

***“PREVALENCIA DE LA MUTACION JAK2 V617F EN NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS PHI NEGATIVAS”***

Orellano, María J; Bastos, Luis A; Guglielmo, Hugo; Jarchum, Gustavo; Balseiro, María I.

Laboratorio de Hematología y Hemostasia, Servicio de Oncohematología,

Sanatorio Allende. Córdoba. Argentina.

Av. Hipólito Yrigoyen 384. Córdoba. C.P. 5000.

Correo electrónico: mariajoseorellano @yahoo.com.ar

Tel: 351-7651672

RESUMEN

La mutación *JAK2* V617F es un marcador molecular importante en Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) Phi negativas como Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MFP).

En el presente estudio analizamos la prevalencia de esta mutación en 58 pacientes, de los cuales 35 presentaban NMP Phi (-) (17 PV, 13 TE, 5 MFP), 15 poliglobulias y 8 otras hemopatías. La detección de la mutación se efectuó mediante PCR-ARMS (*Polymerase Chain Reaction-Amplification Refractory Mutation System*).

La misma se detectó en el 45% de la población estudiada. Observamos que el 88% de las PV, el 69% de las TE y el 40% de las MFP presentaron dicha mutación. La prevalencia de esta mutación es similar a la reportada en la literatura en los casos de PV y TE, y difiere en aquellos casos de MFP, probablemente debido al bajo número de pacientes.

Destacamos la relevancia clínica de detectar la mutación *JAK2* ya que contribuye no solo al diagnóstico sino que también representa un blanco importante para el desarrollo de nuevos tratamientos.

PALABRAS CLAVE: Neoplasias Mieloproliferativas, cromosoma Philadelphia (Phi) negativo, Policitemia Vera, Trombocitemia Esencial, Mielofibrosis Primaria, *JAK2*.

INTRODUCCION

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) como la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis Primaria (MFP) son trastornos mieloproliferativos cromosoma Philadelphia (Phi) negativos.

Estas patologías se caracterizan por la proliferación clonal desregulada de células madres hematopoyéticas, lo que conduce a la producción excesiva de una o más líneas hematopoyéticas, ocasionando hiper celularidad en la médula ósea (1,2).

La PV fue reconocida como una condición de hiper celularidad persistente, acompañada por cianosis y descrita por primera vez por H. Vaquez en 1892 (3). La MFP fue definida en la misma época (4) y la TE fue reconocida recién en 1934 (5).

El hematólogo, W. Dameshek en 1951, fue el primero en apreciar las similitudes entre dichas patologías y que estas, junto a la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), constituían un espectro de enfermedades relacionadas que compartían numerosas características clínicas y biológicas, entre las que se pueden destacar la hiper celularidad medular, el riesgo incrementado de trombosis y hemorragia, y a largo plazo, la posibilidad de transformación leucémica. También acuñó el término "trastornos mieloproliferativos" para abarcar estas patologías relacionadas (6).

En 1967, L. Wasserman organizó un grupo de expertos y fundó el "Policitemia Vera Study Group", con el objeto de establecer los primeros criterios diagnósticos. En 1974, una minuciosa investigación demuestra que los precursores eritroides de la médula ósea de pacientes con PV eran capaces de proliferar y diferenciarse "*in vitro*" en ausencia de eritropoyetina (EPO) (7).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece en el año 2001, un nuevo sistema de clasificación y diagnóstico de esta patología (8), pero no fue hasta el año 2005, que diferentes grupos describen por primera vez una mutación puntual adquirida en el gen de la quinasa Janus 2 (*JAK2*) V617F, que se asocia con los desórdenes mieloproliferativos Phi negativos (9-12).

Este polimorfismo está presente en el 95 % de los pacientes con PV, aproximadamente en un 40-60% de casos de MFP y en el 50% de casos de TE (13), como así también en algunos casos de NMP atípicas, como la Anemia Refractaria con sideroblastos en anillo asociada a trombocitosis (ARSA-T) (14) .

La mutación *JAK2* V617F se genera a partir de la sustitución de una guanina (G) por una timina (T) en el nucleótido 1849 del ADNc del exón 14 del gen *JAK2*, lo que resulta en el reemplazo de una valina (V) por una fenilalanina (F) en la posición 617, involucrando al dominio homólogo autoinhibitorio JH2 de la quinasa *JAK2* (15).

La familia JAK se compone de cuatro quinasas (*JAK1*, 2 y 3 y Tyk2) que se unen a los dominios de receptores de citoquinas citosólicas. Estas quinasas poseen dos dominios altamente homólogos en el carboxilo terminal: un dominio activo (JH1) y un dominio catalítico "inactivo", la pseudoquinasa (JH2). La sustitución *JAK2* V617F se encuentra en el dominio homólogo 2 (JH2) el cual es un regulador negativo de la actividad de la quinasa JH1 (13,16).

En cultivo de líneas celulares, esta quinasa estimula el crecimiento de las células independiente de citocinas como IL3 y EPO, y se asocia con las vías de activación constitutiva STAT, MAPK y PI3K. Cada una de estas moléculas es el punto de partida

de cascadas de señalización comprometidas en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de progenitores hematopoyéticos, habiéndose demostrado que juega un rol importante en la patogénesis de estos trastornos (9, 10, 13,15).

El diagnóstico correcto de estas entidades se realiza siguiendo un algoritmo basado en criterios clínicos, patológicos y de laboratorio. En el año 2008, la OMS modifica la clasificación y los criterios diagnósticos cambiando el nombre a NMP e incorporando en el estudio diagnóstico la mutación *JAK2 V617F* (17).

Por lo tanto la detección de esta mutación es de gran relevancia clínica ya que contribuye no solo al diagnóstico de NMP Phi negativas sino que también representa un blanco molecular para el tratamiento de dichas neoplasias.

En vista de la importancia de esta quinasa, el objetivo de este trabajo es analizar la prevalencia de la mutación *JAK2 V617F* en pacientes con sospecha diagnóstica o con diagnóstico de NMP Phi negativas que concurrieron al Laboratorio de Hematología y Hemostasia del Sanatorio Allende desde el año 2009 hasta el año 2011.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

Se realizó un estudio observacional retrospectivo, en el cual se analizaron muestras de sangre periférica de 58 pacientes: 19 mujeres y 39 hombres, con edades comprendidas entre los 12 y 93 años con sospecha diagnóstica o diagnóstico de PV, TE y MFP que concurrieron al Servicio de Hematología y Oncología Clínica del Sanatorio Allende, de la provincia de Córdoba, desde el año 2009 hasta octubre del año 2011, y que fueron Phi

negativos.

El diagnóstico de estos pacientes se realizó según criterios de la clasificación OMS 2008 (17).

Criterios Diagnóstico OMS 2008

POLICITEMIA VERA

Criterios Mayores:

I- Hemoglobina mayor a 18,5 g/dL en hombres; 16.5 g/dL en mujeres u otra evidencia de aumento de la masa eritrocitaria (Hemoglobina o hematocrito mayor al percentil 99 de acuerdo a los valores de referencia según la edad, sexo, o altitud de la residencia; o Hemoglobina > 17 g/dL en el hombre, > 15 g/dL asociado con incremento sostenido de al menos 2 g/dL por encima del valor basal del individuo y que no puede atribuirse a la corrección de deficiencia de hierro; o elevación de la masa o volumen eritrocitario >25% por encima del valor predicho).

II- Presencia de la mutación *JAK2 V617F* u otra mutación similar.

Criterios Menores:

I- Biopsia de médula ósea con hiperplasia trilineal (panmielosis) de acuerdo a la edad con importante proliferación eritroide, megacariocítica y granulocítica.

II- Nivel de eritropoyetina sérica menor al valor de referencia normal.

III- Formación de colonias eritroides endógenas *in Vitro*.

- Para el diagnóstico se requieren los 2 criterios mayores y un criterio menor o la presencia del primer criterio mayor con 2 criterios menores.

TROMBOCITEMIA ESENCIAL

I- Recuento plaquetario sostenido > 450 x 10⁹/L (a).

II- Biopsia ósea demostrando proliferación principalmente del linaje megacariocítico con

aumento del número de megacariocitos grandes y maduros. No incremento significativo o desviación a la izquierda de granulopoyesis neutrofílica o eritropoyesis.

III- No reunir los criterios de la OMS para PV (b), MFP (c), LMC *BCR-ABL1+* (d), síndrome mielodisplásico (e) u otra neoplasia mieloide.

IV- Presencia de *JAK2 V617F* u otro marcador clonal; o en ausencia de *JAK2 V617F*, no evidencia de trombocitosis reactiva (f).

a- Sostenido durante el proceso de estudio.

b- Requiere el fallo de la terapia de reemplazo con hierro para elevar el nivel de hemoglobina al rango de PV en presencia de ferritina baja. Exclusión de PV es en base de los niveles de hemoglobina y hematocrito, la medición de la masa eritrocitaria no es necesaria.

c- Ausencia de fibrosis reticulínica, fibrosis de colágeno, síndrome leucoeritroblástico en sangre periférica o médula marcadamente hiper celular acompañada de morfología megacariocítica típica de la mielofibrosis que incluye megacariocitos de pequeños a grandes, con relación núcleo/citoplasma aberrantes e hiper cromáticos, lobulados o núcleo irregularmente doblado con gránulos densos.

d- Ausencia de *BCR-ABL1+*.

e- Ausencia de diseritropoyesis y disgranulopoyesis.

f- Causas de trombocitosis reactiva incluyen: deficiencia de hierro, esplenectomía, cirugía, infección, inflamación, enfermedad del tejido conectivo, cáncer metastásico y procesos linfoproliferativos. Aunque la presencia de una condición con trombocitosis reactiva puede no excluir la posibilidad de TE si los otros criterios están presentes.

- Para el diagnóstico se requieren los 4 criterios.

MIELOFIBROSIS PRIMARIA

Criterios Mayores:

I- Proliferación megacariocítica con atipía (a), generalmente acompañada de fibrosis de reticulina o colágeno; o en ausencia de fibrosis de reticulina significativa, los cambios en

los megacariocitos deben estar acompañados de hiper celularidad en la médula ósea caracterizada por proliferación granulocítica y frecuente disminución de la eritropoyesis (fase celular prefibrótica).

II- No reunir los criterios de la OMS para PV (b), LMC *BCR-ABL1+* (c), síndrome mielodisplásico u otra neoplasia mieloide (d).

III- Presencia de *JAK2 V617F* u otro marcador clonal (ej *MPL W515K/L*); o en ausencia de los marcadores clonales mencionados descartar que la fibrosis de la médula ósea sea secundaria a infección, enfermedad autoinmune u otra condición inflamatoria crónica, tricoleucemia u otra neoplasia linfóide, enfermedad metastásica o mielopatía tóxica crónica (e).

Criterios Menores:

I- Leucoeritroblastosis (f).

II- LDH elevada (f).

III- Anemia (f).

IV- Esplenomegalia (f).

a- Megacariocitos pequeños a grandes con relación núcleo/citoplasma aberrante e hiper cromáticos, lobulados o núcleo irregularmente doblado o con gránulos densos.

b- Requiere el fallo de la terapia de reemplazo con hierro para elevar el nivel de hemoglobina al rango de PV en presencia de ferritina baja. Exclusión de PV es en base de los niveles de hemoglobina y hematocrito, la medición de la masa eritrocitaria no es necesaria.

c- Ausencia de *BCR-ABL1+*.

d- Ausencia de diseritropoyesis y disgranulopoyesis.

e- Pacientes con condiciones asociadas de mielofibrosis reactiva no son excluidos de MFP y en esos casos el diagnóstico debe ser considerado si se cumple otro criterio.

f- El nivel de anormalidad puede ser borderline o marcado.

- Para el diagnóstico se requieren los 3 criterios mayores y 2 criterios menores.

Los parámetros hematológicos fueron obtenidos mediante un contador celular Coulter T540. Se define leucocitosis un recuento de leucocitos superior a $10.0 \times 10^9/L$, y trombocitosis un recuento de plaquetas superior a $450 \times 10^9/L$. A partir de la revisión de las historias clínicas de estos pacientes, se analizó también la presencia de esplenomegalia y eventos trombóticos, con el fin de determinar si la presencia de la mutación *JAK2* homocigota se asocia a una diferente evolución clínica, como por ejemplo un mayor riesgo de trombosis en estos pacientes (18, 19).

Análisis de las mutaciones

Para el estudio de la mutación *JAK2* V617F se utilizaron muestras de ADN genómico obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica.

La determinación de la mutación V617F se realizó mediante su amplificación, utilizando una modificación de PCR- ARMS, técnica descrita por Baxter y col. (20). Se realizan dos reacciones separadas, utilizando dos pares de cebadores para amplificar específicamente las secuencias normales y mutadas.

Los cebadores de la PCR fueron:

- *forward outer* (FO), 5'-TCCTCAGAACGTTGATGGCAG-3 ';

- *reverse outer* (RO), 5'-ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT-3';

- *forward wild type specific* (Fwt), 5'-GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG-3 ';

- *reverse mutant specific* (Rmt), 5'-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAaAA-3 '.

Las amplificaciones se realizaron durante 30 ciclos con *HotStar* Taq polimerasa, a una temperatura de 60 °C, con 25 ng de DNA genómico, y las condiciones estándar de amplificación, excepto que las concentraciones finales de los cebadores FO y RO, y de los cebadores FWT y RMT fueron de 1 mM y 0,5 uM, respectivamente.

Los productos obtenidos en la reacción fueron observados en geles de agarosa al 2% y se visualizaron utilizando para la tinción-SYBR® o bromuro de etidio.

Los productos de PCR observados fueron, con los cebadores Fwt-RO una banda específica de 229pb (salvaje o normal) y con FO-Rmt una banda de 279pb (mutado).

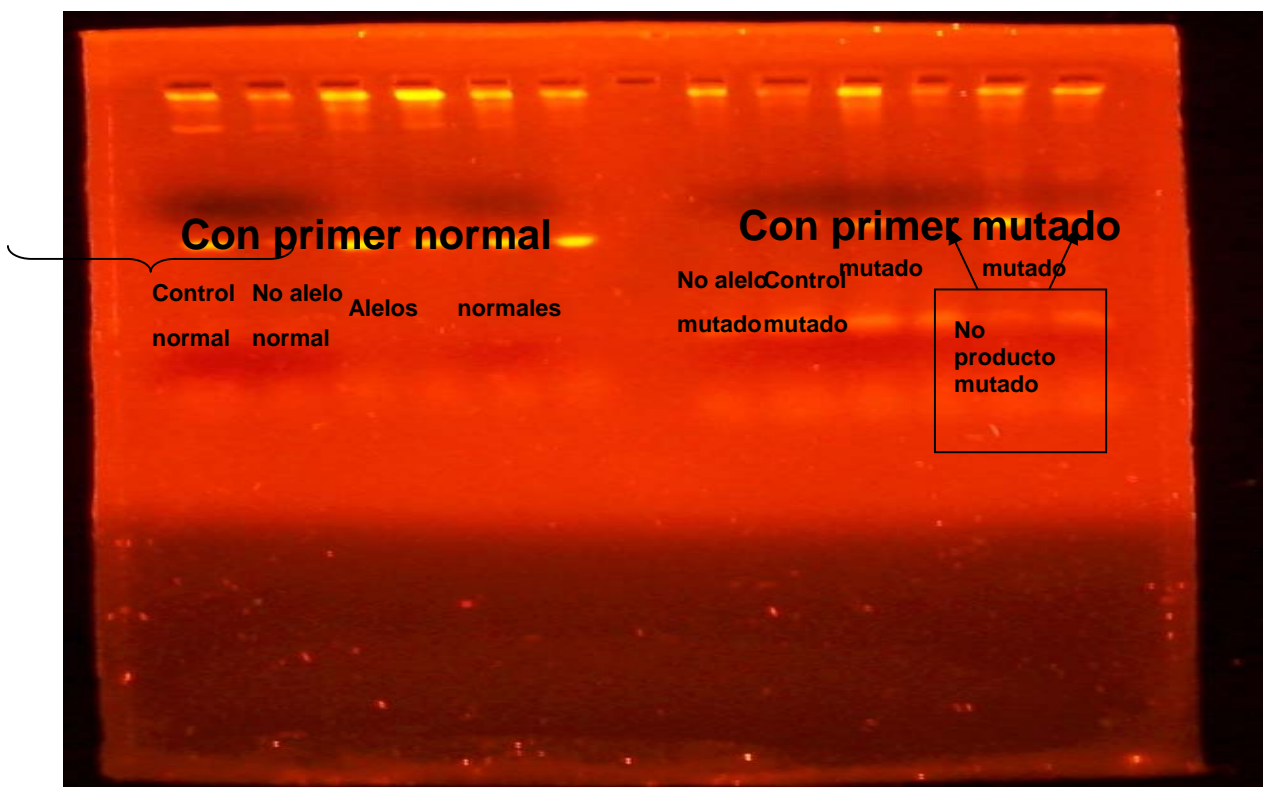


Figura 1: Análisis de Bandas de la mutación JAK2 de un paciente control y un paciente mutado.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva, para analizar las variables cualitativas se utilizó medidas de frecuencia y para las variables cuantitativas medidas de frecuencia, media y desviación estándar (DS).

RESULTADOS

En el total de pacientes estudiados (n=58), se halló una prevalencia del 45 % (26/58) de la mutación *JAK2* V617F, de tipo homocigota (Fig 2).

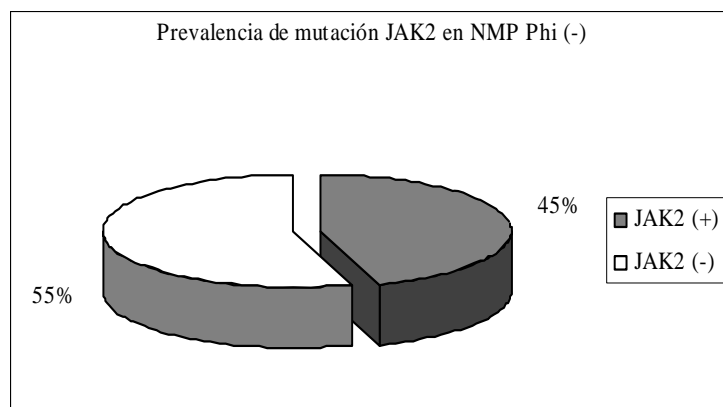


Figura 2: Prevalencia de la mutación *JAK2* V617F en NMP Phi (-).

El promedio de edad de los pacientes con la mutación fue de 55 ± 17 años y el 67 % fueron de sexo masculino.

De la población estudiada, 35 pacientes (60%) presentaban diagnóstico de NMP Phi (-), de los cuales el 49 % correspondían a PV, el 37 % a TE y el 14 % a MFP.

La mutación *JAK2* se detectó en el 88% de las PV, en el 69 % de las TE y en el 40 % de las MFP (fig. 3).

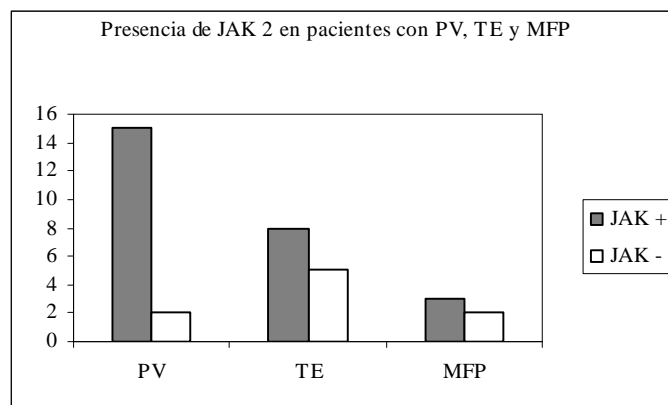


Figura 3: Presencia de la mutación JAK2 V627F en pacientes con PV, TE y MFP.

El 40% restante de los pacientes incluidos con sospecha diagnóstica de NMP Phi (-), correspondieron el 26 % a poliglobulias (15/58) y el 14 % (8/58) a otras hemopatías, en todos estos casos la mutación *JAK2* no estuvo presente.

Analizando los pacientes con PV y mutación *JAK2* positiva, un 53 % presentó trombocitosis y un 27 % leucocitosis. La presencia de esplenomegalia se halló en el 40% de los mismos. Se observaron además 2 pacientes con eventos trombóticos, de los cuales el 100% tenían leucocitosis y el 60 % trombocitosis.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Numerosos estudios indican que el 95% de los pacientes con PV presentan la mutación *JAK2* V617F (13); en nuestro análisis se encontró que el 88 % de las PV (15/17) fueron positivas para la misma, ésta pequeña diferencia podría deberse al bajo número de pacientes estudiados y/o a la existencia de otras mutaciones descritas en el exón 12 de *JAK2*, no detectada por esta metodología (21,22).

Con respecto a los pacientes con diagnóstico de TE, el 69% presentó JAK2 positivo, la literatura indica que la mutación está presente en aproximadamente el 50 al 60% de los casos, pudiendo deberse ésta discordancia al número de pacientes analizados.

Se incluyeron sólo 5 pacientes con MFP, de los cuales el 40 % presentó la mutación de JAK2, ésto diferiría un 10 % de los resultados hallados en los trabajos publicados; pero especialmente en éste grupo el número de pacientes reclutados es pequeño para inferir conclusiones.

El 26 % de los pacientes con poliglobulia que no presentaron la mutación *JAK2* V617F, no cumplieron además con los criterios diagnóstico de PV propuestos por la OMS 2008, afirmando la importancia de la detección de la mutación, en especial en éste grupo de pacientes.

Finalmente, varios estudios indican que la forma homocigota de la mutación en los pacientes con PV se asocia con enfermedad más sintomática o avanzada (2, 11,12, 23).

Esta forma puede ser adquirida durante el transcurso de la enfermedad observándose progresión, esplenomegalia refractaria, leucocitosis elevada y alteraciones citogenéticas (18, 24). En el presente trabajo se estudiaron los pacientes con PV y presencia de la mutación *JAK2* observándose que el 53 % presentó trombocitosis, el 40 % presencia de esplenomegalia y sólo un 27 % leucocitosis, presentando además este grupo más eventos trombóticos.

Si bien ningún estudio pudo demostrar asociación entre recuento de plaquetas y la presentación de eventos trombóticos, la presencia de leucocitosis si ha demostrado ser un factor de riesgo independiente de trombosis ya que ésta provocaría activación plaquetaria

y endotelial “*in vivo*”. Aquellos pacientes que presentan un recuento de leucocitos por encima de $15.0 \times 10^9/L$ tendrían un riesgo aumentado en un 70% comparado con aquellos pacientes que presentan un recuento de leucocitos superior a $10.0 \times 10^9/L$ (19, 25-27). En nuestro cohorte de pacientes aquellos que presentaron eventos trombóticos, el 100% presentaban leucocitosis (recuento de leucocitos superior a $15.0 \times 10^9/L$) y el 60% trombocitosis.

La mutación *JAK2* es el primer marcador genético directamente asociado con la fisiopatogenia de los desórdenes mieloproliferativos, demostrando su etiología clonal y facilitando el correcto diagnóstico de éstas patologías.

Por otro lado, al profundizarse el conocimiento molecular de dicha mutación se logró que un importante número de inhibidores moleculares de *JAK* estén siendo evaluados en protocolos de investigación clínica. La mayoría mostrarían un efecto beneficioso en la evolución clínica de los pacientes, sobretodo reduciendo la esplenomegalia sintomática y los síntomas constitucionales. Aun no hay evidencias de disminución en la incidencia de eventos trombóticos.

En conclusión, destacamos la relevancia clínica del estudio de la mutación *JAK2* ya que no solo permitió avanzar en las bases moleculares de estas patologías, sino que también permite simplificar el diagnóstico, evaluar pronóstico y finalmente podría representar alternativas terapéuticas para el desarrollo de nuevas drogas como los inhibidores moleculares de *JAK* recientemente desarrollados (24).

BIBLIOGRAFIA

- 1- Cazzola M, Skoda R. **Gain of function, loss of control – A molecular basis for chronic myeloproliferative disorders.** Haematologica. 2005; 90: 871-874.
- 2- Campbell P, Green A. **The Myeloproliferative Disorders.** N England J Med. 2006; 355:2452-66.
- 3- Vaquez H. **Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante.** C R Soc Biol (Paris). 1892; 44:384-8.
- 4- Heuck G. **Falle von Leukaemie mit eigenthumlichen Blut-resp. Knochenmarksbefund.** Virchow Archiv. 1879; 78:475-81.
- 5- Epstein E, Goedel A. **Haemorrhagische thrombocythamie bei vascularer schrumpfmilz.** Virchow's Archiv Abteilung. 1934; 293: 233-47.
- 6- Dameshek W. **Some speculations on the myeloproliferative syndromes.** Blood 1951; 6:372-5.
- 7- Prchal JF, Axelrad AA. **Bone-marrow responses in polycythemia vera.** N Engl J Med. 1974; 290:1382.
- 8- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. **The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasmas.** Blood. 2002; 100:2292-302.
- 9- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. **Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** Cancer Cell. 2005; 7: 387-397.
- 10- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. **A gain of function mutation in JAK2 is frequently found in patients with myeloproliferative disorders.** N Engl J Med. 2005; 352: 1779-1790.

- 11- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. **A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.** Nature. 2005; 434: 1144-1148.
- 12- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. **Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders.** Lancet. 2005; 365: 1054-1061.
- 13- Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. **New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms.** Blood. 2011; 118: 1723-1735.
- 14- Szpurka H., Tiu R., Murugesan G. , Aboudola S., Hsi E D., Theil K S., Sekeres M A., and Maciejewski J P. **Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation.** Blood. 2006;108:2173-2181.
- 15- Vladareanu AM, Muller-Tidow C, Bumbea H, and Radesi S. **Molecular markers guide diagnosis and treatment in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders (Review).** Oncology Reports. 2010; 23: 595-604.
- 16- Saharinen P, Silvennoinen O. **The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction.** J Biol Chem. 2002; 277(49):47954-47963.
- 17- Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, et al. **The 2008 revision of de World health organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute**

leukemia; rationale and important change. Blood. 2009; 114: 937-951.

18- Barosi M, Marfisi R, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Vannucchi A et al. Clinical profile of homozygous JAK2 V617F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. Blood. 2007; 110: 840-846. 18

19- Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. Blood. 2007; 109:2446-52.

20- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi T C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver R, Reiter A, Cross NCP. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders . Blood. 2005; 106: 2162-68.

21- Sans-sabrafen, Besses Raebel, Vives Corrons. Hematologia clínica. El Servier. 2001.

22- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison AJ, Warren D, Gilliland G, Lodish HF, Green AR. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. N England J Med. 2007; 356:459-68.

23- James, C. The JAK2V61F mutation in Polycythemia Vera and other Myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? . Hematology. 2008; 69-75.

24- Harrison, C. Rethinking disease definitions and therapeutic strategies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. Hematology. 2010; 129-134.

25- Finazzi,G; Barbui, T. How I treat patients with polycythemia vera. Blood. 2007;

109 5104-11.

26- Scha fer AI. **Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia.** Blood. 2006; 107:4214-22.

27- Elliott MA, Tefferi A. **Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia.** J Haematol. 2004; 128:275-290.