de trombosis [105]. En un trabajo posterior no fue confirmada la asociación de TVP con este polimorfismo, aunque sí con la PT G21210A [209], por lo que el papel de estos polimorfismos en el desarrollo de TVP en este contexto aún no ha sido plenamente establecido. En cuanto a la posible relación de estos dos cambios genéticos con el desarrollo de trombosis arterial en NMPc Ph(-), nuestros datos no apoyan dicha asociación, de acuerdo con trabajos previos [103,106].

Más escasos son los datos publicados con los polimorfismos hemostáticos de las GP plaquetarias GPIb α , GPIa y GPIIIa, en el establecimiento del riesgo trombótico en NMPc. En un único trabajo realizado con un número escaso de pacientes diagnosticados de TE y PV [103], se establece que la presencia del alelo HPA-1b se asocia a riesgo de trombosis arterial exclusivamente en pacientes con PV. Aunque estos datos pueden ser relevantes, teniendo en cuenta el escaso número de pacientes con PV incluidos (n=43), deberían ser confirmados en estudios más amplios, aunque nuestros datos no lo apoyan. El estudio citado [103] y el nuestro, tampoco soportan un posible papel fisiopatológico de los polimorfismos de la GPIa, ni de GPIb α en el desarrollo de trombosis arteriales.

Otros polimorfismos como ZPI R67stop (asociado en la población general con una mayor incidencia de trombosis venosas) [201], o TUBB1 Q43P (asociado éste con un mayor riesgo de episodios hemorrágicos) [207], no habían sido hasta ahora abordados en el contexto del desarrollo de complicaciones trombóticas y/o hemorrágicas en pacientes diagnosticados de NMPc. Aunque nuestros resultados no han demostrado una asociación entre éstos y la mayor

incidencia descrita de fenómenos trombo-hemorrágicos en esta patología, sería necesario ampliar su estudio a un mayor número de pacientes y con una mayor casuística de complicaciones tanto trombóticas como hemorrágicas para poder validar nuestros datos.

La literatura en NMPc refiere resultados contradictorios acerca de la contribución de factores de riesgo convencionales para la enfermedad cardiovascular y eventos trombóticos. En el estudio ECLAP en PV [65] predictores de supervivencia y de mortalidad cardiovascular fueron la DM, el tabaquismo, la insuficiencia cardíaca congestiva, la edad e historia previa de trombosis. Sin embargo, de forma similar a lo referido respecto a los factores de riesgo genético, existen discrepancias en los resultados de los diferentes estudios acerca de la contribución de los factores de riesgo trombóticos adquiridos, lo que parece deberse al escaso número de pacientes incluidos en los trabajos publicados [61-63,65,101,102]. Con la finalidad de poder aclarar su posible implicación en el desarrollo de eventos arteriales, analizamos la presencia de dichos factores en nuestro grupo de pacientes. Observamos que en nuestros pacientes con TE, factores de riesgo cardiovasculares clásicos como la HTA y la hipercolesterolemia, junto a la edad y el sexo, parecían jugar un papel importante en el desarrollo de trombosis arteriales. Sin embargo, el análisis logístico de regresión mostró sólo a la HTA como el único factor de riesgo cardiovascular adquirido, que aumentaba de forma independiente el riesgo de desarrollar trombosis arteriales. Nuestros resultados irían a favor de los publicados por Shin y col. [210] donde aparece también la HTA como un factor de riesgo que de forma significativa ($p= 0,002$) está implicado en el desarrollo de trombosis en TE, no así la DM ni la hipercolesterolemia. Sin

embargo, resultados publicados por otros grupos, no encuentran tal asociación y sí con otros factores como el tabaquismo en TE [89,101] y también en PV [87]. Este último trabajo incluye un mayor número de pacientes (n=1636) reclutados y analizados para estas variables; en este mismo trabajo la HTA no parece aumentar el riesgo trombótico, aunque sin embargo cabe destacar que el análisis, como se apuntaba previamente, es en pacientes con PV y no en TE. Tampoco aparece la HTA como factor de riesgo para trombosis en TE en el trabajo publicado por Besses y col. (n=148) [61], que señala la hipercolesterolemia como el factor de riesgo más importante.

Es indudable, que para el paciente individual es importante identificar y tratar todo factor de riesgo cardiovascular que puede ser reversible, ante la falta de consenso entre los trabajos publicados en relación con la contribución específica de cada factor de riesgo en este grupo de pacientes.

Desde el descubrimiento de la mutación JAK2 V617F, las consecuencias clínicas y patológicas de este defecto, han sido extensamente investigadas para determinar si su presencia caracteriza a un grupo diferente de enfermedades mieloproliferativas. Si la presencia de la mutación JAK2 V617F modifica el riesgo trombótico todavía está debatido, aunque hay cada vez mayor evidencia clínica que sugiere que la mutación puede asociarse al desarrollo de trombosis. Estas observaciones además tienen más peso por los parámetros de laboratorio que indican que la mutación JAK2 V617F puede conferir una mayor activación de leucocitos y plaquetas en NMPc [94,97].

De los 128 pacientes incluidos en el estudio con diagnóstico de TE, la mutación se identificó en un 72% de los pacientes que habían sufrido eventos trombóticos arteriales y en un 46% de los enfermos sin antecedentes

trombóticos. La mutación JAK2 V617F aumentaba de forma independiente más de tres veces el riesgo de sufrir un episodio trombótico arterial (OR= 3,17, $p=0,04$). Estos datos son concordantes con los de un reciente metanálisis que incluye 21 estudios en TE y concluye que la mutación JAK2 V617F se asocia de forma significativa a un incremento del riesgo de sufrir un evento trombótico (OR 1,92, 95% IC 1,45-2,53), tanto de trombosis arteriales (OR 1,77, 95% IC 1,29-2,43), como de trombosis venosas (OR 2,49, 95% IC 1,71-3,61) [211]. En nuestro grupo de pacientes con TE no se pudo evaluar el papel de la mutación JAK2 V617F en trombosis venosas por el escaso número de casos, pero los seis pacientes con esta complicación eran portadores del alelo JAK2 V617F.

Otro factor de riesgo estudiado en la población general para el desarrollo de trombosis, tanto arteriales, como venosas, es el grupo ABO; los individuos con el grupo no-O presentan un riesgo significativamente mayor de presentar fenómenos trombóticos [110-116]. La diferencia del efecto protrombótico entre los individuos no-O y una mayor tendencia a la diátesis hemorrágica entre los individuos del grupo O, se ha explicado por la existencia de diferentes niveles de FvW y de FVIII en ambos grupos. Este aumento moderado de riesgo de desarrollar fenómenos trombóticos (OR: 1,8-2,5) en los individuos no-O y la alta prevalencia (>50%) de este fenotipo entre la población general, hace que el grupo ABO, sea un factor de interés a estudiar entre aquellos que pudieran estar implicados en trombosis, sobre todo si consideramos a la trombosis como una enfermedad multigénica [212]. Así, centrándonos en pacientes con NMPc, donde la trombosis es una de las principales causas de morbi-mortalidad y con una compleja patogenia, parecía interesante estudiar el papel que pudiera estar jugando el grupo sanguíneo ABO en el desarrollo de eventos trombóticos en

esta patología, hasta ahora nunca analizado. Con esta finalidad, genotipamos el grupo ABO en nuestro grupo de 219 pacientes con NMPc Ph(-) (136 con TE, 73 con PV, y 10 con MFP).

Al analizar nuestros resultados observamos una prevalencia similar de episodios trombóticos en los individuos con grupo sanguíneo O y en pacientes con el grupo no-O [(27% y 22%, respectivamente; ($p=0,33$)], sin que existieran diferencias clínicas o biológicas en los dos grupos de pacientes que pudieran justificar los resultados. Aunque no fue posible el análisis de los niveles de FvW y FVIII en todos los pacientes (por incluir en el estudio a pacientes de otro centro), sí fue estudiado en 112 de los pacientes incluidos. Nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (pacientes OO, niveles FvW: 128,20%, FVIII: 137,5% y en los pacientes no-OO: FvW: 104,9%, FVIII: 117,7%) ($p= 0,42$ y $p= 0,18$, respectivamente), lo que tal vez podría explicar en parte, la ausencia de diferencias en cuanto a la incidencia de trombosis en función del grupo ABO.

Adicionalmente, se ha descrito en la población general, que dicha asociación con el grupo no-O es más evidente para las trombosis venosas [110-115], siendo en nuestro estudio éste un grupo muy pequeño, ya que sólo se recogieron 13 fenómenos trombóticos venosos, lo cual puede reducir la probabilidad de detectar dicha asociación.

Así, nuestros datos, con las limitaciones que contienen, sugieren que el grupo ABO, no parece actuar como una variable relevante en las alteraciones hemostáticas que tienen lugar en las NMPc Ph(-), y no parece tener relevancia como factor de riesgo para el desarrollo de eventos trombóticos y/o

hemorrágicos en estos pacientes, pero serían necesarios estudios con un mayor reclutamiento de pacientes para poder validar estos resultados.

II. Segundo objetivo: ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA ACTIVACIÓN Y RECuento LEUCOCITARIO EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL COMO FACTOR DE RIESGO TROMBÓTICO/HEMORRÁGICO

Los datos publicados, aunque escasos, sugieren que la activación de los neutrófilos ocurre en los pacientes con TE y PV de forma paralela con la aparición de signos de laboratorio de activación del sistema hemostático, lo que sugiere una implicación de estas células en la patogenia de la predisposición trombótica de estos sujetos [87,89,94,132].

Varios autores han medido múltiples parámetros de activación de leucocitos en TE y PV. Falanga y col. [135] analizaron marcadores de daño endotelial (trombomodulina, FvW antigénico), y de activación de trombina (formación de complejos trombina-antitrombina, fragmentos 1+2 de protrombina, dímero D), además de activación de neutrófilos, tanto en pacientes con PV como en TE, en relación a los controles. La activación de leucocitos (neutrófilos y monocitos) promueve la coagulación mediante la liberación del contenido granular y por la formación de agregados con las plaquetas. Los efectos subsiguientes incluye la generación de complejos leucoplaquetares, que juegan un papel desencadenante en la expresión de FT por los monocitos, al igual que la liberación de aniones superóxido y de citocinas inflamatorias, que causan activación y daño endotelial.

La interacción entre neutrófilos y plaquetas, ocurre tras la cascada de adhesión en la que CD62P se une a PSGL-1 en los neutrófilos. Se asegura una adhesión firme mediante la unión de CD11b, una integrina β_2 complejada con CD18, bien a la GPIIb plaquetaria, o al fibrinógeno unido a GP IIb/IIIa. En pacientes con

NMPc, se ha constatado un incremento en la activación leucocitaria en base a la mayor expresión de CD11b [134,135], y al incremento en la formación de complejos leucoplaquetares, y de FT por parte de monocitos [94] y plaquetas [97].

Nosotros también constatamos que respecto a los controles, los pacientes con TE expresaron niveles significativamente superiores de complejos tanto neutrófilo-plaqueta, como monocito-plaqueta en situación basal. En cuanto a la expresión de CD11b también fue mayor en pacientes con TE que en controles, tanto en neutrófilos como en monocitos, de acuerdo con lo publicado por Falanga y cols. [97,213], quienes describen también una mayor expresión de complejos neutrófilo-plaqueta y CD11b en neutrófilos. También Arellano-Rodrigo y col. [94], al igual que en nuestro grupo, encuentran una mayor expresión de CD11b en monocitos y una mayor formación de complejos monocito-plaqueta en pacientes con TE.

El FT, como se ha comentado, es una glicoproteína sintetizada por los monocitos y es considerada como el principal activador de la coagulación [214], y además ha sido implicado en el desarrollo de trombosis en diferentes situaciones [215]. Sin embargo, la información sobre su papel en NMPc es escasa. Por este motivo decidimos estudiar su expresión, no sólo en monocitos, sino también en neutrófilos, aunque como es conocido, los datos publicados en cuanto a su expresión en neutrófilos son controvertidos [216-220]. Nosotros observamos que en nuestro grupo de pacientes con TE, la expresión del FT fue mayor tanto en monocitos como en neutrófilos en comparación con los controles. En cuanto a la mayor expresión de FT en monocitos en situación basal, ya fue comunicado por Arellano-Rodrigo y col.

[94] en pacientes con TE, aunque no analizaron, sin embargo su expresión en neutrófilos. El único trabajo que hasta el momento estudia la expresión del FT en neutrófilos ha sido publicado recientemente [97], describiendo, al igual que nosotros, una mayor expresión de FT en neutrófilos de pacientes con TE y en situación basal.

Los pacientes con TE bajo tratamiento con AAS exclusivamente o en combinación con hidroxiurea, ha mostrado una menor formación de complejos leucoplaquetares tras la estimulación de sus muestras con f-MPL [213], lo que sugiere que uno de los efectos positivos de la aspirina puede ser la reducción de estos complejos. Igualmente, la hidroxiurea, un agente panmielosupresor, también ha mostrado reducir la incidencia de trombosis arterial en el estudio MRC PT1 [125].

En nuestro grupo, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre aquellos pacientes que desarrollaron un evento trombótico respecto a aquellos que no lo hicieron en cuanto a la expresión de complejos leucoplaquetares, resultado similar al publicado por Arellano-Rodrigo y col. [94]. Estos resultados, sin embargo, no se justifican por la terapia antiagregante en los pacientes, ya que el porcentaje de pacientes sin trombosis en tratamiento con AAS, era superior al de aquellos que no habían desarrollado ningún evento trombótico (75% vs. 44%, $p= 0,0151$). Tampoco el tratamiento citorreductor, explicaría la falta de diferencias, ya que de forma similar, un 67% de los pacientes sin trombosis estaba en tratamiento con hidroxiurea, frente a un 42% de aquellos con antecedentes trombóticos ($p= 0,0385$).

Al analizar la expresión de CD11b, no tan influenciado como la formación de complejos leucoplaquetares por fármacos antiagregantes, observamos que en

el grupo de pacientes con TE que había desarrollado algún fenómeno trombótico, presentaban niveles mayores, tanto en neutrófilos como en monocitos de CD11b, aunque la diferencia fue sólo estadísticamente significativa en su expresión en monocitos, resultados que confirman los publicados en el trabajo de Arellano-Rodrigo y col. [94], lo que sugiere que la evaluación de este parámetro pudiera ser más sensible en este tipo de células. Todos estos datos irían a favor de la importancia de la activación leucocitaria en la patogenia de la trombosis en pacientes con TE, lo que podría ser el evento iniciador, produciéndose secundariamente la activación plaquetaria.

Cada vez parece más evidente la relación de la mutación JAK2 V617F con complicaciones relevantes de las NMPc como la trombosis. Estas observaciones además, tienen mayor peso por los parámetros de laboratorio que sugieren que la mutación JAK2 V617F, puede conferir una mayor activación de leucocitos y plaquetas en NMPc [94], además de un incremento en la expresión de genes indicadores de activación de neutrófilos en TE JAK2 V617F [97], lo que sugiere que pudiera haber una relación entre activación de neutrófilos, trombosis y señalización por JAK2 en NMPc. Por este motivo decidimos analizar si existían diferencias en la expresión de diferentes marcadores asociados a activación leucocitaria en nuestro grupo de pacientes con TE. La mutación JAK2 V617F se asoció en primer lugar y de forma estadísticamente significativa, con una mayor presencia de complejos leucoplaquetares, resultados similares a los reportados por Falanga y col. [97] aunque contrarios a los de Arellano-Rodrigo y col. [94] De los marcadores de activación de superficie de los neutrófilos estudiados (FT, CD11b y CD14), todos mostraban niveles superiores entre los portadores del alelo mutado JAK2

F617, pero sólo resultó estadísticamente significativa la expresión de CD14. CD14 es un receptor mieloide bacteriano que es inducido con intensidad en la membrana de los neutrófilos durante los procesos de sepsis. Este marcador es sensible a estímulos proinflamatorios, por lo que un incremento en su expresión en pacientes con TE y más acentuado en los portadores de la JAK2 V617F, iría a favor de una mayor activación de los neutrófilos en estas condiciones. Por ello, nuestros resultados indicarían una correlación entre la presencia de la mutación JAK2 V617F y variables hemostáticas de activación de neutrófilos asociados a fenómenos trombóticos y apoyaría la mayor incidencia observada de fenómenos trombóticos en presencia del cambio génico.

Estudios previos han mostrado que la activación de la señalización por la mutación JAK2 V617F se asocia a una alteración en la expresión génica en neutrófilos de pacientes con NMPc [221]. De forma interesante, se producen las mismas alteraciones génicas que tras la administración de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) a donantes sanos de células madre hematopoyéticas [221]. Adicionalmente, se ha descrito recientemente una correlación entre la presencia de JAK2 V617F y la cifra de leucocitos [86], y aunque la presencia en dicho estudio de JAK2 V617F no se identificó como factor de riesgo para trombosis, los autores sugerían validación de dichos hallazgos en estudios adicionales.

Por ello, analizamos en el grupo de pacientes con TE sin tratamiento citorreductor (evitando así las variaciones que pudieran deberse a éste), la influencia de la mutación JAK2 V617F en los recuentos celulares de sangre periférica. Observamos que la presencia de la mutación se asociaba con recuentos leucocitarios superiores, mientras que no parecía relacionarse con la

cifra de hemoglobina ni con el recuento plaquetario, hallazgos que van a favor de los publicados en estudios previos [142].

Adicionalmente, se ha descrito que la adquisición de la mutación JAK2 V617F convierte a las células hematopoyéticas en independientes al crecimiento inducido por citocinas, gracias a la activación de la ruta de activación JAK-STAT, lo que pudiera contribuir a la expansión de progenitores mieloides comunes en la médula ósea. Así, analizamos 26 muestras medulares obtenidas al diagnóstico de la enfermedad de pacientes con TE de las que 16 mostraban la mutación JAK2 V617F. De forma llamativa, se observó una relación significativa entre las concentraciones de células CD34+ en médula ósea (MO) al diagnóstico y la presencia de la mutación JAK2 V617F. Hasta ahora, y apoyando estos resultados, existen modelos animales [222-225] en los que tras trasplantar células JAK2 V617F positivas, demuestran el aumento de progenitores hematopoyéticos y un aumento en la proliferación de la línea mieloides en médula ósea de los ratones. También Vanucchi y col. [147] han descrito un aumento de la mielopoyesis en los pacientes que presentan el cambio génico. Estos resultados sugieren que JAK2 V617F a través de la activación de la ruta JAK-STAT en los progenitores hematopoyéticos, induce cambios cualitativos (activación) y cuantitativos (poliglobulia y leucocitosis) y una mayor proliferación y/o supervivencia de progenitores hematopoyéticos.

Tercer objetivo: VALORACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA Y REACTIVIDAD A EPINEFRINA EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL

Como se ha comentado, en TE paradójicamente parece coexistir una hiperactivación plaquetaria, junto con una hipo-reactividad de estas células. Quisimos aquí evaluar si de acuerdo con lo descrito en estudios previos [84,119], constatábamos una mayor activación plaquetar en pacientes con NMPc, analizando el grado de expresión de selectina-P en la superficie plaquetaria y la prolongación de los TO en cartuchos de PFA-100.

En nuestro estudio, respecto a controles sanos, los pacientes con/sin trombosis no expresaron niveles superiores de CD62-P. A diferencia de los resultados publicados por Arellano-Rodrigo y col. [94,95], no encontramos una relación estadísticamente significativa entre mayores niveles de expresión de selectina-P y la presencia de la mutación JAK2 V617F, resultados que sin embargo coinciden con un trabajo posterior publicado por Falanga y col. [97], sin encontrar una explicación clara que explique esta discrepancia (tal vez se podría justificar por el mayor número de pacientes estudiados en nuestro trabajo, similar al grupo de Falanga y col.[97])

El PFA-100 es una herramienta utilizada en muchos laboratorios para medir alteraciones de la hemostasia primaria, incluyendo alteraciones relacionadas con el FvW, alteraciones funcionales plaquetarias, y la toma de aspirina. Analizamos también en nuestro grupo de pacientes los TO, observando una prolongación de éstos tanto para Col/ADP como para Col/EPI, estando más alterado el segundo, resultados que coinciden con los escasos trabajos en este respecto [97,129]. No encontramos diferencias significativas en los TO entre los

pacientes portadores de la mutación JAK2 V617F y los pacientes que no la presentaban; estos resultados son acordes, de igual modo, con los publicados a este respecto por Falanga y col. [97].

Como dato relevante, y hasta ahora no descrito, observamos cómo aparecen TO más prolongados, entre aquellos pacientes sin tratamiento antiagregante que han presentado episodios hemorrágicos, aunque, sin llegar alcanzar valores estadísticamente significativos. Comprobamos también para validar nuestros resultados, que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la cifra de plaquetas, el hematocrito y el FvW entre el grupo de pacientes a los que se les realizó el estudio. Sería, por otro lado, necesario realizar estudios con un mayor número de pacientes para poder confirmar estos resultados.

Por otra parte, varios estudios muestran [129,226-228] que existe una hipo-reactividad plaquetaria a diversos agonistas solubles en pacientes con TE. Sin embargo las causas de dicha pérdida de función no están totalmente aclaradas. Con el fin de definir mejor las causas de la hipo-reactividad, diseñamos un estudio comparativo en pacientes con TE, en el cual analizamos datos de reactividad plaquetaria evaluada por agregometría y por una prueba específica para los receptores de ADP y epinefrina, que evalúa la fosforilación de VASP. Nuestros datos mostraron una hipo-reactividad a epinefrina que se observó de forma consistente en 80% de los pacientes con una respuesta normal al ácido araquidónico. Sin embargo, cuando medimos la respuesta a VASP en esos pacientes observamos sólo una ligera disminución de IRP-EPI similar a la de IRP-ADP. Por tanto estos resultados sugieren que la respuesta a través del receptor de epinefrina ADRA2A, es prácticamente normal y que la

disfunción a la respuesta a epinefrina radica probablemente en la vía de señalización, aguas abajo del receptor.

Hay al menos dos aspectos no estudiados hasta la fecha que podrían ayudar a desvelar los resultados “contradictorios” observados en el funcionalismo plaquetario en pacientes con TE. Por una parte, podría ser que la respuesta plaquetaria esté condicionada al grado de activación basal, lo que a su vez podría modificar el efecto antiagregante de la AAS, así como la sensibilidad a los agentes agregantes. Por otra parte, es conocido que la edad plaquetaria condiciona la generación de tromboxano A_2 (TxA_2) inducida vía COX-2, hecho inusual en plaqueta más “madura”, donde la generación de TxA_2 es dependiente de COX-1. En TE hay datos que indican la existencia de una gran población de plaquetas jóvenes circulantes. Estos son aspectos de interés que intentaremos abordar en un futuro próximo.

CONCLUSIONES

1.- Los polimorfismos hemostáticos Factor V Leiden, PT G20210A, ZPI R67Stop, HPA-1b, HPA-2b, GPIa C807T, PSGL-1 VNTR, FVII -323 Del/Ins y TUBB1 Q43P, no parecen jugar un papel importante en el desarrollo de trombosis arteriales en los pacientes diagnosticados de NMPc Ph(-). Del mismo modo, el grupo ABO, no parece actuar como una variable relevante en las alteraciones hemostáticas ni en el desarrollo de eventos tromboticos que tienen lugar en pacientes diagnosticados de NMPc Ph (-).

2.- En nuestra serie, la mutación JAK2 V617F aumenta más de tres veces el riesgo de sufrir un episodio trombotico arterial en pacientes diagnosticados de TE. La HTA aparece como único factor de riesgo cardiovascular adquirido, que de forma independiente contribuye al desarrollo de trombosis arterial en pacientes diagnosticados de TE.

3.- Los pacientes con TE exhiben un fenotipo de mayor activación leucoplaquetar respecto a los controles, y se objetiva basalmente que los enfermos que han presentado eventos tromboticos, presentan un incremento en parámetros de activación leucocitaria respecto a los que no han sufrido dichas complicaciones.

4.- Los resultados sugieren que el alelo JAK2 F617 puede incrementar la activación y proliferación de las células hematopoyéticas, particularmente de la línea granulocítica. El efecto protrombotico de la mutación JAK2 V617F podría

sustentarse en el incremento en la activación basal de los leucocitos en TE, como en su efecto indirecto sobre la leucocitosis.

5.- Los pacientes con TE sin tratamiento antiagregante, presentan tiempos de obturación alargados tanto para Col/EPI como para Col/ADP en PFA-100. La severidad de la hipo-reactividad plaquetaria en respuestas como agregación plaquetaria o PFA-100 es mucho mayor para epinefrina que para otros agonistas. Sin embargo, esta severa hiporeactividad, de acuerdo con la fosforilación de VASP, parece un fenómeno complejo, no debido exclusivamente a la ausencia o reducción drástica de receptores al agonista, sino en los mecanismos de señalización específicos.

REFERENCIAS

1. Barosi G., Mesa R.A., Thiele J., Cervantes F., Campbell P.J., Verstovsek S., Dupriez B., Levine R.L., Passamonti F., Gotlib J. et al. (2008). Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* 22: 437-438.
2. Levine R.L. and Gilliland D.G. (2008). Myeloproliferative disorders. *Blood* 112: 2190-2198.
3. Tefferi A. and Vardiman J.W. (2007). The diagnostic interface between histology and molecular tests in myeloproliferative disorders. *Curr. Opin. Hematol.* 14: 115-122.
4. Vardiman J.W., Harris N.L., and Brunning R.D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292-2302.
5. Tefferi A. and Gilliland G. (2006). Classification of chronic myeloid disorders: from Dameshek towards a semi-molecular system. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 19: 365-385.
6. Vaquez H. (1892). Sur une forme spéciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante. *CR Soc Biol (Paris)* 44:284-388.
7. Osler W. (1903). Chronic cyanosis with polycythaemia and enlarged spleen: a new clinical entity. *American Journal Medicine Sciences* 182:187-201.
8. Epstein E. (1934). Häemorrhagische Thrombocythämie bei vascularer Schrumpfmilz. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie* 292: 233-248.
9. Heuck G. (1879). Fälle von Leukämie mit eigenthümlichem Blut-resp. Knochenmarksbefund. *Virchows Archiv* 78: 475-496.
10. Dameshek W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6: 372-375.
11. Prchal J.F. and Axelrad A.A. (1974). Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 290: 1382.
12. Beutler E., Yeh M., and Fairbanks V.F. (1962). The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for C-6-PD-deficiency as a marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 48: 9-16.
13. Zanjani E.D., Lutton J.D., Hoffman R., and Wasserman L.R. (1977). Erythroid colony formation by polycythemia vera bone marrow in vitro. Dependence on erythropoietin. *J. Clin. Invest* 59: 841-848.

14. Mittelman M., Gardyn J., Carmel M., Malovani H., Barak Y., and Nir U. (1996). Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* *20*: 459-466.
15. Axelrad A.A., Eskinazi D., Correa P.N., and Amato D. (2000). Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* *96*: 3310-3321.
16. Correa P.N., Eskinazi D., and Axelrad A.A. (1994). Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood* *83*: 99-112.
17. Dai C.H., Krantz S.B., Dessypris E.N., Means R.T., Jr., Horn S.T., and Gilbert H.S. (1992). Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *80*: 891-899.
18. Dai C.H., Krantz S.B., Koury S.T., and Kollar K. (1994). Polycythaemia vera. IV. Specific binding of stem cell factor to normal and polycythaemia vera highly purified erythroid progenitor cells. *Br. J. Haematol.* *88*: 497-505.
19. D'Andrea A.D., Fasman G.D., and Lodish H.F. (1989). Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor beta chain: a new receptor family. *Cell* *58*: 1023-1024.
20. Ihle J.N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* *377*: 591-594.
21. Lindauer K., Loerting T., Liedl K.R., and Kroemer R.T. (2001). Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* *14*: 27-37.
22. James C., Ugo V., Casadevall N., Constantinescu S.N., and Vainchenker W. (2005). A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol. Med.* *11*: 546-554.
23. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swanton S., Vassiliou G.S., Bench A.J., Boyd E.M., Curtin N. et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* *365*: 1054-1061.
24. James C., Ugo V., Le Couedic J.P., Staerk J., Delhommeau F., Lacout C., Garcon L., Raslova H., Berger R., naceur-Griscelli A. et al. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* *434*: 1144-1148.

25. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R., Passweg J.R., Tichelli A., Cazzola M., and Skoda R.C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* *352*: 1779-1790.
26. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J., Boggon T.J., Wlodarska I., Clark J.J., Moore S. et al. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* *7*: 387-397.
27. Zhao R., Xing S., Li Z., Fu X., Li Q., Krantz S.B., and Zhao Z.J. (2005). Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J. Biol. Chem.* *280*: 22788-22792.
28. Cazzola M. and Skoda R. (2005). Gain of function, loss of control - a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* *90*: 871-874.
29. Mesa R.A., Verstovsek S., Cervantes F., Barosi G., Reilly J.T., Dupriez B., Levine R., Le Bousse-Kerdiles M.C., Wadleigh M., Campbell P.J. et al. (2007). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk. Res.* *31*: 737-740.
30. Steensma D.P. (2006). JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J. Mol. Diagn.* *8*: 397-411.
31. Renneville A., Quesnel B., Charpentier A., Terriou L., Crinquette A., Lai J.L., Cossement C., Lionne-Huyghe P., Rose C., Bauters F. et al. (2006). High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia* *20*: 2067-2070.
32. Wang S.A., Hasserjian R.P., Loew J.M., Sechman E.V., Jones D., Hao S., Liu Q., Zhao W., Mehdi M., Galili N. et al. (2006). Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia* *20*: 1641-1644.
33. Kremer M., Horn T., Dechow T., Tzankov A., Quintanilla-Martinez L., and Fend F. (2006). The JAK2 V617F mutation occurs frequently in myelodysplastic/myeloproliferative diseases, but is absent in true myelodysplastic syndromes with fibrosis. *Leukemia* *20*: 1315-1316.

34. Vizmanos J.L., Ormazabal C., Larrayoz M.J., Cross N.C., and Calasanz M.J. (2006). JAK2 V617F mutation in classic chronic myeloproliferative diseases: a report on a series of 349 patients. *Leukemia* 20: 534-535.
35. Nishii K., Nanbu R., Lorenzo V.F., Monma F., Kato K., Ryuu H., and Katayama N. (2007). Expression of the JAK2 V617F mutation is not found in de novo AML and MDS but is detected in MDS-derived leukemia of megakaryoblastic nature. *Leukemia* 21: 1337-1338.
36. Steensma D.P., DeWald G.W., Lasho T.L., Powell H.L., McClure R.F., Levine R.L., Gilliland D.G., and Tefferi A. (2005). The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 106: 1207-1209.
37. Steensma D.P., McClure R.F., Karp J.E., Tefferi A., Lasho T.L., Powell H.L., DeWald G.W., and Kaufmann S.H. (2006). JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 20: 971-978.
38. Fiorini A., Farina G., Reddicono G., Palladino M., Rossi E., Za T., Laurenti L., Giammarco S., Chiusolo P., Leone G. et al. (2006). Screening of JAK2 V617F mutation in multiple myeloma. *Leukemia* 20: 1912-1913.
39. Melzner I., Weniger M.A., Menz C.K., and Moller P. (2006). Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 20: 157-158.
40. Pardanani A.D., Levine R.L., Lasho T., Pikman Y., Mesa R.A., Wadleigh M., Steensma D.P., Elliott M.A., Wolanskyj A.P., Hogan W.J. et al. (2006). MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108: 3472-3476.
41. Bennett M. and Stroncek D.F. (2006). Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *J. Transl. Med.* 4: 41.
42. Pikman Y., Lee B.H., Mercher T., McDowell E., Ebert B.L., Gozo M., Cuker A., Wernig G., Moore S., Galinsky I. et al. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS. Med.* 3: e270.
43. Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P., Pancrazzi A., Guerini V., Barosi G., Ruggeri M., Specchia G., Lo-Coco F., Delaini F. et al. (2008). Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 112: 844-847.
44. Guglielmelli P., Pancrazzi A., Bergamaschi G., Rosti V., Villani L., Antonioli E., Bosi A., Barosi G., and Vannucchi A.M. (2007). Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br. J. Haematol.* 137: 244-247.

45. Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P., Pancrazzi A., Guerini V., Barosi G, Ruggeri G., Specchia E, et al. (2008). Characteristics and clinical correlates of MPL W515>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 112: 844-847.
46. Williams D.M., Kim A.H., Rogers O., Spivak J.L., and Moliterno A.R. (2007). Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp. Hematol.* 35: 1641-1646.
47. Beer P.A., Campbell P.,Rever W.N.,Scout L.M.,Bench A.J.,Bareford D. (2007). Clinical significance of MPL mutation in essential thrombocythemia: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 110: Abstract 677
48. Ding J., Komatsu H., Wakita A., Kato-Uranishi M., Ito M., Satoh A., Tsuboi K., Nitta M., Miyazaki H., Iida S. et al. (2004). Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 103: 4198-4200.
49. Scott L.M., Tong W., Levine R.L., Scott M.A., Beer P.A., Stratton M.R., Futreal P.A., Erber W.N., McMullin M.F., Harrison C.N. et al. (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 356: 459-468.
50. Martinez-Aviles L., Besses C., Alvarez-Larran A., Cervantes F., Hernandez-Boluda J.C., and Bellosillo B. (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 92: 1717-1718.
51. Pardanani A., Lasho T.L., Finke C., Hanson C.A., and Tefferi A. (2007). Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 21: 1960-1963.
52. Percy M.J., Scott L.M., Erber W.N., Harrison C.N., Reilly J.T., Jones F.G., Green A.R., and McMullin M.F. (2007). The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 92: 1607-1614.
53. Delhommeau F., Dupont S., Della V., V, James C., Trannoy S., Masse A., Kosmider O., Le Couedic J.P., Robert F., Alberdi A. et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 360: 2289-2301.
54. Tefferi A., Lim K.H., bdel-Wahab O., Lasho T.L., Patel J., Patnaik M.M., Hanson C.A., Pardanani A., Gilliland D.G., and Levine R.L. (2009). Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 23: 1343-1345.
55. Tefferi A., Pardanani A., Lim K.H., bdel-Wahab O., Lasho T.L., Patel J., Gangat N., Finke C.M., Schwager S., Mullally A. et al. (2009). TET2

- mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 23: 905-911.
56. Langemeijer S.M., Kuiper R.P., Berends M., Knops R., Aslanyan M.G., Massop M., Stevens-Linders E., van H.P., van Kessel A.G., Raymakers R.A. et al. (2009). Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 41: 838-842.
 57. Tefferi A., Thiele J., Orazi A., Kvasnicka H.M., Barbui T., Hanson C.A., Barosi G., Verstovsek S., Birgegard G., Mesa R. et al. (2007). 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* 110: 1092-1097.
 58. Tefferi A. and Vardiman J.W. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22: 14-22.
 59. Pearson T.C. and Messinezy M. (1996). The diagnostic criteria of polycythaemia rubra vera. *Leuk. Lymphoma* 22 Suppl 1: 87-93.
 60. Tefferi A. and Gilliland D.G. (2005). The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin. Proc.* 80: 947-958.
 61. Besses C., Cervantes F., Pereira A., Florensa L., Sole F., Hernandez-Boluda J.C., Woessner S., Sans-Sabrafen J., Rozman C., and Montserrat E. (1999). Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 13: 150-154.
 62. Cortelazzo S., Viero P., Finazzi G., D'Emilio A., Rodeghiero F., and Barbui T. (1990). Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J. Clin. Oncol.* 8: 556-562.
 63. Jensen M.K., de Nully B.P., Nielsen O.J., and Hasselbalch H.C. (2000). Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *Eur. J. Haematol.* 65: 132-139.
 64. Landolfi R., Rocca B., and Patrono C. (1995). Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 20: 203-222.
 65. Landolfi R. and Marchioli R. (1997). European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP): a randomized trial. *Semin. Thromb. Hemost.* 23: 473-478.

66. Gruppo Italiano Studio Policitemia (1995). Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann. Intern. Med.* *123*: 656-664.
67. Landolfi R., Di G.L., and Falanga A. (2008). Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia* *22*: 2020-2028.
68. Marchioli R., Finazzi G., Landolfi R., Kutti J., Gisslinger H., Patrono C., Marilus R., Villegas A., Tognoni G., and Barbui T. (2005). Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* *23*: 2224-2232.
69. Rossi C., Randi M.L., Zerbinati P., Rinaldi V., and Girolami A. (1998). Acute coronary disease in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J. Intern. Med.* *244*: 49-53.
70. Najean Y., Mugnier P., Dresch C., and Rain J.D. (1987). Polycythaemia vera in young people: an analysis of 58 cases diagnosed before 40 years. *Br. J. Haematol.* *67*: 285-291.
71. Perea G., Remacha A., Besses C., Jimenez M., Florensa L., and Cervantes F. (2001). Is polycythemia vera a serious disease in young adults? *Haematologica* *86*: 543-544.
72. Schafer A.I. (1984). Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood* *64*: 1-12.
73. Briere J.B. (2006). Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis associated with myeloproliferative disorders: diagnosis and management. *Semin. Thromb. Hemost.* *32*: 208-218.
74. Chait Y., Condat B., Cazals-Hatem D., Rufat P., Atmani S., Chaoui D., Guilmin F., Kiladjian J.J., Plessier A., Denninger M.H. et al. (2005). Relevance of the criteria commonly used to diagnose myeloproliferative disorder in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br. J. Haematol.* *129*: 553-560.
75. Patel R.K., Lea N.C., Heneghan M.A., Westwood N.B., Milojkovic D., Thanigaikumar M., Yallop D., Arya R., Pagliuca A., Gaken J. et al. (2006). Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* *130*: 2031-2038.
76. Primignani M., Barosi G., Bergamaschi G., Gianelli U., Fabris F., Reati R., Dell'era A., Bucciarelli P., and Mannucci P.M. (2006). Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* *44*: 1528-1534.
77. Kiladjian J.J., Cervantes F., Leebeek F.W., Marzac C., Cassinat B., Chevret S., Cazals-Hatem D., Plessier A., Garcia-Pagan J.C., Murad S.D. et al. (2008). The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis

- and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* 111: 4922-4929.
78. Elliott M.A. and Tefferi A. (2005). Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br. J. Haematol.* 128: 275-290.
 79. Zucker S. and Mielke C.H. (1972). Classification of thrombocytosis based on platelet function tests: correlation with hemorrhagic and thrombotic complications. *J. Lab Clin. Med.* 80: 385-394.
 80. Randi M.L., Stocco F., Rossi C., Tison T., and Girolami A. (1991). Thrombosis and hemorrhage in thrombocytosis: evaluation of a large cohort of patients (357 cases). *J. Med.* 22: 213-223.
 81. Colombi M., Radaelli F., Zocchi L., and Maiolo A.T. (1991). Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. A retrospective study of 103 patients. *Cancer* 67: 2926-2930.
 82. Tartaglia A.P., Goldberg J.D., Berk P.D., and Wasserman L.R. (1986). Adverse effects of antiaggregating platelet therapy in the treatment of polycythemia vera. *Semin. Hematol.* 23: 172-176.
 83. Budde U. and van Genderen P.J. (1997). Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin. Thromb. Hemost.* 23: 425-431.
 84. Michiels J.J., Berneman Z., Van B.D., van der P.M., De R.H., and Schroyens W. (2006). Clinical and laboratory features, pathobiology of platelet-mediated thrombosis and bleeding complications, and the molecular etiology of essential thrombocythemia and polycythemia vera: therapeutic implications. *Semin. Thromb. Hemost.* 32: 174-207.
 85. Menon K.V., Shah V., and Kamath P.S. (2004). The Budd-Chiari syndrome. *N. Engl. J. Med.* 350: 578-585.
 86. Carobbio A., Finazzi G., Guerini V., Spinelli O., Delaini F., Marchioli R., Borrelli G., Rambaldi A., and Barbui T. (2007). Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 109: 2310-2313.
 87. Landolfi R., Di G.L., Barbui T., De S., V, Finazzi G., Marfisi R., Tognoni G., and Marchioli R. (2007). Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 109: 2446-2452.
 88. Alvarez-Larran A., Cervantes F., Bellosillo B., Giralt M., Julia A., Hernandez-Boluda J.C., Bosch A., Hernandez-Nieto L., Clapes V., Burgaleta C. et al. (2007). Essential thrombocythemia in young individuals: frequency and risk factors for vascular events and evolution to myelofibrosis in 126 patients. *Leukemia* 21: 1218-1223.

89. Wolanskyj A.P., Schwager S.M., McClure R.F., Larson D.R., and Tefferi A. (2006). Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin. Proc.* 81: 159-166.
90. De S., V, Za T., Rossi E., Vannucchi A.M., Ruggeri M., Elli E., Mico C., Tieghi A., Cacciola R.R., Santoro C. et al. (2008). Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica* 93: 372-380.
91. Gangat N., Strand J., Li C.Y., Wu W., Pardanani A., and Tefferi A. (2007). Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br. J. Haematol.* 138: 354-358.
92. Levine R.L., Pardanani A., Tefferi A., and Gilliland D.G. (2007). Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat. Rev. Cancer* 7: 673-683.
93. Colaizzo D., Amitrano L., Tiscia G.L., Scenna G., Grandone E., Guardascione M.A., Brancaccio V., and Margaglione M. (2007). The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 5: 55-61.
94. Arellano-Rodrigo E., Alvarez-Larran A., Reverter J.C., Villamor N., Colomer D., and Cervantes F. (2006). Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 91: 169-175.
95. Arellano-Rodrigo E., Alvarez-Larran A., Reverter J.C., Colomer D., Villamor N., Bellosillo B., and Cervantes F. (2009). Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am. J. Hematol.* 84: 102-108.
96. Robertson B., Urquhart C., Ford I., Townend J., Watson H.G., Vickers M.A., and Greaves M. (2007). Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *J. Thromb. Haemost.* 5: 1679-1685.
97. Falanga A., Marchetti M., Vignoli A., Balducci D., Russo L., Guerini V., and Barbui T. (2007). V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp. Hematol.* 35: 702-711.
98. Passamonti F., Rumi E., Pietra D., la Porta M.G., Boveri E., Pascutto C., Vanelli L., Arcaini L., Burcheri S., Malcovati L. et al. (2006). Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and

- constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 107: 3676-3682.
99. Marchetti M., Castoldi E., Spronk H.M., van O.R., Balducci D., Barbui T., Rosing J., Ten C.H., and Falanga A. (2008). Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 112: 4061-4068.
 100. Cervantes F., Mellano-Rodrigo E., and Alvarez-Larran A. (2009). Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 94: 1484-1488.
 101. Jantunen R., Juvonen E., Ikkala E., Oksanen K., Anttila P., and Ruutu T. (2001). The predictive value of vascular risk factors and gender for the development of thrombotic complications in essential thrombocythemia. *Ann. Hematol.* 80: 74-78.
 102. van Genderen P.J., Mulder P.G., Waleboer M., van de M.D., and Michiels J.J. (1997). Prevention and treatment of thrombotic complications in essential thrombocythaemia: efficacy and safety of aspirin. *Br. J. Haematol.* 97: 179-184.
 103. Afshar-Kharghan V., Lopez J.A., Gray L.A., Padilla A., Borthakur G., Roberts S.C., Pruthi R.K., and Tefferi A. (2004). Hemostatic gene polymorphisms and the prevalence of thrombotic complications in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 15: 21-24.
 104. Tefferi A., Gangat N., and Wolanskyj A. (2007). The interaction between leukocytosis and other risk factors for thrombosis in essential thrombocythemia. *Blood* 109: 4105.
 105. Ruggeri M., Gisslinger H., Tosetto A., Rintelen C., Mannhalter C., Pabinger I., Heis N., Castaman G., Missiaglia E., Lechner K. et al. (2002). Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am. J. Hematol.* 71: 1-6.
 106. Press R.D., Bauer K.A., Kujovich J.L., and Heit J.A. (2002). Clinical utility of factor V Leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders. *Arch. Pathol. Lab Med.* 126: 1304-1318.
 107. De S., V, Za T., Rossi E., Fiorini A., Ciminello A., Luzzi C., Chiusolo P., Sica S., and Leone G. (2009). Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematologica* 94: 733-737.
 108. Harrison C.N., Donohoe S., Carr P., Dave M., Mackie I., and Machin S.J. (2002). Patients with essential thrombocythaemia have an increased prevalence of antiphospholipid antibodies which may be associated with thrombosis. *Thromb. Haemost.* 87: 802-807.

109. Jensen M.K., de Nully B.P., Thorsen S., and Hasselbalch H.C. (2002). Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, Factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Hematol.* 69: 185-191.
110. Schleef M., Strobel E., Dick A., Frank J., Schramm W., and Spannagl M. (2005). Relationship between ABO and Secretor genotype with plasma levels of factor VIII and von Willebrand factor in thrombosis patients and control individuals. *Br. J. Haematol.* 128: 100-107.
111. Mercier B., Oger E., Le G.G., Mottier D., and Ferec C. (2005). Phenotypic but not allelic ABO blood group association with risk of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 93: 388-389.
112. Tirado I., Mateo J., Soria J.M., Oliver A., Martinez-Sanchez E., Vallve C., Borrell M., Urrutia T., and Fontcuberta J. (2005). The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb. Haemost.* 93: 468-474.
113. Larsen T.B., Johnsen S.P., Gislum M., Moller C.A., Larsen H., and Sorensen H.T. (2005). ABO blood groups and risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. A population-based, nested case-control study. *J. Thromb. Haemost.* 3: 300-304.
114. Morelli V.M., De Visser M.C., Vos H.L., Bertina R.M., and Rosendaal F.R. (2005). ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J. Thromb. Haemost.* 3: 183-185.
115. Ohira T., Cushman M., Tsai M.Y., Zhang Y., Heckbert S.R., Zakai N.A., Rosamond W.D., and Folsom A.R. (2007). ABO blood group, other risk factors and incidence of venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *J. Thromb. Haemost.* 5: 1455-1461.
116. Clark P. and Wu O. (2008). ABO(H) blood groups and pre-eclampsia. A systematic review and meta-analysis. *Thromb. Haemost.* 100: 469-474.
117. Quiroga T., Goycoolea M., Panes O., Aranda E., Martinez C., Belmont S., Munoz B., Zuniga P., Pereira J., and Mezzano D. (2007). High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica* 92: 357-365.
118. Jenkins P.V. and O'Donnell J.S. (2006). ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion* 46: 1836-1844.
119. Raszeja-Specht A., Skibowska A., Bieniaszewska M., and Szutowicz A. (2001). Relationships between thrombohemorrhagic complications and platelet function in patients with essential thrombocythaemia. *Am. J. Hematol.* 68: 32-36.

120. Cortelazzo S., Finazzi G., Ruggeri M., Vestri O., Galli M., Rodeghiero F., and Barbui T. (1995). Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N. Engl. J. Med.* *332*: 1132-1136.
121. Buss D.H., Stuart J.J., and Lipscomb G.E. (1985). The incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in association with extreme thrombocytosis: an analysis of 129 cases. *Am. J. Hematol.* *20*: 365-372.
122. Landolfi R., Cipriani M.C., and Novarese L. (2006). Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* *19*: 617-633.
123. Harrison C.N. (2005). Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 409-415.
124. Di N.M., Barbui T., Di G.L., Borrelli G., Finazzi G., Landolfi R., Leone G., Marfisi R., Porreca E., Ruggeri M. et al. (2007). The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br. J. Haematol.* *136*: 249-259.
125. Harrison C.N., Campbell P.J., Buck G., Wheatley K., East C.L., Bareford D., Wilkins B.S., van der Walt J.D., Reilly J.T., Grigg A.P. et al. (2005). Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* *353*: 33-45.
126. Carobbio A., Finazzi G., Antonioli E., Guglielmelli P., Vannucchi A.M., Delaini F., Guerini V., Ruggeri M., Rodeghiero F., Rambaldi A. et al. (2008). Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood* *112*: 3135-3137.
127. Jensen M.K., de Nully B.P., Lund B.V., Nielsen O.J., and Hasselbalch H.C. (2000). Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* *110*: 116-124.
128. Valles J., Santos M.T., Aznar J., Martinez M., Moscardo A., Pinon M., Broekman M.J., and Marcus A.J. (2002). Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood* *99*: 3978-3984.
129. Cesar J.M., de M.D., Garcia A.A., and Burgaleta C. (2005). Platelet dysfunction in primary thrombocythemia using the platelet function analyzer, PFA-100. *Am. J. Clin. Pathol.* *123*: 772-777.
130. Spaet T.H., Gaynor E., and Goldstein M.L. (1969). Defective platelets in essential thrombocythemia. *Arch. Intern. Med.* *124*: 135-141.
131. Mayordomo O., Carcamo C., Vecino A.M., Navarro J.L., and Cesar J.M. (1995). Arachidonic acid metabolism in platelets of patients with essential thrombocythaemia. *Thromb. Res.* *78*: 315-321.

132. Sarma J., Laan C.A., Alam S., Jha A., Fox K.A., and Dransfield I. (2002). Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 105: 2166-2171.
133. McCabe D.J., Harrison P., Mackie I.J., Sidhu P.S., Purdy G., Lawrie A.S., Watt H., Brown M.M., and Machin S.J. (2004). Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br. J. Haematol.* 125: 777-787.
134. Burgaleta C., Gonzalez N., and Cesar J. (2002). Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematol.* 108: 23-28.
135. Falanga A., Marchetti M., Barbui T., and Smith C.W. (2005). Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin. Hematol.* 42: 239-247.
136. Pieri L., Bogani C., Guglielmelli P., Zingariello M., Rana R.A., Bartalucci N., Bosi A., and Vannucchi A.M. (2009). The JAK2V617 mutation induces constitutive activation and agonist hypersensitivity in basophils from patients with polycythemia vera. *Haematologica* 94: 1537-1545.
137. Pearson T.C. and Wetherley-Mein G. (1978). Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet* 2: 1219-1222.
138. Kwaan H.C. and Wang J. (2003). Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities. *Semin. Thromb. Hemost.* 29: 451-458.
139. Turitto V.T. and Weiss H.J. (1980). Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science* 207: 541-543.
140. Yedgar S., Koshkaryev A., and Barshtein G. (2002). The red blood cell in vascular occlusion. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 32: 263-268.
141. Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P., Pardanani A., and Tefferi A. (2008). Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 22: 1299-1307.
142. Campbell P.J., Scott L.M., Buck G., Wheatley K., East C.L., Marsden J.T., Duffy A., Boyd E.M., Bench A.J., Scott M.A. et al. (2005). Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 366: 1945-1953.
143. Campbell P.J., Griesshammer M., Dohner K., Dohner H., Kusec R., Hasselbalch H.C., Larsen T.S., Pallisgaard N., Giraudier S., Le Bousse-Kerdiles M.C. et al. (2006). V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 107: 2098-2100.

144. Tefferi A., Lasho T.L., Schwager S.M., Steensma D.P., Mesa R.A., Li C.Y., Wadleigh M., and Gary G.D. (2005). The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br. J. Haematol.* 131: 320-328.
145. Barosi G., Bergamaschi G., Marchetti M., Vannucchi A.M., Guglielmelli P., Antonioli E., Massa M., Rosti V., Campanelli R., Villani L. et al. (2007). JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 110: 4030-4036.
146. Tefferi A., Lasho T.L., Huang J., Finke C., Mesa R.A., Li C.Y., Wu W., Hanson C.A., and Pardanani A. (2008). Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 22: 756-761.
147. Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P., Rambaldi A., Barosi G., Marchioli R., Marfisi R.M., Finazzi G., Guerini V., Fabris F. et al. (2007). Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 110: 840-846.
148. Finazzi G., Caruso V., Marchioli R., Capnist G., Chisesi T., Finelli C., Gugliotta L., Landolfi R., Kutti J., Gisslinger H. et al. (2005). Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* 105: 2664-2670.
149. Mesa R.A., Powell H., Lasho T., DeWald G.W., McClure R., and Tefferi A. (2006). A longitudinal study of the JAK2(V617F) mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: analysis at two time points. *Haematologica* 91: 415-416.
150. Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P., Longo G., Pancrazzi A., Ponziani V., Bogani C., Ferrini P.R., Rambaldi A., Guerini V. et al. (2007). Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 21: 1952-1959.
151. Silver R.T., Vandris K., Wang L.Y., Cristos P.J., D'Adriano F., Jones A.V. (2007). JAK2 V617F mutational load in patients with polycythemia vera measured by peripheral blood DNA is associated with disease severity. *Blood* 100; abstract 2530.
152. Tefferi A., Strand J.J., Lasho T.L., Knudson R.A., Finke C.M., Gangat N., Pardanani A., Hanson C.A., and Ketterling R.P. (2007). Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera. *Leukemia* 21: 2074-2075.
153. Antonioli E., Guglielmelli P., Poli G., Bogani C., Pancrazzi A., Longo G., Ponziani V., Tozzi L., Pieri L., Santini V. et al. (2008). Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 93: 41-48.

154. Dupriez B., Morel P., Demory J.L., Lai J.L., Simon M., Plantier I., and Bauters F. (1996). Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 88: 1013-1018.
155. Elliott M.A., Verstovsek S., Dingli D., Schwager S.M., Mesa R.A., Li C.Y., and Tefferi A. (2007). Monocytosis is an adverse prognostic factor for survival in younger patients with primary myelofibrosis. *Leuk. Res.* 31: 1503-1509.
156. Cervantes F., Dupriez B., Pereira A., Passamonti F., Reilly J.T., Morra E., Vannucchi A.M., Mesa R.A., Demory J.L., Barosi G. et al. (2009). New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 113: 2895-2901.
157. Landolfi R., Marchioli R., Kutti J., Gisslinger H., Tognoni G., Patrono C., and Barbui T. (2004). Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 350: 114-124.
158. Di N.M., Barbui T., Di G.L., Borrelli G., Finazzi G., Landolfi R., Leone G., Marfisi R., Porreca E., Ruggeri M. et al. (2007). The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br. J. Haematol.* 136: 249-259.
159. Barosi G., Besses C., Birgegard G., Briere J., Cervantes F., Finazzi G., Gisslinger H., Griesshammer M., Gugliotta L., Harrison C. et al. (2007). A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia* 21: 277-280.
160. Giralt M., Navas V., Hernandez-Nieto L., Burgaleta C., Carbonell F., Ramirez G., Vicente V., and Besses C. (2009). [Retrospective analysis of the efficacy and tolerability of anagrelide in patients with essential thrombocythemia: Spanish registry of essential thrombocythemia]. *Med. Clin. (Barc.)* 133: 86-90.
161. Birgegard G. (2006). Anagrelide treatment in myeloproliferative disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 32: 260-266.
162. Cervantes F., Alvarez-Larran A., Hernandez-Boluda J.C., Sureda A., Torreadell M., and Montserrat E. (2004). Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *Br. J. Haematol.* 127: 399-403.
163. Cervantes F., Hernandez-Boluda J.C., Alvarez A., Nadal E., and Montserrat E. (2000). Danazol treatment of idiopathic myelofibrosis with severe anemia. *Haematologica* 85: 595-599.
164. Lofvenberg E., Wahlin A., Roos G., and Ost A. (1990). Reversal of myelofibrosis by hydroxyurea. *Eur. J. Haematol.* 44: 33-38.

165. Faoro L.N., Tefferi A., and Mesa R.A. (2005). Long-term analysis of the palliative benefit of 2-chlorodeoxyadenosine for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Eur. J. Haematol.* 74: 117-120.
166. Deeg H.J., Gooley T.A., Flowers M.E., Sale G.E., Slattery J.T., Anasetti C., Chauncey T.R., Doney K., Georges G.E., Kiem H.P. et al. (2003). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 102: 3912-3918.
167. Rondelli D., Barosi G., Bacigalupo A., Prchal J.T., Popat U., Alessandrino E.P., Spivak J.L., Smith B.D., Klingemann H.G., Fruchtman S. et al. (2005). Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 105: 4115-4119.
168. Barosi G., Grossi A., Comotti B., Musto P., Gamba G., and Marchetti M. (2001). Safety and efficacy of thalidomide in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* 114: 78-83.
169. Mesa R.A., Steensma D.P., Pardanani A., Li C.Y., Elliott M., Kaufmann S.H., Wiseman G., Gray L.A., Schroeder G., Reeder T. et al. (2003). A phase 2 trial of combination low-dose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 101: 2534-2541.
170. Tefferi A., Cortes J., Verstovsek S., Mesa R.A., Thomas D., Lasho T.L., Hogan W.J., Litzow M.R., Allred J.B., Jones D. et al. (2006). Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 108: 1158-1164.
171. Giles F.J., List A.F., Carroll M., Cortes J.E., Valickas J., Chen B.L., Masson E., Jacques C., Laurent D., Albitar M. et al. (2007). PTK787/ZK 222584, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor of vascular endothelial growth factor (VEGF), has modest activity in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leuk. Res.* 31: 891-897.
172. Pardanani A., Hood J., Lasho T., Levine R.L., Martin M.B., Noronha G., Finke C., Mak C.C., Mesa R., Zhu H. et al. (2007). TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* 21: 1658-1668.
173. Grandage V.L., Everington T., Linch D.C., and Khwaja A. (2006). Go6976 is a potent inhibitor of the JAK 2 and FLT3 tyrosine kinases with significant activity in primary acute myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 135: 303-316.
174. Li Z., Xu M., Xing S., Ho W.T., Ishii T., Li Q., Fu X., and Zhao Z.J. (2007). Erlotinib effectively inhibits JAK2V617F activity and polycythemia vera cell growth. *J. Biol. Chem.* 282: 3428-3432.

175. Hexner E.O., Serdikoff C., Jan M., Swider C.R., Robinson C., Yang S., Angeles T., Emerson S.G., Carroll M., Ruggeri B. et al. (2008). Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 111: 5663-5671.
176. Lasho T.L., Tefferi A., Hood J.D., Verstovsek S., Gilliland D.G., and Pardanani A. (2008). TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia* 22: 1790-1792.
177. Mesa R.A. and Tefferi A. (2009). Emerging drugs for the therapy of primary and post essential thrombocythemia, post polycythemia vera myelofibrosis. *Expert. Opin. Emerg. Drugs*.
178. Barosi G., Berzuini C., Liberato L.N., Costa A., Polino G., and Ascarì E. (1988). A prognostic classification of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* 70: 397-401.
179. Cervantes F., Pereira A., Esteve J., Rafel M., Cobo F., Rozman C., and Montserrat E. (1997). Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *Br. J. Haematol.* 97: 635-640.
180. Hasselbalch H. (1990). Idiopathic myelofibrosis: a clinical study of 80 patients. *Am. J. Hematol.* 34: 291-300.
181. Kvasnicka H.M., Thiele J., Werden C., Zankovich R., Diehl V., and Fischer R. (1997). Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis. *Cancer* 80: 708-719.
182. McNally R.J., Rowland D., Roman E., and Cartwright R.A. (1997). Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol. Oncol.* 15: 173-189.
183. Reilly J.T., Snowden J.A., Spearing R.L., Fitzgerald P.M., Jones N., Watmore A., and Potter A. (1997). Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br. J. Haematol.* 98: 96-102.
184. Rupoli S., Da L.L., Sisti S., Campanati G., Salvi A., Brianzoni M.F., D'Amico S., Cinciripini A., and Leoni P. (1994). Primary myelofibrosis: a detailed statistical analysis of the clinicopathological variables influencing survival. *Ann. Hematol.* 68: 205-212.
185. Visani G., Finelli C., Castelli U., Petti M.C., Ricci P., Vianelli N., Gianni L., Zuffa E., oe Spiriti M.A., Latagliata R. et al. (1990). Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br. J. Haematol.* 75: 4-9.

186. Kiladjian J.J., Gardin C., Renoux M., Bruno F., and Bernard J.F. (2003). Long-term outcomes of polycythemia vera patients treated with pipobroman as initial therapy. *Hematol. J.* 4: 198-207.
187. Rozman C., Giralt M., Feliu E., Rubio D., and Cortes M.T. (1991). Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 67: 2658-2663.
188. Cervantes F., Barosi G., Demory J.L., Reilly J., Guarnone R., Dupriez B., Pereira A., and Montserrat E. (1998). Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br. J. Haematol.* 102: 684-690.
189. Passamonti F., Rumi E., Pungolino E., Malabarba L., Bertazzoni P., Valentini M., Orlandi E., Arcaini L., Brusamolino E., Pascutto C. et al. (2004). Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am. J. Med.* 117: 755-761.
190. Alvarez-Larran A., Bellosillo B., Martinez-Aviles L., Saumell S., Salar A., Abella E., Gimeno E., Serrano S., Florensa L., Sanchez B. et al. (2009). Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br. J. Haematol.* 146: 504-509.
191. Cervantes F., Alvarez-Larran A., Talam C., Gomez M., and Montserrat E. (2002). Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br. J. Haematol.* 118: 786-790.
192. Cervantes F., Passamonti F., and Barosi G. (2008). Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 22: 905-914.
193. Jensen M.K., de Nully B.P., Nielsen O.J., and Hasselbalch H.C. (2000). Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *Eur. J. Haematol.* 65: 132-139.
194. Olsson M.L. and Chester M.A. (1995). A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O2 versus A/O2 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang.* 69: 242-247.
195. Lozano M.L., Gonzalez-Conejero R., Corral J., Rivera J., Iniesta J.A., Martinez C., and Vicente V. (2001). Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 are associated with neutrophil-platelet adhesion and with ischaemic cerebrovascular disease. *Br. J. Haematol.* 115: 969-976.
196. Gomez-Espuch J., Moraleda J.M., Ortuno F., Lozano M.L., Ayala F., Vallejo C., de A.F., and Vicente V. (2000). Mobilization of hematopoietic progenitor cells with paclitaxel (taxol) as a single chemotherapeutic agent, associated with rhG-CSF. *Bone Marrow Transplant.* 25: 231-235.

197. Navarro-Núñez L, Lozano M.L., Anton A.I., Roldan V., Martinez C., Vicente V., Rivera J. (2008). Trastornos de receptores de membrana plaquetaria. *Haematologica* 93 (Supl. 1): 253-263.
198. Aleil B., Ravanat C., Cazenave J.P., Rochoux G., Heitz A., and Gachet C. (2005). Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J. Thromb. Haemost.* 3: 85-92.
199. Geiger J., Brich J., Honig-Liedl P., Eigenthaler M., Schanzenbacher P., Herbert J.M., and Walter U. (1999). Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 2007-2011.
200. Mackman N. (2009). The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth. Analg.* 108: 1447-1452.
201. Corral J., Gonzalez-Conejero R., Soria J.M., Gonzalez-Porrás J.R., Perez-Ceballos E., Lecumberri R., Roldan V., Souto J.C., Minano A., Hernandez-Espinosa D. et al. (2006). A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood* 108: 177-183.
202. Franco R.F. and Reitsma P.H. (2001). Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum. Genet.* 109: 369-384.
203. Corral J., Gonzalez-Conejero R., Rivera J., Iniesta J.A., Lozano M.L., and Vicente V. (1997). HPA-1 genotype in arterial thrombosis--role of HPA-1b polymorphism in platelet function. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 8: 284-290.
204. Corral J., Gonzalez-Conejero R., Rivera J., Ortuno F., Aparicio P., and Vicente V. (1999). Role of the 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function--effect in thromboembolic diseases. *Thromb. Haemost.* 81: 951-956.
205. Franco R.F. and Reitsma P.H. (2001). Gene polymorphisms of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *Br. J. Haematol.* 115: 491-506.
206. Gonzalez-Conejero R., Lozano M.L., Rivera J., Corral J., Iniesta J.A., Moraleda J.M., and Vicente V. (1998). Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 92: 2771-2776.
207. Navarro-Nunez L., Lozano M.L., Rivera J., Corral J., Roldan V., Gonzalez-Conejero R., Iniesta J.A., Montaner J., Vicente V., and Martinez C. (2007). The association of the beta1-tubulin Q43P polymorphism with intracerebral hemorrhage in men. *Haematologica* 92: 513-518.

208. Roldan V., Marin F., Gonzalez-Conejero R., Garcia-Honrubia A., Marti S., Alfaro A., Valdes M., Corral J., Lip G.Y., and Vicente V. (2008). Factor VII -323 decanucleotide D/I polymorphism in atrial fibrillation: implications for the prothrombotic state and stroke risk. *Ann. Med.* **40**: 553-559.
209. Gisslinger H., Mullner M., Pabinger I., Heis-Vahidi-Fard N., Gisslinger B., Brichta A., Bachleitner-Hofmann T., and Mannhalter C. (2005). Mutation of the prothrombin gene and thrombotic events in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia: a cohort study. *Haematologica* **90**: 408-410.
210. Shih L.Y., Lin T.L., Lai C.L., Dunn P., Wu J.H., Wang P.N., Kuo M.C., and Lee L.C. (2002). Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinicohematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia. *Blood* **100**: 1596-1601.
211. Lussana F., Caberlon S., Pagani C., Kamphuisen P.W., Buller H.R., and Cattaneo M. (2009). Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb. Res.* **124**: 409-417.
212. Lane D.A. and Grant P.J. (2000). Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* **95**: 1517-1532.
213. Falanga A., Marchetti M., Vignoli A., Balducci D., and Barbui T. (2005). Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp. Hematol.* **33**: 523-530.
214. Mackman N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1015-1022.
215. Osterud B. (1998). Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **9 Suppl 1**: S9-14.
216. Maugeri N., Giordano G., Petrilli M.P., Fraticelli V., de G.G., Cerletti C., Storti S., and Donati M.B. (2006). Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: a new effect for an old drug? *J. Thromb. Haemost.* **4**: 2593-2598.
217. Maugeri N., Brambilla M., Camera M., Carbone A., Tremoli E., Donati M.B., de G.G., and Cerletti C. (2006). Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost.* **4**: 1323-1330.
218. Nakamura S., Imamura T., and Okamoto K. (2004). Tissue factor in neutrophils: yes. *J. Thromb. Haemost.* **2**: 214-217.

219. Nemerson Y. (2000). Tissue factor in neutrophils. *Thromb. Haemost.* 83: 802.
220. Osterud B. (2004). Tissue factor in neutrophils: no. *J. Thromb. Haemost.* 2: 218-220.
221. Kralovics R., Teo S.S., Buser A.S., Brutsche M., Tiedt R., Tichelli A., Passamonti F., Pietra D., Cazzola M., and Skoda R.C. (2005). Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 106: 3374-3376.
222. Bumm T.G., Elsea C., Corbin A.S., Loriaux M., Sherbenou D., Wood L., Deininger J., Silver R.T., Druker B.J., and Deininger M.W. (2006). Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res.* 66: 11156-11165.
223. Lacout C., Pisani D.F., Tulliez M., Gachelin F.M., Vainchenker W., and Villeval J.L. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 108: 1652-1660.
224. Wernig G., Mercher T., Okabe R., Levine R.L., Lee B.H., and Gilliland D.G. (2006). Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 107: 4274-4281.
225. Zaleskas V.M., Krause D.S., Lazarides K., Patel N., Hu Y., Li S., and Van Etten R.A. (2006). Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS. ONE.* 1: e18.
226. Balduini C.L., Bertolino G., Noris P., and Piletta G.C. (1991). Platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood in 120 patients with myeloproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 95: 82-86.
227. Avram S., Lupu A., Angelescu S., Olteanu N., and Mut-Popescu D. (2001). Abnormalities of platelet aggregation in chronic myeloproliferative disorders. *J. Cell Mol. Med.* 5: 79-87.
228. Michiels J.J., Berneman Z., Schroyens W., Finazzi G., Budde U., and van Vliet H.H. (2006). The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin. Thromb. Hemost.* 32: 589-604.

**ANEXO I: DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS
CIENTÍFICOS DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL**

Los resultados que conforman el presente Proyecto de Tesis han sido difundidos a la comunidad científica a través de los siguientes artículos y comunicaciones nacionales e internacionales:

1.- PUBLICACIONES

1. **MJ Moreno**, C Martínez, L Navarro-Núñez, F Ferrer, V Vicente, J Rivera, ML Lozano. (2006). Activación plaquetaria y función hemostática primaria en PFA-100 en pacientes con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos Ph(-): Efecto de la mutación V617F del gen JAK2. *Haematologica* (ed. esp). 91 (supl 2):72
2. **MJ Moreno**, L Navarro-Núñez, ML Lozano, B Bellosillo, V Roldán, J Rivera, N García-Barberá, F Ferrer, C Besses, V Vicente, C Martínez. (2007). Influencia de la mutación JAK2 V617F en el riesgo trombótico y hemorrágico en Síndromes Mieloproliferativos Crónicos. *Haematologica* (ed. esp). 92 (supl 2):24
3. **MJ Moreno**, C Martínez, J Rivera, F Ferrer, MH González, L Navarro-Núñez, F Ortuño, V Vicente, ML Lozano. (2007). La mutación V617F de JAK2 se asocia a mayor concentración de células CD34 en médula ósea y a recuento y activación leucocitaria superiores. *Haematologica* (ed. esp). 92 (supl 2):25
4. **MJ Moreno**, C Martínez, L Navarro-Núñez, F Ferrer, V Vicente, ML Lozano, MH González, J Rivera. (2007). Platelet function (PFA-100) and activation in patients with Chronic Philadelphia negative myeloproliferative disorders: Role of the JAK2 V617F mutation. *J Thromb Haemost.* 5 (supl 2) PM322
5. **MJ Moreno**, L Navarro-Núñez, C Martínez, J Rivera, F Ferrer, F Ortuño, V Vicente, ML Lozano. (2007). JAK2 V617F mutation is associated with the

- leukocyte count and bone marrow CD34+ cells in patients with Essential Thrombocythemia. *J Thromb Haemost.* 5 (supl 2) PM188
6. **MJ Moreno**, L Navarro-Núñez, ML Lozano, B Bellosillo, V Roldán, J Rivera, N García-Barberá, J Nieto, C Besses, V Vicente, C Martínez. (2007). Influence of JAK2 V617F and other genetic risk factors in thrombosis and hemorrhage in Philadelphia Negative Myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost.* 5 (supl 2) PM523
 7. F Ferrer, **MJ Moreno**, C Martínez, I Sánchez Serrano, N Navarro, ML Lozano, H Cano, J Corral, R Teruel, V Vicente, B Sánchez-Vega. (2008). Implicaciones clínico-biológicas de la mutación V617F de JAK2 en 5 familias con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos. *Haematologica (ed.esp).* 93 (supl 2):34
 8. **MJ Moreno**, ML Lozano, C Martínez, N García-Barberá, B Bellosillo, S Palacios, J Rivera, C Besses, V Vicente, F Ferrer. (2008). Análisis del grupo ABO como factor de riesgo trombótico y/o hemorrágico en Síndromes Mieloproliferativos Crónicos Ph negativos. *Haematologica (ed. esp).* 93 (supl 2):34
 9. **MJ Moreno**, B Sánchez-Vega, ML Lozano, F Ferrer, N Navarro, J Rivera, V Vicente, C Martínez (2008). Variaciones de la carga mutacional V617F de JAK2 con el tiempo de evolución de la enfermedad y modulación con el tratamiento citorreductor en pacientes con Trombocitemia Esencial. *Haematologica (ed. esp).* 93 (supl 2):82
 10. **MJ Moreno**, ML Lozano, V Roldán, B Bellosillo, N García-Barberá, J Rivera, L Navarro-Núñez, C Besses, V Vicente, C Martínez. (2008). JAK2 V617F,

hemostatic polymorphisms, and clinical features as risk factors for arterial thrombotic events in essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 87: 763-5

11. **MJ Moreno**, ML Lozano, F Ferrer, B Bellosillo, C Besses, V Vicente, C Martínez. (2009). ABO blood group does not increase the risk of thrombosis in Philadelphia negative myeloproliferative disorders. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 20: 390-2
12. **MJ Moreno**, C Martínez, ML Lozano, P Céspedes, JA Guerrero, V Pérez, V Vicente, J Rivera. (2009). Análisis de la hiporeactividad plaquetaria a epinefrina en la trombocitemia esencial: Comparación del test de VASP frente a la agregometría y el PFA-100. *Haematologica (ed. esp.).* 94 (supl 2):148

2.- COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

1. **MJ Moreno**, C Martinez, L Navarro-Núñez, F Ferrer, V Vicente, ML Lozano, MH González, J Rivera. Platelet function (PFA-100) and activation in patients with Chronic Philadelphia negative myeloproliferative disorders: Role of the JAK2 V617F mutation. XXIst Congress of the Internacional Society on Thrombosis and Haemostasis. Ginebra. *J Thromb Haemost* 2007;5 (supl 2):PM 322 (**Póster**)
2. **MJ Moreno**, L Navarro-Núñez, C Martinez, J Rivera, F Ferrer, F Ortuño, V Vicente, ML Lozano. JAK2 V617F mutation is associated with the leukocyte count and bone marrow CD34+ cells in patients with Essential Thrombocythemia. XXIst Congress of the Internacional Society on Thrombosis and Haemostasis. Ginebra. *J Thromb Haemost* 2007;5 (supl 2):PM188 (**Póster**)

3. **MJ Moreno**, L Navarro-Núñez, ML Lozano, B Bellosillo, V Roldán, J Rivera, N García-Barberá, J Nieto, C Besses, V Vicente, C Martínez. Influence of JAK2 V617F and other genetic risk factors in thrombosis and hemorrhage in Philadelphia Negative Myeloproliferative disorders. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Ginebra. J Thromb Haemost 2007;5 (supl 2):PM 523 (**Póster**)

3.- COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

1. **MJ Moreno**, C Martínez, L Navarro-Núñez, F Ferrer, V Vicente, J Rivera, ML Lozano. Activación plaquetaria y función hemostática primaria en PFA-100 en pacientes con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos Ph(-): Efecto de la mutación V617F del gen JAK2. XLVIII Reunión Nacional de la AEHH y XXII Congreso Nacional de la SETH. Granada. Haematologica (ed. esp.) 2006;91 (supl 2):72 (**Póster**)
2. **MJ Moreno**, L Navarro-Núñez, ML Lozano, B Bellosillo, V Roldán, J Rivera, N García-Barberá, F Ferrer, C Besses, V Vicente, C Martínez. Influencia de la mutación JAK2 V617F en el riesgo trombótico y hemorrágico en Síndromes Mieloproliferativos Crónicos. XLIX Reunión Nacional de la AEHH y XXIII Congreso Nacional de la SETH. Pamplona. Haematologica (ed. esp.) 2007;92 (supl 2):24 (**Comunicación oral**)
3. **MJ Moreno**, C Martínez, J Rivera, F Ferrer, MH González, L Navarro-Núñez, F Ortuño, V Vicente, ML Lozano. La mutación V617F de JAK2 se asocia a mayor concentración de células CD34 en médula ósea y a recuento y activación leucocitaria superiores. XLIX Reunión Nacional de la AEHH y XXIII Congreso

Nacional de la SETH. Pamplona. Haematologica (ed. esp.) 2007;92 (supl 2):25
(**Comunicación oral**)

4. F Ferrer, **MJ Moreno**, C Martínez, I Sánchez Serrano, N Navarro, ML Lozano, H Cano, J Corral, R Teruel, V Vicente, B Sánchez-Vega. Implicaciones clínico-biológicas de la mutación V617F de JAK2 en 5 familias con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos. L Reunión Nacional de la AEHH y XXIV Congreso Nacional de la SETH. Murcia. Haematologica (ed. esp.) 2008;93 (supl 2):34
(**Comunicación oral**)
5. **MJ Moreno**, ML Lozano, C Martínez, N García-Barberá, B Bellosillo, S Palacios, J Rivera, C Besses, V Vicente, F Ferrer. Análisis del grupo ABO como factor de riesgo trombótico y/o hemorrágico en Síndromes Mieloproliferativos Crónicos Ph negativos. L Reunión Nacional de la AEHH y XXIV Congreso Nacional de la SETH. Murcia. Haematologica (ed. esp.) 2008;93 (supl 2):34 (**Comunicación oral**)
6. **MJ Moreno**, B Sánchez-Vega, ML Lozano, F Ferrer, N Navarro, J Rivera, V Vicente, C Martínez. Variaciones de la carga mutacional V617F de JAK2 con el tiempo de evolución de la enfermedad y modulación con el tratamiento citorreductor en pacientes con Trombocitemia Esencial. L Reunión Nacional de la AEHH y XXIV Congreso Nacional de la SETH. Murcia. Haematologica (ed. esp.) 2008;93 (supl 2):82 (**Póster**)
7. **MJ Moreno**, C Martínez, ML Lozano, P Céspedes, JA Guerrero, V Pérez, V Vicente, J Rivera. Análisis de la hiporreactividad plaquetaria a epinefrina en la trombocitemia esencial: Comparación del test de VASP frente a la agregometría y el PFA-100. LI Reunión Nacional de la AEHH y XXV Congreso

Nacional de la SETH. Barcelona. Haematologica (ed. esp.) 2009;94 (supl 2):148 (**Póster**)

**ANEXO II: OTRAS INVESTIGACIONES NO
RELACIONADAS CON EL PROYECTO DE TESIS
DOCTORAL**

Este anexo incluye otras investigaciones no relacionadas con el Proyecto de Tesis Doctoral en las que la Doctoranda ha participado activamente durante su periodo de formación post-graduada.

1.- PUBLICACIONES

1. **MJ Moreno**, V Pérez, F de Arriba, A Jerez, MJ López, C Vallejo, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. (2005). Diagnóstico de infección fúngica en estudio necrópico. Comparación con su sospecha clínica. *Haematologica (ed. esp.)*.90 (supl 2):27
2. A Cascales, M Blanquer, **MJ Moreno**, A Jerez, I Zuazu, F de Arriba, I Heras, JM Moraleda, V Vicente. (2005). Análisis de la toxicidad postquimioterapia en pacientes mayores de 69 años diagnosticados de Linfoma no Hodgkiniano. *Haematologica (ed. esp.)*.90 (supl 2):40
3. A Cascales, F Ortuño, **MJ Moreno**, A Jerez, I Heras, JM Moraleda, V Vicente. (2005). LNH anaplásico sistémico primario ALK negativo leucemizado al diagnóstico. *Haematologica (ed. esp.)*.90 (supl 2):113
4. **MJ Moreno**, C Vallejo, A Jerez, A Cascales, F Arriba, I Heras, JM Moraleda, V Vicente. (2005). Alta prevalencia de fiebre y baja mortalidad infecciosa y global del auto-trasplante hematopoyético. *Haematologica (ed. esp.)*.90 (supl 2):88
5. **MJ Moreno**, F de Arriba, I Heras, V Pérez, MJ López, A Jerez, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. (2005). ¿Sigue aportando el estudio necrópico información clínica en pacientes fallecidos por hemopatías malignas?. *Haematologica (ed. esp.)*.90 (supl 2):171

6. V Roldan, **MJ Moreno**, F Marin, JR Gimeno, A Jerez, F Ruiz-Espejo, A García-Honrubia, V Vicente. (2006). Papel del remodelado tisular en la miocardiopatía hipertrófica, correlación entre parámetros clínicos, radiológicos y biológicos. *Haematologica (ed. esp.)*.91 (supl 2):43
7. V Roldán, A Jerez, F Marín, A Tello-Montoliu, R González Conejero, L Mainar, MT López-Garrigos, **MJ Moreno**, V Vicente. (2006). Estrategia multimarcador en la estratificación del riesgo en el síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. *Haematologica (ed. esp.)*.91 (supl 2):43
8. **MJ Moreno**, I Heras, A Jerez, MJ López, V Pérez, A Fernández, C Castilla, JM Moraleda, V Vicente. (2006). Experiencia de un solo centro con Voriconazol en 38 hemopatías malignas con infección fúngica invasiva. *Haematologica (ed. esp.)*.91 (supl 2):66
9. V Pérez, I Heras, MJ López, **MJ Moreno**, A Jerez, F de Arriba, V Vicente. (2006). Eficacia y seguridad de gentuzumab ozogamicin (Mylotarg®) en pacientes con leucemia aguda mieloblástica. Experiencia de un solo centro. *Haematologica (ed. esp.)*.91 (supl 2):72
10. **MJ Moreno**, C Castilla, F Ortuño, M González, MM Osma, V Vicente. (2006). Leucemia aguda con eritrofagocitosis en sangre periférica y médula ósea. *Haematologica (ed. esp.)*.91 (supl 1):351-3
11. F Ortuño, C Castilla, **MJ Moreno**, MM Osma, M González, V Vicente. (2006). Erythrophagocytosis in de novo-philadelphia-positive acute leukaemia of ambiguous lineage. *Haematologica*. 91:ECR43

12. B Gil, A López, **MJ Moreno**, JA Barnes, A Jerez, V Pérez, MM Osma, A Carrillo (2006). Effectiveness of non-invasive ventilation in treatment of acute respiratory failure in oncohematological patients. *Haematologica*. 91 (supl 1):140
13. **MJ Moreno**, F de Arriba, V Pérez, A Jerez, C Castilla, MJ López, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. (2006). What is the value of the necropsic study on clinical history of patients who died of malignant hematologic illnesses?. *Haematologica*. 91 (supl 1):136
14. **MJ Moreno**, F de Arriba, V Pérez, A Jerez, MJ López, C Vallejo, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. (2006). Fungal infections diagnostic in a necropsy study. Comparison with their clinical suspicion. *Haematologica*. 91 (supl 1):450
15. **MJ Moreno**, I Heras, C Martínez, E López, E Pérez, ML Amigo, C Castilla, V Vicente. (2007). Tratamiento antifúngico con caspofungina en pacientes con hemopatías malignas. Análisis de 45 casos. *Haematologica (ed.esp.)*.92 (supl 2):17
16. A Cascales, F Ferrer, A García, MJ Cano, **MJ Moreno**, S Palacios, MJ Candela, J Rivera, D Gutiérrez, V Vicente. (2007). Tiempo de transfusión como indicador de calidad en un servicio de transfusión. *Haematologica (ed. esp.)*.92 (supl 2):160
17. F Ferrer, **MJ Moreno**, V Roldán, V Vicente. (2008). Trombosis en anemias hemolíticas. *Haematologica (ed. esp.)*.93 (supl 1):398-404
18. **MJ Moreno**, F de Arriba, C Jiménez, R Oñate, MC Cabrerizo, M Canteras, V Vicente. (2008). Incidencia de las lesiones osteolíticas mandibulares en

- pacientes con mieloma múltiple en el momento del diagnóstico. *Haematologica* (ed. esp).93 (supl 2):96
19. R Oñate, C Jiménez, **MJ Moreno**, F de Arriba, MC Cabrerizo, M Canteras. (2008). Evolución de las lesiones osteolíticas mandibulares en pacientes con mieloma múltiple durante el tratamiento de inducción: estudio piloto. *Haematologica* (ed. esp.).93 (supl 2):97
20. E Colado, MV Mateos, **MJ Moreno**, F de Arriba, J de la Rubia, P Iniesta, MC Viguria, R García-Sanz, J Olazabal, JF San Miguel. (2008). VAMP/TACYDEX: Velcade® (Bortezomib), adriamycin, melphalan and prednisone alternating with thalidomide, cyclophosphamide and dexametasone as a salvage regimen in relapsed multiple myeloma patients: a Spanish myeloma group (GEM/PETHEMA) study. *Haematologica*. 93 (supl 1):262
21. **MJ Moreno**, F de Arriba, C Jiménez, R Oñate, MC Cabrerizo, M Canteras, C Castilla, V Vicente. (2009). Incidence and outcome of osteolytic lesions in the jaw in patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 94 (supl 2)
22. **MJ Moreno**, F de Arriba, JF Contreras, M Martínez, L Frutos, A Blanco, ML Amigo, V Vicente. (2009). Valor de la PET-TAC en la identificación y seguimiento de lesiones óseas en Mieloma Múltiple. Estudio piloto. *Haematologica* (ed. esp.).94 (supl 2):7
23. F de Arriba, D Salmerón, **MJ Moreno**, J Tortosa, ML Amigo, I Heras, MD Chirlaque, V Vicente. (2009). Análisis de incidencia y supervivencia en Mieloma Múltiple. Datos de un estudio epidemiológico de 20 años (1983-2003). *Haematologica* (ed. esp.).94 (supl 2):59

24. E López, V Pérez Andreu, JB Nieto, **MJ Moreno**, B Sánchez Bega, C Castilla, I Heras, V Vicente. (2009). Significado clínico de la respuesta molecular en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica e respuesta citogenética tras Imatinib o tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Haematologica (ed. esp.). 94 (supl 2):120
25. A Cascales, MJ Candela, **MJ Moreno**, ML Lozano, J Franco, J Rivera, V Vicente. (2009). Experiencia de cuatro años del centro de hemodonación de Murcia en la aplicación de las técnicas NAT para la detección de VHC, VHB y VIH. Haematologica (ed. esp.).94 (supl 2):131
26. MJ Candela, A Cascales, **MJ Moreno**, ML Lozano, J Rivera, V Vicente. (2009). Protocolo de actuación ante un donante con resultado de serología falso positivo. Experiencia de un centro de transfusión. Haematologica (ed. esp.).94 (supl 2):134

2.- COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

1. B Gil, A López, **MJ Moreno**, JA Barnes, A Jerez, V Pérez, MM Osma, A Carrillo. Effectiveness of non-invasive ventilation in treatment of acute respiratory failure in oncohematological patients. 11th Congress of the European Hematology Association. Ámsterdam. Haematologica 2006;91 (supl 1):140
(Póster)
2. **MJ Moreno**, F de Arriba, V Pérez, A Jerez, C Castilla, MJ López, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. What is the value of the necropsic study on clinical history of patients who died of malignant hematologic illnesses? 11th Congress of the European Hematology Association. Ámsterdam. Haematologica 2006;91 (supl 1):136 (Póster)

3. **MJ Moreno**, F de Arriba, V Pérez, A Jerez, MJ López, C Vallejo, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. Fungal infections diagnostic in a necropsy study. Comparison with their clinical suspicion. 11th Congress of the European Hematology Association. Amsterdam. Haematologica 2006;91 (supl 1):450 (**Póster**)
4. E Colado, MV Mateos, **MJ Moreno**, F de Arriba, J de la Rubia, P Iniesta, MC Viguria, R García-Sanz, J Olazabal, JF San Miguel. VAMP/TACYDEX: Velcade® (Bortezomib), adriamycin, melphalan and prednisone alternating with thalidomide, cyclophosphamide and dexametasone as a salvage regimen in relapsed multiple myeloma patients: a Spanish myeloma group (GEM/PETHEMA) study. 13th Congress of the European Hematology Association. Copenhagen. Haematologic; 2008;93 (supl 1):262 (**Póster**)
5. **MJ Moreno**, F de Arriba, C Jiménez, R Oñate, MC Cabrerizo, M Canteras, C Castilla, V Vicente. Incidence and outcome of osteolytic lesions in the jaw in patients with multiple myeloma. 14th Congress of the European Hematology Association. Berlin. Haematologica; 2009;94 (supl 1) (**Póster**)

3.- COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

1. **MJ Moreno**, V Pérez, F de Arriba, A Jerez, MJ López, C Vallejo, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. Diagnóstico de infección fúngica en estudio necrópsico. Comparación con su sospecha clínica. XLVII Reunión Nacional de la AEHH y XXI Congreso Nacional de la SETH. Madrid. Haematologica (ed. esp) 2005;90 (supl 2):27 (**Comunicación oral**)

2. A Cascales, M Blanquer, **MJ Moreno**, A Jerez, I Zuazu, F de Arriba, I Heras, JM Moraleda, V Vicente. Análisis de la toxicidad postquimioterapia en pacientes mayores de 69 años diagnosticados de Linfoma no Hodgkiniano. XLVII Reunión Nacional de la AEHH y XXI Congreso Nacional de la SETH. Madrid. Haematologica (ed. esp) 2005;90 (supl 2):40 (**Comunicación oral**)
3. A Cascales, F Ortuño, **MJ Moreno**, A Jerez, I Heras, JM Moraleda, V Vicente. LNH anaplásico sistémico primario ALK negativo leucemizado al diagnóstico. XLVII Reunión Nacional de la AEHH y XXI Congreso Nacional de la SETH. Madrid. Haematologica (ed. esp.) 2005;90 (supl 2):113 (**Póster**)
4. **MJ Moreno**, C Vallejo, A Jerez, A Cascales, F Arriba, I Heras, JM Moraleda, V Vicente. Alta prevalencia de fiebre y baja mortalidad infecciosa y global del auto-trasplante hematopoyético. XLVII Reunión Nacional de la AEHH y XXI Congreso Nacional de la SETH. Madrid. Haematologica (ed. esp.) 2005;90 (supl 2):88 (**Póster**)
5. **MJ Moreno**, F de Arriba, I Heras, V Pérez, MJ López, A Jerez, F Pastor, JM Moraleda, V Vicente. ¿Sigue aportando el estudio necrópsico información clínica en pacientes fallecidos por hemopatías malignas?. XLVII Reunión Nacional de la AEHH y XXI Congreso Nacional de la SETH. Madrid. Haematologica (ed. esp.) 2005;90 (supl 2):171 (**Póster**)
6. V Roldan, **MJ Moreno**, F Marin, JR Gimeno, A Jerez, F Ruiz-Espejo, A García-Honrubia, V Vicente. Papel del remodelado tisular en la miocardiopatía hipertrófica, correlación entre parámetros clínicos, radiológicos y biológicos. XLVIII Reunión Nacional de la AEHH y XXII Congreso Nacional de la SETH. Granada . Haematologica (ed. esp) 2006;91 (supl 2):43 (**Comunicación oral**)

7. V Roldán, A Jerez, F Marín, A Tello-Montoliu, R González Conejero, L Mainar, MT López-Garrigos, **MJ Moreno**, V Vicente. Estrategia multimarcador en la estratificación del riesgo en el síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. XLVIII Reunión Nacional de la AEHH y XXII Congreso Nacional de la SETH. Granada. Haematologica (ed. esp.) 2006;91(supl 2):43 (**Comunicación oral**)
8. **MJ Moreno**, I Heras, A Jerez, MJ López, V Pérez, A Fernández, C Castilla, JM Moraleda, V Vicente. Experiencia de un solo centro con Voriconazol en 38 hemopatías malignas con infección fúngica invasiva. XLVIII Reunión Nacional de la AEHH y XXII Congreso Nacional de la SETH. Granada. Haematologica (ed. esp.) 2006;91 (supl 2):66 (**Póster**)
9. V Pérez, I Heras, MJ López, **MJ Moreno**, A Jerez, F de Arriba, V Vicente. Eficacia y seguridad de gentuzumab ozogamicin (Mylotarg®) en pacientes con leucemia aguda mieloblástica. Experiencia de un solo centro. XLVIII Reunión Nacional de la AEHH y XXII Congreso Nacional de la SETH. Granada (2006). Haematologica (ed. esp.) 2006;91 (supl 2):72 (**Póster**)
10. **MJ Moreno**, I Heras, C Martínez, E López, E Pérez, ML Amigo, C Castilla, V Vicente. Tratamiento antifúngico con caspofungina en pacientes con hemopatías malignas. Análisis de 45 casos. XLIX Reunión Nacional de la AEHH y XXIII Congreso Nacional de la SETH. Pamplona. Haematologica (ed. esp.) 2007;92 (supl 2):17 (**Comunicación oral**)
11. A Cascales, F Ferrer, A García, MJ Cano, **MJ Moreno**, S Palacios, MJ Candela, J Rivera, D Gutiérrez, V Vicente. Tiempo de transfusión como indicador de calidad en un servicio de transfusión. XLIX Reunión Nacional de la

-
- AEHH y XXIII Congreso Nacional de la SETH. Pamplona. Haematologica (ed. esp.) 2007;92 (supl 2):160 (**Póster**)
12. **MJ Moreno**, F de Arriba, C Jiménez, R Oñate, MC Cabrerizo, M Canteras, V Vicente. Incidencia de las lesiones osteolíticas mandibulares en pacientes con mieloma múltiple en el momento del diagnóstico. L Reunión Nacional de la AEHH y XXIV Congreso Nacional de la SETH. Murcia. Haematologica (ed. esp.) 2008;93 (supl 2):96 (**Póster**)
13. R Oñate, C Jiménez, **MJ Moreno**, F de Arriba, MC Cabrerizo, M Canteras. Evolución de las lesiones osteolíticas mandibulares en pacientes con mieloma múltiple durante el tratamiento de inducción: estudio piloto. L Reunión Nacional de la AEHH y XXIV Congreso Nacional de la SETH. Murcia. Haematologica (ed. esp.) 2008;93 (supl 2):97 (**Póster**)
14. A Cascales, **MJ Moreno**, F Ferrer, MJ Candela, J Rivera, V Vicente. Evaluación y mejora del tiempo de recepción de muestras pretransfusionales en pacientes sometidos a una cirugía programada. XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular. 2009. Cádiz (**Póster**)
15. **MJ Moreno**, F de Arriba, JF Contreras, M Martínez, L Frutos, A Blanco, ML Amigo, V Vicente. Valor de la PET-TAC en la identificación y seguimiento de lesiones óseas en Mieloma Múltiple. Estudio piloto. LI Reunión Nacional de la AEHH y XXV Congreso Nacional de la SETH. Barcelona. Haematologica (ed. esp.) 2009;94 (supl 2):7 (**Comunicación oral**)
16. F de Arriba, D Salmerón, **MJ Moreno**, J Tortosa, ML Amigo, I Heras, MD Chirlaque, V Vicente. Análisis de incidencia y supervivencia en Mieloma

- Múltiple. Datos de un estudio epidemiológico de 20 años (1983-2003). LI Reunión Nacional de la AEHH y XXV Congreso Nacional de la SETH. Barcelona. Haematologica (ed. esp.) 2009;94 (supl 2):59 (**Póster**)
17. E López, V Pérez Andreu, JB Nieto, **MJ Moreno**, B Sánchez Bega, C Castilla, I Heras, V Vicente. Significado clínico de la respuesta molecular en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica e respuesta citogenética tras Imatinib o tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. LI Reunión Nacional de la AEHH y XXV Congreso Nacional de la SETH. Barcelona. Haematologica (ed. esp.) 2009;94 (supl 2):120 (**Póster**)
18. A Cascales, MJ Candela, **MJ Moreno**, ML Lozano, J Franco, J Rivera, V Vicente. Experiencia de cuatro años del centro de hemodonación de Murcia en la aplicación de las técnicas NAT para la detección de VHC, VHB y VIH. LI Reunión Nacional de la AEHH y XXV Congreso Nacional de la SETH. Barcelona. Haematologica (ed. esp.) 2009;94 (supl 2):131 (**Póster**)
19. MJ Candela, A Cascales, **MJ Moreno**, ML Lozano, J Rivera, V Vicente. Protocolo de actuación ante un donante con resultado de serología falso positivo. Experiencia de un centro de transfusión. LI Reunión Nacional de la AEHH y XXV Congreso Nacional de la SETH. Barcelona. Haematologica (ed. esp.) 2009;94 (supl 2):134 (**Póster**)