

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**INCLUDEREA MARKERILOR MOLECULARI IN EVALUAREA  
NEOPLAZIILOR MIELOPROLIFERATIVE CRONICE.  
VALOARE DIAGNOSTICĂ SI PROGNOSTICĂ**

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC  
PROFESOR DR. ANA-MARIA VLĂDĂREANU

DOCTORAND  
ANCA ILEA

BUCUREȘTI 2016

## INTRODUCERE

Bolile mieloproliferative cronice sunt boli rare, ce afectează persoane adulte în vârstă, au o evoluție cronică, dar se pot complica prin apariția de evenimente trombohemoragice, transformare în leucemii acute și mielofibroză. Diagnosticul acestor boli este dificil, pentru că există o heterogenitate fenotipică și o interpătrundere a entităților clinice.

Descoperirea markerilor moleculari a dus la clarificări importante ale patogeniei și ale diagnosticului și, ceea ce este foarte important, a făcut posibilă descoperirea unor noi strategii terapeutice – tratamentele țintite cu medicamente cu greutate moleculară mică.

Au fost definite ca grup din 1951 de către Dameshek, care includea atunci, alături de mieloproliferările cronice clasice (leucemia mieloidă cronică, policitemia vera, trombocitemia esențială, mielofibroza primară) și eritroleucemia.

În ultimul deceniu testarea moleculară a devenit esențială în diagnosticul acestor boli. Clasificarea OMS din 2008 a utilizat pentru prima dată markerii moleculari ca și criterii majore de diagnostic. Doi markeri moleculari au fost descriși atunci ca fiind definatorii pentru entitățile clinice incluse în NMPc: transcriptul Bcr-abl (rezultat al translocăției t(9;22)(q34;q11) – clasicul „cromozom Philadelphia”, ce pune diagnosticul de leucemie granulocitară cronică (LGC) și mutația punctiformă Jak2V617F, criteriu major în diagnosticul bolilor incluse în grupul mieloproliferărilor cronice denumite “bcr-abl negative”

Acest studiu început în 2009 și-a propus evaluarea moleculară a pacienților cu NMPc prin cercetarea impactului pe care acești doi markeri moleculari l-au avut în diagnostic și prognostic.

## PARTEA TEORETICA

În **primul capitol** am prezentat un scurt **istoric** prin care am încercat să subliniez provocarea științifică pe care a prezentat-o din cele mai vechi timpuri această patologie greu de încadrat ca entitate clinică. Din interesul arătat acestor boli au rezultat multe descoperiri ce au adus beneficii științifice importante (ca un prim exemplu: primele colorații citochimice speciale (Erllich 1877))

Este meritul lui William Dameshek (1900-1969) care a elaborat pentru prima dată conceptul de „grup de boli („dezordini”) mieloproliferative” caracterizat de proliferare mieloidă trilineală cu mecanisme patogenice și trăsături clinice asemănătoare.

Dar cele mai dramatice schimbări în definirea și în înțelegerea mecanismelor patogenice ale acestor boli și nu numai, au adus-o anii 50’-60’ prin descoperirea cromozomului Philadelphia de către Peter Nowell, un oncobiolog american. Cromozomul Philadelphia a reprezentat prima anomalie cromozomială asociată unui tip specific de leucemie.

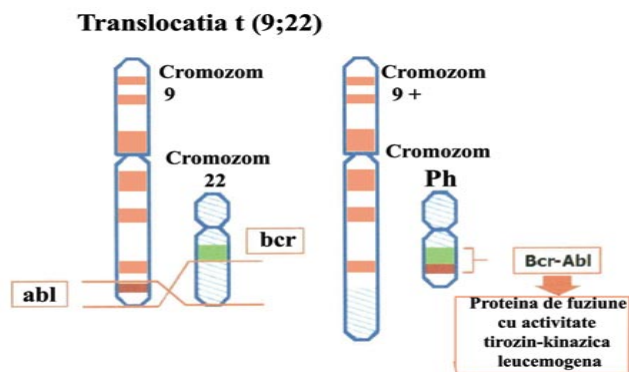


Figura 1: cromozomul Philadelphia

Structura cromozomului Philadelphia a putut fi descifrată în anii 70’, odată cu dezvoltarea tehnicilor de bandare cromozomială, ca fiind o translocăție reciprocă între cromozomii 9 și 22 t(9;22)(q34;q11) (Janet Rowley în 1973). Anii 80’-90’ au adus clarificări importante prin descoperirea produsului molecular al translocăției 9:22. Un grup de cercetători americani (Heisterkamp și colegii) împreună cu un grup olandez de cercetători (Klein și colegii) au pus în evidență ca produs al translocăției t(9;22) o genă himeră: Bcr-abl al cărei

produs de transcripție este o proteină de fuziune p210 ce are activitate tirozin kinazică constitutivă.

Aceste lucruri au fost posibile prin utilizarea unei noi tehnici de biologie moleculară ce permite amplificarea exponențială a secvențelor genetice de interes. Metoda numită Polimerase Chain Reaction(PCR) este o tehnică ce a devenit esențială în diagnosticul molecular și a fost descoperită de doi cercetători americani Mullis și Smith (premiul Nobel in 1993).

O etapă semnificativă a constituit-o demonstrarea clonalității bolilor mieloproliferative cronice.(45,46) Philip Fialkow, un savant american, a utilizat teoria polimorfismului X linkat al locusului G6PDH și a demonstrat natura clonală a LMC(1967), PV (1976), MFP(1978) și TE (1981).

2005 a reprezentat un an istoric pentru mieloproliferările cronice prin descrierea mutației Jak2V617F – această descoperire este considerată a fi realizarea a patru laboratoare independente conduse de W.Vainchenker, D.Gary Gilliland, Radek Skoda și Anthony Green.(7)

Anul 2005 este considerat inceputul unei noi etape in definirea mieloproliferărilor, iar deceniul care a urmat a fost deceniul descoperirilor de noi si noi mutații cu implicații majore in descifrarea patogeniei. (în 2006, Gary Gilliland descoperă două noi mutații: MPLW515L și MPLW515K ;în 2007, Anthony Green descoperă mutațiile Jak2 exon12 etc)

Anul 2013 a adus o nouă provocare: descoperirea unor noi mutații, care ridică la 80-85% proporția cazurilor de mieloproliferări cu marker molecular caracteristic. Descoperirea mutațiilor în gena ce codifică Calreticulina (CALR) a deschis așa numita „cutie neagră” în care erau incluse cele aproximativ 40% dintre TE și PMF, ce nu aveau un marker molecular recurent. Două grupuri de cercetatori, conduse de Anthony Green / Peter Campbell și respectiv Robert Kralovics au raportat independent în 2013 prezența mutațiilor CALR la 60-80% dintre pacienții TE și MPF Jak2V617F negativi.

In concluzie: ultimul deceniu a însemnat un progres uriaș în descifrarea acestor boli, deschizându-se multiple posibilități diagnostice și, ce este foarte important, noi modalități terapeutice.

## **Capitolul 2. Leucemogeneza**

În capitolul 2 am prezentat pe scurt câteva aspecte generale legate de mecanisme hematopoietice normale și patologice, cu evidențierea unor aspecte ce intervin în patogeneza NMPc. Căile de semnalizare intracelulară care sunt importante în diferențierea mieloidă sunt căile profund alterate în mieloproliferările cronice (JAK-STAT, RAS/MEK/ERK, PI3K-AKT, și p38 MAPK/JNK/SAPK). (9)

Demonstrarea clonalității este definitorie pentru diagnosticul de malignitate, de aceea detectarea alterărilor citogenetice sau moleculare care au inițiat proliferări clonale este esențială în diagnosticul unei neoplazii. (12)

**Capitolul 3.1 Definiția** conform clasificării OMS 2008 care este prima clasificare în care se precizează caracterul clonal și se introduce termenul de “neoplazie”

Neoplazmele mieloproliferative cronice sunt proliferări clonale ale celulei stem hematopoietice, ce implică una, două sau toate liniile celulare de precursori mieloidi, caracterizate prin dezvoltare necontrolată și acumulare de celule mieloid mature .

Neoplaziile mieloproliferative cronice (NMPc) bcr-abl negative au origine clonală și prezintă câteva trăsături clinice comune: hiperplazie medulară, hiperproducție independentă de acțiunea factorilor de creștere și acumulare de elemente sanguine mature în periferie, splenomegalie, astenie, apariția de evenimente trombotice sau hemoragice, posibilitatea transformării leucemice

### **3.2. Date epidemiologice**

Neoplazmele mieloproliferative cronice sunt boli rare.

Incidența anuală a LGC este situată la valori de 1-2/100.000 de locuitori, fără să existe diferențe mari geografice (51). În ceea ce privește rata anuală a incidenței MPN bcr-abl negative, s-au înregistrat date ce variază între 0,44-5,87 la 100.000 locuitori, cu valori mai mici în Israel și Japonia (226) Aceste variații sunt explicate de diferențele geografice și rasiale, dar și de diferențele ce există între designul studiilor, criteriile de diagnostic, metode de raportare (226).

- Referitor la etiologia NMP, un studiu ce și-a propus cercetarea sistematică a publicațiilor științifice din ultimii ani (9156 articole din Medline, Embase, Pubmed, Cochrane și Web of Science) a dus la evidențierea unor asocieri statistice importante cu unele caracteristici.(26) **Istoria familială** are cea mai importantă semnificație statistică în apariția NMP. Un important studiu epidemiologic din Suedia a arătat prezența unui risc relativ (RR) de 5-7 ori mai mare de a face NMP la rudele de gradul întâi din familiile cu NMP, RR care poate ajunge la 12 în cazul trombocitemiei esențiale (23) în familiile cu TE. Acest aspect epidemiologic, cunoscut de mai multă vreme, a putut fi dovedit științific doar în ultimii ani, prin constatarea prezenței mutației Jak2V617, cu preponderență la persoanele ce posedă haplotipul Jak2 46/1 (cunoscut și ca „GGCC”) (244).Cu privire la **asocierea cu alte cancere**, un studiu suedez a arătat un risc mai mare de a face PV în familiile în care un părinte are PV, leucemii limfatice, mieloide sau cancer de sân (28).Un alt factor cu importanță statistică a fost **originea evreiască**: Najean et Al. a semnalat prezența într-un procent de 5.8% a PV la evreii askenazi din Franța față de 3% PV în populația generală, iar Chaiter et al a semnalat că 81.2% dintre pacienții cu NMP din Nordul Israelului au origine evreiască față de 32.5% în populația generală.(24,25)
- Alte corelatii epidemiologice descrise sunt: **ocupația profesională** (lucrătorii din ferme și abatoare de pui (ca o expunere la virusurile oncogene aviare muncitorii din tipografii sau rafinării petroliere (expunere **la benzen**)).
- Condițiile medicale**: corelațiile statistice existente între NMP și boli autoimune au făcut subiectul a două mari studii populaționale: american (36) și suedez (35). Deși riscul de apariție a NMP este mic în bolile autoimune, totuși s-a constatat o corelație statistică cu boala Crohn (în ambele studii). Studiul suedez a mai găsit incidența crescută a NMP în Arterita cu celule gigante, PTI, sindrom Reiter.

### 3.3. Clasificare

Prima clasificare care utilizeaza markerii moleculari ca și criterii majore de diagnostic a fost cea din 2008 (OMS) .Aceasta clasificare a fost revizuită în 2016 (publicată în „Blood” în Mai 2016).Neoplaziile mieloproliferative cuprind urmatoarele entități (203):

- Leucemia mieloidă cronică (NMPc bcr-abl pozitivă, LMC)
- Leucemia neutrofilică cronică (LNC)
- Policitemia vera (PV)
- Trombocitemie esențială (TE)
- Mielofibroza primară (MFP) cu două subgrupuri:
  - prefibrotica
  - fibrotica
- Leucemia cronică cu eozinofile
- Neoplazii mieloproliferative cronice neclasificabile (NMPc nc)

Pentru grupul NMPc, clasificarea OMS din 2016 aduce ca o modificare față de clasificarea 2008: excluderea mastocitozei ca subgrup al NMPc și definirea acestei entități ca un grup în sine.

Entitățile NMPc bcr-abl negative cel mai frecvent întâlnite („clasice”) sunt: PV, TE și MFP.

În acest studiu am evaluat în principal Neoplaziile Mieloproliferative Bcr-abl negative și dintre acestea, pe cele clasice: PV, TE și MFP, această categorie de neoplazii mieloproliferative cronice fiind mai heterogenă și mai dificil de diagnosticat. În ceea ce privește Leucemia mieloida cronică, aspectele diagnostice sunt foarte cunoscute și, din acest considerent, în studiul de față am prezentat doar câteva aspecte speciale ale acestei entități (particularități ale diagnosticului în comparație cu NMPc bcr-abl negative și aspecte legate de detectarea nivelului de bcr-abl în cadrul monitorizării tratamentului cu antitirozin kinaze.

Tabel 1: Criterii de diagnostic NMPc –prezentare comparativă

	OMS 2001	OMS 2008	Revizuire 2016
<b>PV</b>	<p><b>Criterii majore:</b>                      A1.Hemoglobina:                      &gt;18.5g/dl (bărbați)                      &gt;16.5 g/dl (femei)                      A2.Nici o evidență de eritrocitoză Secundară .                      A3.Splenomegalie                      A4.Anormalități genetice                      A5 Trombocitoza (<math>400 \times 10^9 / l</math>)</p> <p><b>Criterii minore:</b>                      B1.Leucocitoza: (<math>12 \times 10^9 / l</math>)                      B2.BOM: panmieloza cu proliferare eritroidă și megakariocitară.</p>	<p><b>Criterii majore:</b>                      A1.Hemoglobina:                      - &gt;18.5g/dl (bărbați)                      -&gt;16.5 g/dl (femei)</p> <p>A2.Prezența mutației Jak2617F sau Jak2 pe exon 12.</p> <p><b>Criterii minore:</b>                      B1.Panmieloza trilineală pe BOM.                      B2.Nivel de eritropoietină scăzut.                      B3.Creșterea coloniilor eritroide Endogene.</p>	<p><b>Criterii majore:</b>                      A1.Hemoglobina:                      &gt;16.5 g/dl (bărbați)                      &gt;16 g/dl (femei)                      Sau hematocrit:                      &gt;49% (bărbați)                      &gt; 48% (femei)                      A2.Panmieloza trilineală (cu megakariocite mature.                      A3. prezența mutațiilor Jak2.</p> <p><b>Criterii minore:</b>                      1.Nivel redus de eritropoietină.</p>
<b>Reguli</b>	<b>A1+A2 și alt A sau A1+A2 și alte două B</b>	<b>A1+A2 si un B A1 + 2 B</b>	<b>A1-3 sau A1+2 si B</b>
<b>TE</b>	<p><b>A1.</b>                      Trombocite &gt; <math>600 \times 10^9 / l</math></p> <p><b>A2.</b>BOM.Proliferarea megakariocitelor mari, mature.</p> <p><b>A3</b> Excluderea unei alte mieloproliferări (PV, LMC,MFP) sau SMD; excluderea oricăror cauze de trombocitoză reactivă*.</p>	<p><b>A1.</b>Trombocite <math>\geq 450 \times 10^9 / l</math></p> <p><b>A2.</b>BOM Proliferarea megakariocitelor de mari dimensiuni, mature, fără modificări semnificative ale granulopoiezei (deviație la stânga) sau eritropoiezei.</p> <p><b>A3.</b>Excluderea unui alt NMP: LGC, PV, MPF, SMD, pe baza criteriilor OMS.</p> <p><b>A4.</b>Prezența mutației Jak2V617F sau alt marker clonal, sau lipsa semnelor de trombocitoză reactivă*.</p>	<p><b>A1</b> Trombocite <math>&gt; 450 \times 10^9 / l</math></p> <p><b>A2</b> BOM Proliferarea megakariocitelor de mari dimensiuni, mature, fără modificări semnificative ale granulopoiezei (deviație la stânga) sau eritropoiezei sau fibroza medulară (doar un grad 1 de fibroză reticulinică).</p> <p><b>A3</b> Excluderea unui alt : NMPLGC, PV, MPF, SMD pe baza criteriilor OMS.</p> <p><b>A4</b> Prezența mutațiilor Jak2, CALR, MPL.</p> <p><b>Criteriu minor:</b>  <b>B.</b>Prezența unui marker clonal sau excluderea trombocitozei reactive.</p>
<b>Reguli</b>	<b>A1-A3</b>	<b>A1-A4</b>	<b>A1-A4 sau A1-A3 și B</b>
	<p><b>A1.</b> BOM cu celularitate redusă sinusuri medulare dilatate . Proliferare megakariocitară și cu atipii (clustere, nuclei cu lobulație anormală, nuclei liberi); fibroza reticulinică și /sau</p>	<p><b>A1.</b>Proliferarea și atipia megakariocitelor în măduva osoasă însoțite de fibroza reticulinică și/sau colagenică (sau celularitate medulară crescută cu creșterea granulocitelor și scăderea eritropoiezei în cazul MPF prefibrotice).</p>	<p><b>A1.</b> Proliferarea și atipia megakariocitelor în măduva osoasă însoțite de fibroza reticulinică și/sau colagenică grad 2 sau 3.</p> <p><b>A2.</b> Excluderea unui alt NMP (LGC, PV, TE, SMD) pe baza criteriilor OMS.</p>



	OMS 2001	OMS 2008	Revizuire 2016
<b>MFP</b>	<p>de colagen, osteoscleroza.</p> <p>A2. Anemie moderata sau marcata Leucocitoza ușoară/ medie/ crescută. Trombocite: reduse, normal sau crescute. Hepatosplenomeglie Leucoeritroblastoza Poichilocitoza accentuată cu dacriocitoză.</p>	<p><b>A2.</b> Excluderea unui alt NMP (LGC, PV, TE, SMD) pe baza criteriilor OMS.</p> <p><b>A3.</b> Prezența mutației Jak2V617F sau alt marker clonal (MPL), sau lipsa semnelor de fibroză reactivă.</p> <p><b>Criterii minore</b> <b>B1.</b> Leucoeritroblastoza <b>B2.</b> Nivel seric crescut de LDH <b>B3.</b> Anemie <b>B4.</b> Splenomegalie palpabilă</p>	<p><b>A3.</b> Prezența mutației Jak2V617F, MPL, CALR sau alt marker clonal sau lipsa semnelor de fibroză reactivă.</p> <p><b>Criterii minore</b> <b>B1.</b> Anemia <b>B2.</b> Leucocitoza <math>&gt;11 \times 10^9/l</math> <b>B3.</b> Splenomegalie palpabilă <b>B4.</b> LDH <b>B5.</b> Leucoeritroblastoza</p>
<b>Reguli</b>	Toate	A1-A3 și două B	A1-A3 și oricare dintre B
<b>preMFP (Prefibrotică)</b>	<p><b>A1.</b> BOM cu hipercelulară cu proliferare granulocitară și megakariocitară și cu atipii (clustere, nuclei cu lobulație anormală, nuclei liberi); fibroză reticulinică minimă sau absentă.</p> <p><b>A2.</b> Anemie moderată Leucocitoza ușoară/medie Trombocite: normal sau marcate. Hepatosplenomeglie absentă/ușoară Leucoeritroblastoza absentă/ușoară Poichilocitoza ușoară/rare dacriocitocite sau deloc.</p>	<p><b>A1.</b> Proliferarea și atipia megakariocitelor în măduva osoasă însoțite de fibroza reticulinică și/sau colagenică (sau celularitate medulară crescută cu creșterea granulocitelor și scăderea eritropoiezei în cazul MPF prefibrotice).</p> <p><b>A2.</b> Excluderea unui alt NMP (LGC, PV, TE, SMD) pe baza criteriilor OMS.</p> <p><b>A3.</b> Prezența mutației Jak2V617F sau alt marker clonal (MPL), sau lipsa semnelor de fibroză reactivă</p> <p><b>Criterii minore</b> <b>B1.</b> Leucoeritroblastoza <b>B2.</b> Nivel seric crescut de LDH <b>B3.</b> Anemie <b>B4.</b> Splenomegalie palpabilă</p>	<p><b>A1.</b> Proliferarea și atipia megakariocitelor în măduva osoasă însoțite de fibroza reticulinică gdr 1 sau deloc; granulocitopoieza crescută și eritropoieza scăzută.</p> <p><b>A2.</b> Excluderea unui alt NMP(LGC, PV, TE, SMD) pe baza criteriilor OMS.</p> <p><b>A3.</b> Prezența mutației Jak2V617F, MPL, CALR sau alt marker clonal sau lipsa semnelor de fibroză reactivă.</p> <p><b>Criterii minore</b> <b>B1.</b> Anemia <b>B2.</b> Leucocitoza <math>&gt;11 \times 10^9/l</math> <b>B3.</b> Splenomegalie palpabilă <b>B4.</b> LDH</p>

#### **Capitolul 4. Patogenia.**

Este prezentată patogenia NMPc bcr-abl negative cu „modelul Jak2” ca piesa de bază în puzzle-ul complicat și încă incomplet descifrat al acesteia.

#### **Capitolul 5. Entitățile clinice NMPc “clasice” –**

##### **Tablou clinic, diagnostic, prognostic**

Fiecare dintre cele patru boli incluse în grupul NMPc (LMC, PV, TE, MPF) sunt descrise urmărindu-se următoarele subcapitole:

- definiția
- epidemiologia (cu date despre incidența și aspecte etiologice),
- patogenia (cu prezentarea particularităților fiecărei entități),
- diagnostic (date clinice :simptomatologie,semne; date de laborator)
  - am descris pe larg (în special în cazul PV și TE) aspecte legate de diagnosticul diferențial cu patologia secundară, reactivă, congenitală etc
- statusul mutațional: am prezentat stadiul actual al cunoașterii profilului molecular al fiecărei entități clinice NMPc.
- prognostic (cu prezentarea principalelor scoruri prognostice)
- strategii terapeutice

#### **Capitolul 6. Tromboza în NMPc**

Manifestările trombohemoragice sunt cele mai frecvente complicații care apar în aceste afecțiuni. În capitolul 6 am prezentat date legate de incidența, formele clinice și date actualizate despre patogenie cu punctarea rolului pe care îl are mutația Jak2V617F.

#### **Capitolul 7. Diagnosticul de laborator în hemto-oncologie**

Dezvoltarea tehnicilor de diagnostic, preluarea din cercetarea fundamentală a descoperirilor științifice extrem de numeroase din ultimii ani, a dus la diversificarea metodelor de diagnostic și la apariția de noi departamente, din ce în ce mai complexe. Practic, prin noile tehnologii a crescut sensibilitatea de detecție, astfel încât substratul patologic implicat într-o

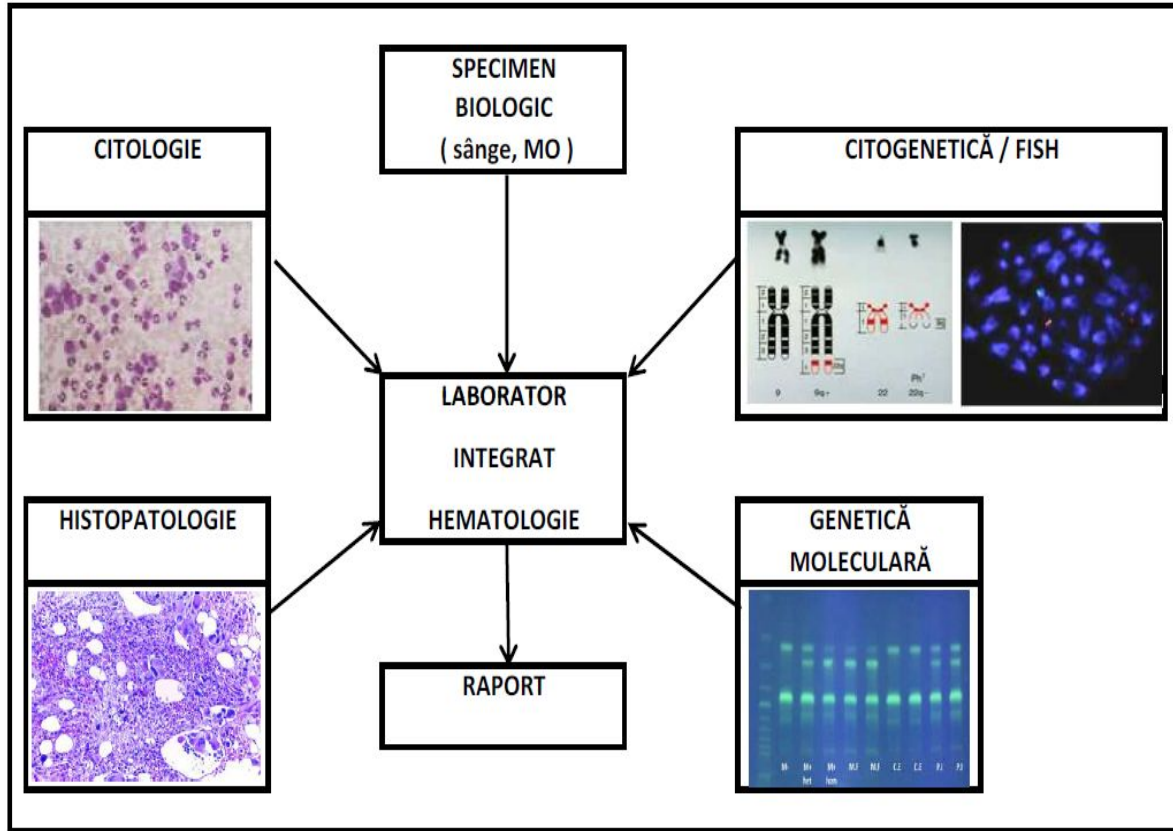
neoplazie hematologică să fie detectat cat mai precoce și mai profund. Tabelul de mai jos sumarizează testele principale utilizate acum în hematologie:

Tabel 2. Teste de laborator în hematologie:

Test	Caracteristicile tehnice	Sensibilitate	Aplicații
Morfologie	-Examinare cu microscop optic	0.1-3%	-Diagnostic morfologic pentru fenotipurile cu aspect celular distinct. -Aspectul histologic -Monitorizare: definirea remisiunii hematologice (<5% blaști în MO)
Fenotipare imuna <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flowcitometrie</li> <li>• Imunohistochimie</li> </ul>	-Flowcitometru cu min 4 culori -Tehnici de colorare imunoenzimatică	0.01-1%	-Diagnosticul imunofenotipic este etapa „cheie” în majoritatea neoplaziilor hematologice -monitorizare în boala minimă reziduală
Citogenetica <ul style="list-style-type: none"> <li>• clasică</li> <li>• FISH (fluorescence in situ hybridization)</li> </ul>	-G bandare, -necesită dotare specială  -Necesită dotare tehnică specială	1-3%  0.1-3%	-Detectează structura cromozomială Insuficient de sensibilă pentru monitorizare  -necesită un marker cunoscut al bolii -poate fi folosit pentru monitorizare
Genetica moleculară (PCR, TR-PCR, RQ-PCR)	-Necesită dotare tehnică specială	0.01-0.0001%	-necesită cunoașterea unui marker molecular specific -de elecție pentru monitorizarea tratamentului

Ar fi de dorit ca laboratorul să fie integrat, cu toate disciplinele sale, într-un tot unitar, iar rezultatele să fie interpretate în contextul clinic, astfel încât finalul să răspundă conceptului: „one patient, one diagnosis, one report”(220)

Figura nr.2: Laborator integrat



## **PARTEA SPECIALĂ**

### **CAPITOLUL 1. Obiectivele studiului**

**Scopul** acestui studiu este de a demonstra importanța utilizării unor tehnici de genetică moleculară, tehnici preluate din cercetarea fundamentală, în practica medicală curentă, pentru evaluarea diagnostică și prognostică a unor boli hematologice caracterizate printr-o mare heterogenitate clinică (neoplaziile mieloproliferative cronice)

**Obiectivele principale** ale studiului sunt:

1. Încadrarea corectă a neoplaziilor mieloproliferative cronice (NMPc);
2. Stabilirea unei relații între datele diagnosticului clinic și datele testărilor moleculare;
3. Stabilirea unei relații între markerii moleculari și parametrii clinici și paraclinici ce definesc formele grave de NMPc;
4. Stabilirea unei relații între prezența markerilor moleculari și evoluția în timp a bolii;
5. Stabilirea unei relații între prezența markerilor moleculari și răspunsul la terapie.

**Obiective secundare** ale studiului:

1. Evaluarea tehnicilor de biologie moleculară utilizate în diagnosticul neoplaziilor mieloproliferative cronice:
  - 1.1. Importanța sensibilității metodei tehnice în detecția Jak2V617F;
  - 1.2. Precizarea importanței standardizării în monitorizarea tratamentului cu antitirozinkinaze.

### **CAPITOLUL 2 Material si metoda**

#### **2.1. Durata și tipul studiului**

Studiul este de tip observațional prospectiv și a fost efectuat pe perioada 1.10.2009-31.12.2015.

#### **2.2. Pacienții studiați**

În acest studiu au fost incluși pacienții aflați în cazuistica Secției de Hematologie de la Spitalul Universitar de Urgență București, cu diagnosticul cunoscut sau cu suspiciune de mieloproliferare cronică în perioada 2009-2015.

Studiul a primit acceptul Comisiei de etică a Spitalului Universitar de Urgență București. Toti pacienții au fost informați și și-au dat acordul prin semnarea Declarației de Consimțământ.

Pacienții au semnat un consimțământ informat și la efectuarea testelor de biologie moleculară.

**Criteriile de includere** au fost:

1. Prezența unui diagnostic prezumptiv de mieloproliferare cronică (bazat pe simptomatologie clinică specifică și prezența elementelor definitorii mieoproliferărilor cronice: hiperplazie de celule sanguine mature: leucocitoză, trombocitoză, eritrocitoză).

2. Testarea moleculară la toți pacienții

Lotul inițial a fost de 231 pacienți adulți, cu vârste cuprinse între 18-93 ani, de ambele sexe: 107 femei și 124 bărbați. Pentru evaluarea specificității testelor moleculare am inclus un lot de control constituit din 30 de adulți sănătoși, voluntari, cu vârste cuprinse între 27-63 ani.

## **2.3. Metodologie**

### 2.3.1. Alcătuirea bazei de date:

Anamneza, datele clinice și paraclinice ale pacienților au fost preluate din foile de observație. Au fost urmărite următoarele variabile:

- parametrii demografici: vârsta, sex, antecedente patologice, diametrul splenic (echografic), hemoleucogramă completă (hemoglobină, hematocrit, leucocite, trombocite), aspect morfologic frotiu sanguin, examen hispatologic măduvă osoasă, LDH, eritropoietină,
- markeri de biologie moleculară: Bcr-abl, Jak2V617F, FIP1L1PDGFRalpha

### 2.3.2. Tehnici de laborator clinic

- **Hemoleucograma completă:** a fost efectuată pe analizor automat cu 22 parametri, ce are ca principiu de funcționare citometria de flux cu Laser semiconductor și focusare hidrodinamică (Sysmex, Japonia)
- **Frotiu sanguin:** colorație May Grunwald Giemsa și examinare la microscopul optic
- **LDH-**metoda spectrofotometrică (kinetica) pe analizor automat de biochimie (Cobas 6000, Roche, Elveția)

➤ **Eritropoietina** – metoda imunochimică, cu detecție prin chemiluminiscență (ECLIA)(253)

➤ **Tehnici de genetică moleculară;**

- **Izolarea acizilor nucleici** Metode: Acizii nucleici (ARN total și ADN genomic) au fost obținuți prin proceduri standard de purificare, din sânge periferic integral cu kituri IVD (Qiagen, UK). Principiul de extracție a acizilor nucleici se bazează pe legarea selectivă a acizilor nucleici de membrane de silicagel.

- **Detecția și cuantificarea Bcr-abl** Se efectuează din ARN-ul izolat. Prima etapă este de revers transcriere (RT-PCR), care constă în transformarea ARN în ADN monocatenar, cu ajutorul unei enzime Multiscribe Reverse Transcriptase (kit: High Capacity cDNA Reverse Transcriptase –Applied Biosystems), conform indicațiilor producătorului. Detecția s-a realizat prin Real time PCR, printr-o platformă StepOne Plus, Applied Biosystems, prin metodologie Taqman. S-a respectat protocolul elaborat de Gabert et al. din cadrul Programului European Against Cancer (EAC) (193). Ca genă de control s-a utilizat ABL (Abelson). Cuantificarea s-a efectuat prin RQ-PCR, prin utilizarea unor materiale de referință standardizate pentru BCR-ABL și ABL1 (ERM AD623) de la Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) - Belgia (acestea sunt plasmide de referință certificate, ce au concentrații cunoscute de BCR-ABL și ABL). Pentru exprimarea la scală internațională a rezultatelor s-a utilizat factorul de conversie al laboratorului (0,262) obținut în urma procesului de acreditare și standardizare efectuat cu Laboratorul de Referință din Mannheim-Germania.

- **Detecția mutației Jak2F617V** Pentru detecția mutației V617F se utilizează tehnica ARMS (Amplification refractory mutation system), descrisă de Jones et al. (244). La fiecare experiment se utilizează controale: pozitiv (cu alelă mutantă) și negativ (alelă salbatică - “wild type”).

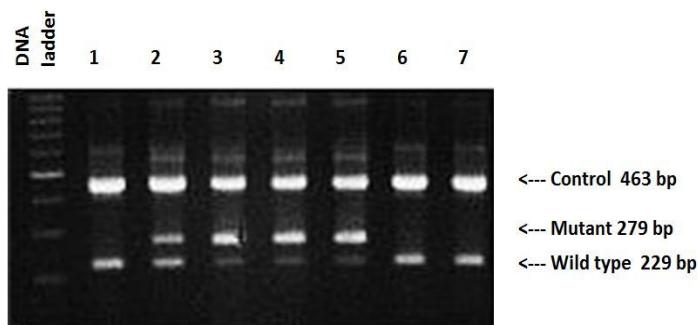


Figura 3: Detecție mutație Jak 2V617F prin ARMS-PCR Electroforeză în gel de agaroză. Pozițiile 1, 2, 3 sunt controale: negativ, pozitiv heterozigot, pozitiv homozigot; pozițiile 4 și 5 sunt duplicate pentru un pacient cu mutație Jak2V627F; 6 și 7 duplicate pentru un pacient fără mutație (numai cu alela “wild type”-sălbatică).

- Detecția FIP1L1PDGFr alpha** Pentru detecția FIP1L1PDGFr alpha s-a utilizat o tehnică numită „nested PCR” descrisă de Cools și colab. (249). În această tehnică, pentru creșterea sensibilității, se efectuează doua reacții PCR consecutiv, în care produsul primei reacții constituie substrat pentru cea de a doua reacție. Ampliconii finali sunt vizualizati prin electroforeza în gel de agaroză, colorare cu etidilium bromide și examinare în UV.

### 2.3.3. Analiza statistică

Datele demografice, datele clinice, constanțele de laborator și rezultatele testelor moleculare au constituit o baza de date ce a fost prelucrată statistic după cum urmează: stocarea și prelucrarea datelor s-a realizat cu tabele prin utilizarea Microsoft Excel iar diferențele între grupuri au fost analizate folosind: testul  $\chi^2$  (Chi pătrat) pentru variabilele discrete (categorice), testul Mann-Whitney (U) pentru două eșantioane independente (neîmperecheate). Pentru analiză a fost folosit programul SPSS versiunea 20.



### CAPITOLUL 3. REZULTATE

#### Alcătuirea loturilor de pacienți : Lotul inițial: diagnostice prezumtive de NMPc

**Date demografice** Pacienții încadrați în grupul de studiu au fost în număr de **231**, cu suspiciuni de mieloproliferari cronice, internați la SUUB în perioada 01.01.2009-31.12.2015. Vârsta medie a pacienților incluși: 53,7 ani, cu minima de 18 ani și maxima de 93 de ani. În acest grup au fost 107 femei (46,3% ) și 124 bărbați (53,7%).

**Distributia dupa sex si grupuri de varsta a pacientilor cu suspiciuni de NMPc**

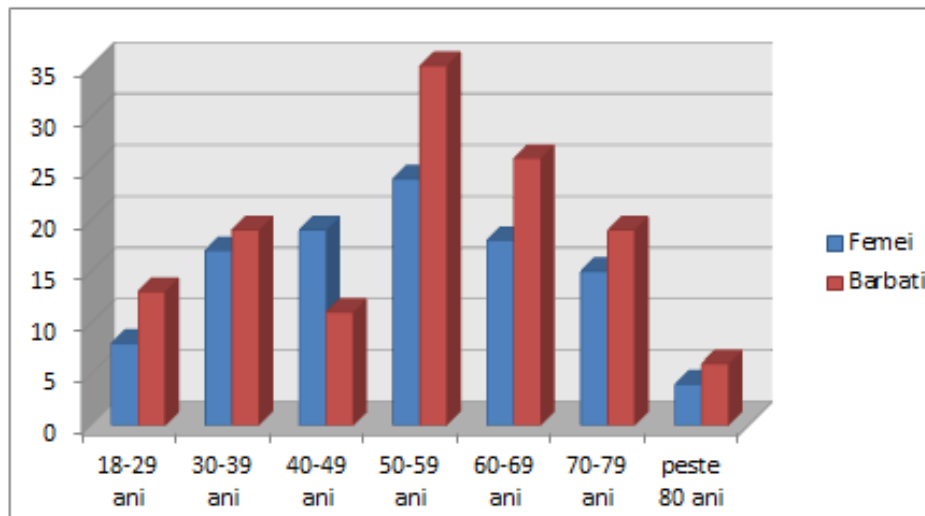


Figura nr. 4: Distribuția după sex și vârstă a pacienților cu suspiciuni de NMPc

După cum se poate observa din tabelul de mai sus, această patologie poate afecta pacienți adulți de orice vârstă, dar cu precădere pe cei de peste 50 ani și cu o moderată preponderență pentru sexul masculin.

Lotul final: Pacienți cu diagnostic confirmat de NMPc Diagnosticul NMPc a fost confirmat la **144 pacienți** (62,4%), după cum urmează: 35 pacienți cu LGC (24,3% din totalul NMPc confirmate); 19 pacienți cu PV (13,2%); 39 pacienți cu TE (27%); 23 pacienți cu MFP (16%); 20 pacienți NMP neclasificabil (14%) și 8 pacienți cu SMD (5,5%). Mai mult de o treime

dintre pacienții cu suspiciuni de mieloproliferare clonală nu au fost confirmați. Nici un pacient suspicionat de sindrom hipereozinofilic primar nu a avut FIP1L1 PDGFRAalpha pozitiv.

Lotul de pacienți care a fost evaluat in acest studiu a cuprins entitățile clasice ale NMPc:

LMC (35 pacienți)PV (19 pacienți)TE (39 pacienți)MFP (23 pacienți)NMP neclasificat (20 pacienți) Nu au fost incluse cazurile cu hipereozinofilie (nr:11) din cauza datelor insuficiente pentru un diagnostic precis, care să corespundă cerințelor noilor ghiduri de diagnostic.

De asemenea, nu au fost incluse cele 8 cazuri confirmate SMD care, deși prezintă trăsături biologice și clinice asemănătoare, nu fac parte din grupul NMPc, fiind o categorie aparte conform ultimei clasificări OMS (2008).

Tabel 3: Încadrarea pacienților pe entități clinice de NMPc înainte și după testarea moleculara

	Diagnostic final							
Diagnostic prezumtiv	NMPu	LGC	PV	TE	MMM	SMD	HES	Total
NMP neprecizat	18	1	8	14	2	3	-	46
LGC	-	<b>31</b>	-	1	-	1	-	33
PV	-	-	<b>11</b>	2	-	-	-	13
TE	1	3	-	<b>22</b>	4	-	-	30
MMM	1	-	-	-	<b>17</b>	-	-	18
SMD	-	-	-	-	-	<b>4</b>	-	<b>4</b>
HES	-	-	-	-	-	-	-	<b>11</b>
Total	<b>20</b>	<b>35</b>	<b>19</b>	<b>39</b>	<b>23</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	

### 3.1.2.1. Caracteristicile demografice ale lotului final :

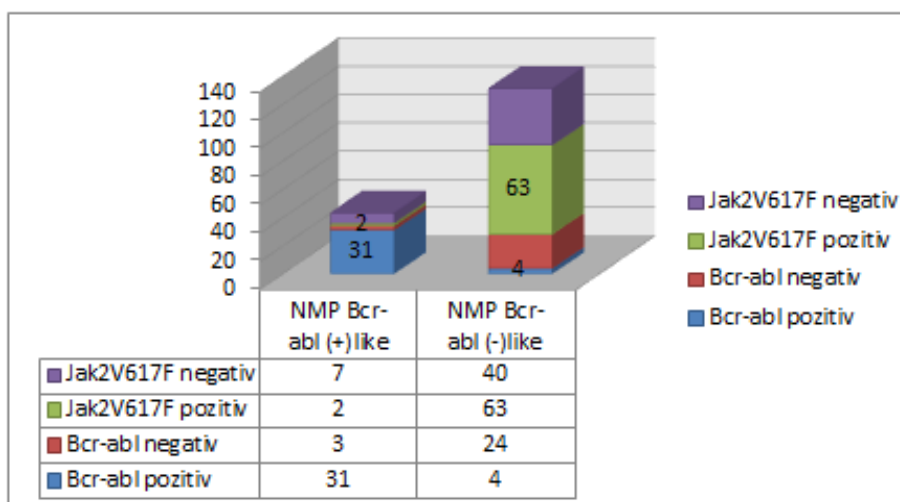
Tabel 4: Distribuția după vârstă și sex a pacienților cu NMPc vs nonNMPc vs controale:

	Subiecți sănătoși N=30	Total pacienți evaluați N=231	LGC N=35 (15,2%)	PE N=19 (8,2%)	TE N=39 (16,9%)	MMM N=23 (10%)	NMPnc N=20 (8,7%)	SMD N=8 (3,5%)	Fără confirmarea unei MP N=87 (36,4%)
<b>Vârsta Medie ± DS (min-max)</b>	41,7 ± 9,3 (27 – 63)	53,7 ± 16,6 (16 – 93)	48,7 ± 15,7 (19 – 76)	58 ± 13,3 (30 – 83)	53,2 ± 17,7 (19 – 82)	62,4 ± 2,5 (43 – 93)	62,4 ± 15,5 (22 – 80)	57,6 ± 14,7 (33 – 81)	50,8 ± 16,9 (16 – 83)
<b>Femei Nr.(%)</b>	16 (53,3%)	107 (46,3%)	15 (42,9%)	9 (47,4%)	17 (43,6%)	12 (52,2%)	10 (50,0%)	3 (37,5%)	39 (44,8%)

**Alcătuirea celor două subgrupuri NMPc** Grupul NMPc se împarte în două subgrupuri ce se definesc în primul rând după prezența sau absența markerului molecular definitoriu al LGC: NMPc – Bcr-abl pozitiv (35 pacienți) și NMPc-abl negative (101 pacienți).

Figura:5

**Distributia testelor Bcr-abl si Jak2V617F pe cele doua grupuri de NMPc**



**Evaluarea diagnostică și prognostică a subgrupurilor de NMPc Rezultatele si analizele statistice:**sunt larg dezvoltate în lucrare; în acest rezumat voi puncta câteva aspecte particulare constatate.

- **Aspecte particulare ale diagnosticului în LGC**

Au existat situații în care pacienții au fost încadrați în alte entități de mieloproliferări și doar punerea în evidența a markerului molecular a putut preciza diagnosticul.

Și reversul, diagnosticul de LGC a fost infirmat în două cazuri după ce s-a constatat absența markerului diagnostic bcr-abl.

- Diagnosticul prezumtiv de LGC a fost pus la 33 de pacienți; dintre aceștia: 31 au avut confirmare moleculară (94%); două cazuri au fost diagnosticate cu alte NMPc (după efectuarea Jak2V617 și a examenului anatomopatologic – biopsie măduvă osoasă): un caz TE (Jak2V617F pozitiv) și unul: SMD
- 4 pacienți care inițial erau suspecionați ca NMPc non LGC, în urma obținerii unui rezultat pozitiv la Bcr-abl, au fost diagnosticați ca LGC: 3 pacienți TE și un caz de MMM cu Jak2V617F și Bcr-Abl pozitiv(ambii markeri pozitivi)

## 2. Evaluarea diagnostică și prognostică a pacienților NMPc Bcr-abl negativ

În urma testării moleculare și a examenului măduvei osoase (biopsie osoasă), cei 101 pacienți cu NMPc Bcr-abl negativ au fost încadrați în următoarele entități clinice de NMPc Bcr-abl negative:

- **19 Policitemia vera (18.8%)**
- **39 Trombocitemie esențială (38.6%)**
- **23 Mielofibroza primara(22.7%)**
- **20 Neoplazii mieloproliferative cronice neclasificate (19.8%)**

### ➤ **Parametrii demografici si biologici: date centralizate pentru toate NMPc**

Tabel 5: Caracteristicile demografice și principalele constante biologice la pacienții cu NMPc

	PV N=19	TE N=39	MFP N=23	NMPnc N=20
<b>Vârsta</b> Medie ± DS (min-max)	58 ± 13,3 (30 – 83)	53,2 ± 17,7 (19 – 82)	62,4 ± 12,5 (43 – 93)	62,4 ± 15,5 (22 – 80)
<b>Femei</b> Nr. (%)	9 (47,4%)	17 (43,6%)	12 (52,2%)	10 (50,0%)
<b>Leucocite</b> (Nr./mmc) Medie ± DS (min-max)	14.266 ± 7.874 (6.500- 33.700)	10.483 ± 2.558 (5.000-16.000)	13.361 ± 13.293 (3.800-66.500)	20.519 ± 22.268 (5.200-96.600)
<b>Trombocite</b> (Nr./mmc) Medie ± DS (min-max)	462.052 ± 242.678 (150.000- 1.000.000)	822.579 ± 195.153 (500.000- 1.500.000)	470.404 ± 357.380 (9.300- 1.380.000)	699.950 ± 341.955 (97.000-1.500.000)
<b>Hemoglobina</b> (g/dL) Medie ± DS (min-max)	17,6 ± 2,1 (13,3-20,2)	13,8 ± 2,7 (8,3-19,9)	11,5 ± 2,9 (7,1-16,8)	13,6 ± 3,1 (8,5-18,7)
<b>LDH</b> (U/L) Medie ± DS (min-max)	362 ± 167 (170-736)	241 ± 48 (124-337)	543 ± 278 (231-1.372)	359 ± 128 (197-606)
<b>Splenomegalie</b> (diametru, mm) Medie ± DS (min-max)	135 ± 222 (102-195)	128 ± 13 (108-160)	178 ± 42 (120-280)	133 ± 18 (109-180)

Fiecare subgrup a fost analizat prin urmărirea :  
-datelor demografice

-prezența mutației Jak2V617F în diagnosticul entității și corelațiile cu datele clinice și constantele biologice principale

- caracterizarea din punct de vedere a încărcăturii alelice (homozigot vs heterozigot)

a entităților NMPc și de asemenea stabilirea unor corelații cu date clinice și de laborator

-compararea pe grupe de vârstă ( sub 45 ani și peste 60 ani ) ; pentru subgrupurile rezultate fiind comparați toți parametrii clinici, de laborator, status mutațional și incidența complicațiilor.

Rezultatele acestor analize sunt amplu dezvoltate în lucrare în capitolele 3(rezultate) și 4 (discuții) ale părții speciale. În rezumat voi prezenta principalele constatări la final.

### 3.Un alt subcapitol a fost constatarea **incidenței complicațiilor trombotice** pe entitățile clinice NMPc

Din totalul de 101 cazuri de NMPc, 25 de pacienți (24,7%) au prezentat complicații trombotice majore. Distribuția pe entități clinice a fost următoarea: 6 pacienți PV(24%);11 pacienți TE(44%); 4 pacienți MMM(16%) și 4 pacienți NMPu (16%).Mutația Jak2V617F a fost prezentă la 19 cazuri din cele 25 (76%). Cazurile heterozigote au fost în număr de 15 și 4 au fost homozigote.

**4.Supraviețuirea în NMPc** În ceea ce privește supraviețuirea, s-au putut urmări pentru o perioadă de minim **5 ani**, 59 de pacienți (cu NMPc bcr-abl pozitiv (LGC) și NMPc bcr-abl negativ) diagnosticați în anii 2009, 2010, 2011. S-au înregistrat 5 (8,4%) decese, toate fiind consecința transformării blastice. Supraviețuirea mai mare de 5 ani nu a avut asocieri semnificative statistic cu prezența JAK pozitiv ( $p=0,731$ ) sau cu evenimentele trombotice ( $p=0,930$ ).

**5.** Pentru a extrage cât mai multe informații **rolul Jak2V617F în Neoplasmelor Mieloproliferative Cronice** – am efectuat o analiză centralizată prin constituirea a două grupuri de NMPc caracterizate doar de prezența sau absența Jak 2V617F, indiferent de entitatea clinică. În urma testărilor moleculare s-a observat prezența mutației Jak2V617F la 64 dintre cei 101

pacienți diagnosticați cu NMPc bcr-abl negative (63.3%). Deci, în mai mult de jumătate dintre cazuri, punerea în evidență a acestei mutații a demonstrat caracterul neoplazic (clonal) al bolilor respective, având astfel un rol esențial în diagnosticul NMPc. Majoritatea cazurilor Jak2V617F pozitive a fost reprezentată de entitățile incluse în grupul „clasic” al NMPc, adică: PV (Jak 2 pozitiv la (89,5% ), TE (56,4%), MMM (47,8%), precum și, la un număr surprinzător de mare de NMPc neclasificate (70%). De asemenea, Jak2V617F a fost prezent și la un caz de SMD (din grupul de 8 pacienți cu diagnostic final de SMD, deși inițial diagnosticul prezumtiv fusese de NMPc).

### Date demografice, parametri biologici și complicații trombotice

Tabel 6:Comparație între caracteristicile pacienților JAK2 negativ *versus* JAK2 pozitiv

	Toți pacienții cu mieloproliferare cronică testați (N=101)		
	JAK2 pozitiv N = 64 (63,3%)	JAK2 negativ N = 37 (36.6%)	Semnificație statistica
<b>Vârsta</b> Medie ± DS	57,8 ± 15,3	57,8 ± 17	p=0,958 (NS)
<b>Femei</b> Nr. (%)	27 (42,2%)	18 (48.6%)	p=0,395 (NS)
<b>Leucocite (Nr./mmc)</b> Medie ± DS	13.727 ± 8.842	11.821 ± 11.232	p=0,005
<b>Trombocite (Nr./mmc)</b> Medie ± DS	622.239 ± 295.969	692.273 ± 295.969	p=0,467 (NS)
<b>Hemoglobina (g/dL)</b> Medie ± DS	15,1 ± 3,2	12,2 ± 2,3	p=0,001
<b>LDH (U/L)</b> Medie ± DS	357 ± 199	395 ± 110	p=0,327 (NS)
<b>Evenimente trombotice</b> Nr. cazuri (%)	19 (29,7%)	6 (16.2%)	p=0,230 (NS)

Corelații semnificative statistic obținut între statusul homozigot cu valoarea crescută a hemoglobinei și leucocitoza (p=0.005 și p=0.001).În ceea ce privește statusul mutațional cel

homozigot se asociază cu valori mari de LDH mare iar cel heterozigot cu valori mari de trombocite.

Tabel 7 . Comparație între caracteristicile pacienților JAK2 pozitiv funcție de încărcătura alelică

	Toți pacienții JAK2 pozitiv (N=65)		
	Homozigot N = 19 (29,2%)	Heterozigot N = 46 (70,8%)	Semnificație statistică
<b>Vârsta</b> Medie ± DS	62,0 ± 14,9	56,2 ± 15,1	p=0,157 (NS)
<b>Femei</b> Nr. (%)	8 (42,1%)	20 (43,5%)	p=0,919 (NS)
<b>Leucocite (Nr./mmc)</b> Medie ± DS	15.751 ± 8.104	12.812 ± 8.993	p=0,126 (NS)
<b>Trombocite (Nr./mmc)</b> Medie ± DS	445.700 ± 309.909	694.847 ± 256.271	p=0,003
<b>Hemoglobina (g/dL)</b> Medie ± DS	15,7 ± 3,9	14,7 ± 2,8	p=0,078 (NS)
<b>LDH (U/L)</b> Medie ± DS	467 ± 275	307 ± 133	p=0,005
<b>Splenomegalie (mm diametru)</b> Medie ± DS	151 ± 38	136 ± 28	p=0,188 (NS)
<b>Evenimente trombotice</b> Nr. cazuri (%)	4 (21%)	15 (32,6%)	p=0,550 (NS)

➤ **Discutii referitoare la locul Jak2V617F in cadrul NMPC:**

După descoperirea mutației Jak2V617F în 2005 și introducerea detecției sale în practica medicală, s-a constatat că acest test, ce se realizează din sange periferic și care este relativ simplu tehnic, a devenit foarte important în diagnosticul NMPC, având un rol „pivotant” (207).

Prezența mutației Jak2V617F reprezintă un criteriu major, prin care se confirmă caracterul clonal al NMPC. Un Jak2pozitiv înseamnă boală clonală, iar Jak2negativ poate însemna proliferare reactivă și necesită testări suplimentare.

Precizez că rezultatul negativ a fost obținut la toate loturile de control, atât în acest studiu, cât și în alte studii din literatură (214,215,256).



**Terminologia de hetero/homozigot** este improprie în cazul detectării mutației Jak2V617F din ADNul extras din granulocitele din sangele periferic.(207). Practic, încărcăturile mai mari de 50% sunt considerate homozigote, iar cele sub 50% sunt heterozigote. În realitate, o subclonă homozigotă prezentă dar la un nivel redus într-o populație Jak2 majoritar „sălbatică” poate da un rezultat heterozigot la o detectare precum cea descrisă mai sus.

Adevăratul status mutațional poate fi pus în evidență prin coloniile eritroide endogene dezvoltate dintr-o singură celulă. In cadrul ELN se încearcă elaborarea unei metodologii standardizate.

Cu toate aceste limitări, există studii clinice care au raportat modificarea fenotipului cu gradul de expresie a mutației Jak2V718F în cadrul entităților clasice TE, PV,MMM cu cel mai mare nivel în cazurile de fibroză. (256).

Definirea unei „Jakopatii” (termenul ii apartine lui Kiladjan, 207) ca o entitate omogenă de mieloproliferări caracterizate doar de prezenta Jak2V617F, este considerată a fi totuși limitantă (207)(126). S-au raportat câteva trăsături clinice comune tuturor cazurilor de NMPc Jak2pozitive: leucocitoză, splenomegalie și evoluție spre fibroză (88,98,100,250) și o discutabilă predispoziție la tromboze (98).

Cercetările recente au demonstrat existența unei patogenii moleculare mai complexe a NMPc, cu participarea mai multor markeri, ceea ce conferea heterogenitate în exprimarea clinică și prognostică. Sunt necesare studii prospective extinse și noi metodologii de diagnostic (next generation sequencing), care să clarifice clasificările și să constituie baza moleculară pentru noi strategii terapeutice.

## **ASPECTE TEHNICE DE GENETICA MOLECULARA**

### **1.Particularități ale tehnicii de detectie a mutației Jak2V617F**Determinarea limitei de detectie a mutației Jak2V617F

Prin amplificarea unei serii de diluții succesive de ADN mutant homozigot (100% alela mutantă) în ADN „sălbatic” (100% alelă sălbatică) am obținut o scală cu ajutorul căreia se poate aprecia semicantativ încărcătura alelică. În acest mod se poate face diferențierea genotipurilor heterozigot de homozigot : homozigot este statusul prezent la un procent de peste 50% alelă mutantă iar heterozigot la procente de sub 50%.

De asemenea, se poate stabili limita de detecție prin constatarea concentrației minime la care este prezentă banda corespunzătoare controlului mutant (respectiv: 279 perechi de baze). Această metodă este capabilă să detecteze mutația Jak2V617F la diluții de aproximativ 1-2%.

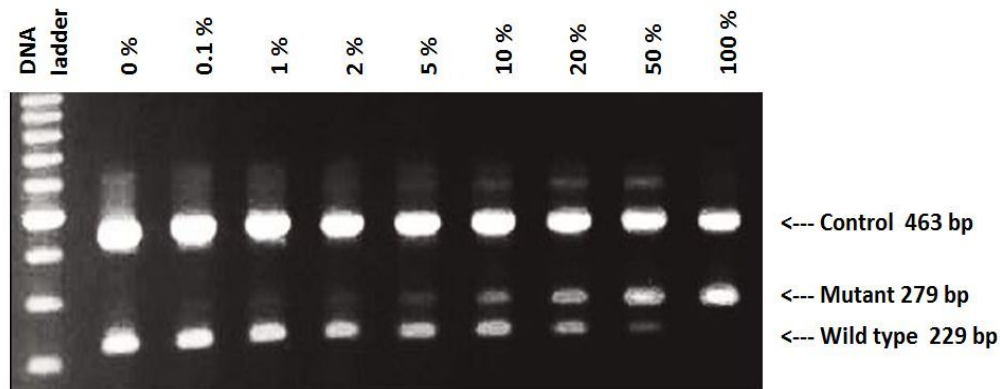


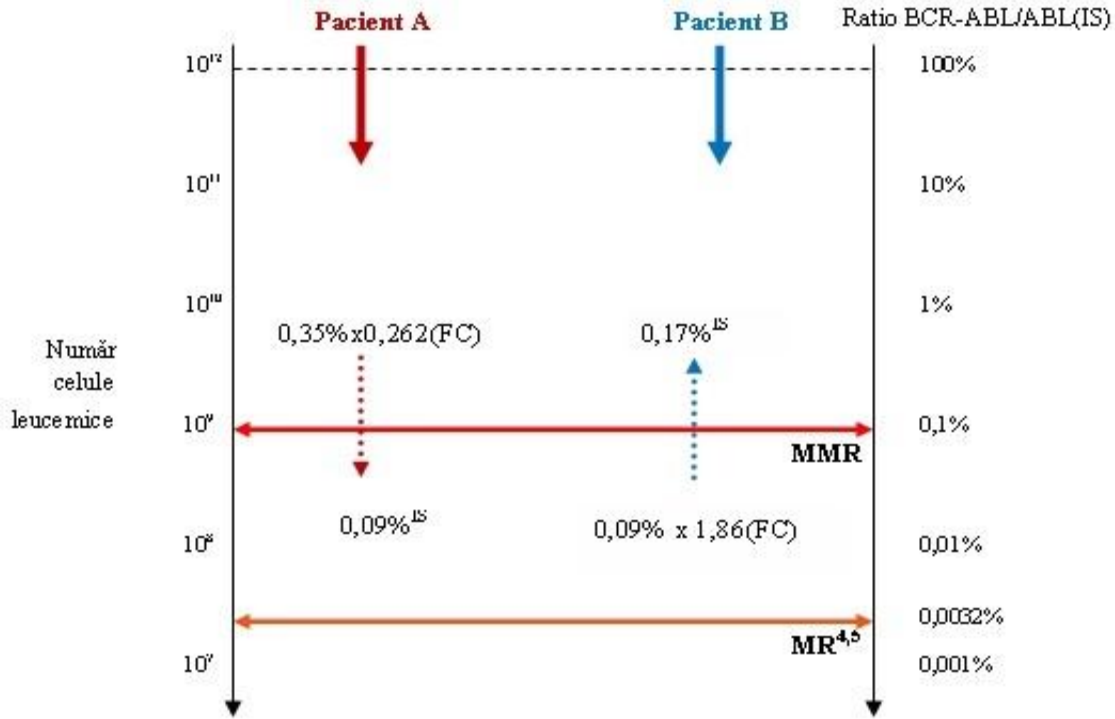
Figura 6: Detecție semicantitativă a mutației Jak2V617F: electroforeza în gel de agaroză cu ampliconii corespunzători diluțiilor de ADN mutant în ADN nonmutant.

## 2. Monitorizarea moleculară a tratamentului cu antitirozinkinaze

În managementul LGC este esențială monitorizarea tratamentului cu antitirozinkinaze. European Leukemia Net recomandă efectuarea trimestrială a cuantificării bcr-abl, iar tratamentul este ghidat de răspunsurile moleculare obținute. De asemenea, reglementările europene impun standardizarea metodelor de monitorizare, astfel încât să existe un consens în definirea răspunsurilor la tratament (51). Standardizarea cuantificării bcr-abl se realizează prin efortul comun al laboratorului care își standardizează metoda și un laborator de referință care evaluează și compară rezultatele probelor lucrate în paralel în cele două laboratoare.

Finalitatea acestui proces este obținerea unui factor de conversie a cărui utilizare în calcul face posibilă obținerea unor rezultate cât mai precise, comparabile cu cele ale laboratoarelor de referință.

Figura 7: Ilustrarea importanței factorului de conversie în încadrarea corectă a răspunsului molecular:

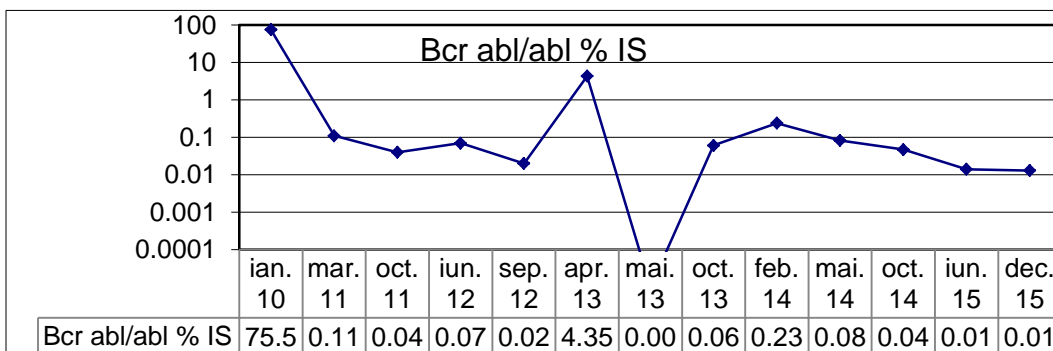


(dupa Baccarani, 2013, Blood nr122)

In lipsa unui factor de conversie răspunsul molecular poate fi încadrat greșit de exemplu un răspuns molecular major care este efectuat într-un laborator ce are un factor de conversie supraunitar poate fi în realitate un răspuns parțial (ce poate să nu fie optim).

Pacienții din acest studiu au fost monitorizați conform recomandărilor ELN. Fiecare pacient monitorizat prezintă o diagramă în care este reprezentată evoluția nivelului bcr-abl (exprimat în ratio Bcr-abl/AbI % IS) în timp. Variațiile transcriptului pot fi astfel urmărite și acțiunile terapeutice consecutive pot fi foarte prompte.

Figura 8: Model de evoluție a Bcr abl/abl% IS



## CONCLUZII FINALE:

1. Analiza **parametrilor demografici** pe grupurile si subgrupurile studiate au aratat urmatoarele particularitati:

- Vârsta medie de debut a NMPc in lotul studiat este mai mică decât cea dată în literatură. Ghidul ESMO raportează vârstele de debut corespunzătoare PV, TE, MFP ca fiind cuprinse în intervalele: 65-74, 64-73, 69-76. În acest studiu vârstele medii la debut sunt: 58 +/- 13,3; 53,2 +/- 17,7; și corespunzător 62,4 +/- 12,5.
- Intre subgrupurile studiate: pacienții cu boală clonală sunt mai în vârstă decât cei cu patologie reactivă, nonclonală (vârste medii: 57 ani vs 50,8)
- În grupul studiat pacienții cu MFP sunt mai în vârstă (62 ani) decât cei cu PV (58 ani) și TE (53 ani).
- Distribuția după sex arată o ușoară preponderență masculină la NMPc în general, dar pentru cazurile de TE predomina sexul feminin la grupa de vârstă tânără (40-45 ani), similar cu datele din literatura.

2. **Confirmarea** diagnosticului de NMPc a fost realizată la 144 de pacienți adică la 62% dintre pacienții cu suspiciune de NMPc. Prin detectarea markerilor moleculari s-a putut diferenția boala clonală de patologia secundară, reactivă prezenta la o treime dintre pacienții din lotul inițial (de 231 cazuri). S-au constatat câteva aspecte particulare:

- Încadrarea corectă a pacienților în subgrupurile de NMPc după efectuarea testelor moleculare a fost diferită față de încadrarea inițială. Deși nu au fost numeroase, aceste situații sunt importante datorită implicațiilor pe care le au în tratament. Cele mai importante “dispute” diagnostice au fost: cazurile incorrect considerate ca TE și care erau LGC (3 pacienți) și cazurile încadrate la LGC (2 pacienți) care s-au dovedit a fi TE (Jak2V617F pozitiv) și un caz de SMD.
- O situație deosebită o constituie detecția concomitentă la un caz de MFP a ambilor markeri (Bcr-abl și Jak2V617F pozitive). Este un caz rar dar nu imposibil. Din experiența laboratorului extinsă pe toți pacienții testați pentru ambele teste (614 pacienți) în perioada 2009-2015 s-au identificat 7 pacienți cu dublă pozitivitate ceea ce reprezintă 1,14% din totalul cazurilor testate.

- Mutația Jak2V617F a fost detectată și la un caz de SMD deci nu este specifică doar entităților NMPc
- În subgrupul suspiciunilor de LGC diagnosticul molecular a confirmat prezența bolii la 94% dintre cazuri.
- În subgrupul cu suspiciuni de NMPc Bcr-abl negative like (101 pacienți) mutația Jak2V617F a fost identificată la 64 de pacienți (63.3%) .Astfel la mai mult de jumătate dintre pacienți s-a putut demonstra clonalitatea prin efectuarea acestui test.

3. **Analiza statistica si aspectele descriptive particulare pe entitățile clinice NMPcbcr-abl negative** au duc la următoarele constatări:

- **Policitemia vera** : detectarea mutației Jak2v617f a fost esențială,89.5% dintre pacienți au fost Jak 2pozitiv.
  - Policitemia clonala (vera) se coreleaza cu prezența unui număr mare de leucocite și trombocite( $p < 0.005$ ) față de policitemia nonclonala (secundară)
  - Statusul homozigot a fost prezent la 67% dintre pacientii PV si a fost corelat statistic cu leucocitoză accentuată și valori mari de LDH.
  - Complicațiile trombotice au fost semnificativ mai multe la pacienții cu boală clonală față de cei cu policitemie reactiva ( $p=0.033$ ) (Jak2v617f este factor de risc pentru tromboze)
- **Trombocitemia esentiala:** mutația Jak2 V617F a fost prezentă la 56.4% dintre pacienți (similar cu date din literatură).
  - Toti pacienții TE Jak2V617F pozitivi au fost heterozigoți
  - Corelație statistică semnificativă a fost constatată la valoarea mai mare a hemoglobinei la cazurile Jak2V617F pozitive.
  - În grupul de 39 pacienți cu TE am identificat un subgrup de 8 pacienți care corespund fenotipului **PV mascat** avand hemoglobine cu valori peste 16 g/dl , majoritatea de sex masculin, cu valori crescute ale leucocitelor . La acest grup s-a constatat o incidența a trombozelor de 50% , mai mare decât incidența constatată la grupul “true”TE(22.5%) sau „true”PV(31.6%).
- Cazurile de **Mielofiproza primara (MFP)** sunt cu pacienți mai in vârstă (datele sunt similare cu cele din literatură) cu valorile cele mai mari ale splenomegaliei

(medie 178mm), cu valorile cele mai mari de LDH (medie 543 U/l) și cele mai mici valori de hemoglobină (medie 11,3 g/dl) dintre pacienții cu NMPc

- Mutația Jak2V617F a fost prezentă la 47.8% (date comparabile cu cele din literatură) iar în prezența mutației s-au observat valori mai mari de hemoglobină, număr de leucocite mai mare și valoare LDH mai mare deși nu s-au obținut corelații statistice semnificative ( $p > 0.05$ )
  - Am identificat 10 cazuri cu **MFP prefibrotică**. Acestea au fost corect încadrate în grupul MFP după examinarea histopatologică a măduvei osoase. Diagnosticul prezumtiv fusese de TE (4 cazuri); MMM (4 cazuri) și NMPc (2 cazuri). 50% dintre acestea sunt Jak2V617F pozitive
- S-a constatat prezența unui număr mare de **Neoplazie mieloproliferativă cronică neclasificată** (19.8%) dar și alte studii raportează valori comparabile (14.8% dintr-un studiu populațional suedez în care s-au evaluat 9384 pacienți)
- Acești pacienți sunt pacienți în vârstă (vârsta medie este de 62.4 ani) cu valori mari ale leucocitelor și trombocitelor. S-a constatat prezența mutației Jak2V617F la 70%. Iar complicațiile trombotice au fost exclusiv la pacienții Jak2 pozitiv.
  - Diagnosticul în cazul acestei entități se bazează pe aspectul histopatologic al MO
4. **Complicațiile trombotice** în NMPc: datele obținute au fost concordante cu datele din literatură (24.7%) iar mutația Jak2V617F a fost prezentă la 76% dintre NMPc cu tromboze.
- Doar 24% dintre pacienți au avut mai multe evenimente trombotice dar la aceștia mutația JakV617F a fost prezentă la 83.3%.
  - Cea mai mare incidență a mutațiilor a fost la cazurile identificate ca PV mascat (50%) urmate de PV (31,6%) și TE (fără cazurile Pvmascat) (22.5%)
5. În tot grupul de NMPc-Bcr-abl negative **prezența mutației Jak2V617F** s-a corelat statistic semnificativ cu numărul de leucocite ( $p = 0.005$ ) și valoarea hemoglobinei ( $p = 0.001$ ).
- Statusul homozigot este asociat cu un LDH mare ( $p = 0.005$ ) iar statusul heterozigot este corelat statistic cu prezența unui număr mai mare de trombocite ( $p = 0.003$ )
6. **Supraviețuirea** mai mare de cinci ani nu a avut asocieri statistice cu prezența Jak2V617F ( $p = 0.731$ ) sau cu evenimentele trombotice ( $p = 0.930$ ). Decesele înregistrate (8.4%) au fost datorate transformărilor blastice și complicațiilor secundare fibrozei.

## 7. Particularitățile ale diagnosticului molecular-aspecte tehnice:

- In ceea ce privește tehnica de laborator, am evidențiat necesitatea utilizării în diagnostic a unei metode de **detectie a mutației Jak2V617F** cu **sensibilitate mare** care să poată detecta până la valori foarte mici (1-2%) ale concentrației alelei mutante.
- În ghidurile actuale (ESMO,2015) nu se recomandă detectarea cantitativă a mutației

Jak2V617F. Testul pe care l-am realizat pentru detectare semicantitativă pe o scala obținută prin diluții seriale de ADN mutant în ADN sălbatic este un test simplu, necostisitor și cu rezultate bune. Dar consider că, în viitor, cuantificarea încărcăturii alelice va trebui efectuată prin metode precise (Real time PCR) pentru un plus de acuratețe în aprecierea statusului mutațional și pentru evaluarea răspunsului la terapie (mai ales la tratamentul cu interferon, deoarece în cazul tratamentului cu inhibitorii de Jak nu sunt raportate modificări ale concentrației de mutație)

- Standardizarea metodei de monitorizare a tratamentului cu antitirozin kinaze (RQ PCR ) se impune ca regulă de bază în diagnosticul molecular curent dacă dorim să avem rezultate corecte și comparabile între laboratoare și mai ales cu cele ale laboratoarelor de referință.
- Limita acestui studiu: Diagnosticul molecular în NMPc este mult mai complex la ora actuală. Acest studiu a fost dedicat markerilor deja „clasici” Bcr-abl și Jak2V617F. Descoperirile ultimilor ani (2013) au dus la apariția de noi markeri care au un foarte important rol în diagnostic. Este vorba în principal de mutațiile CALR precum și de mutațiile mai rare Jak2 exon 12 , MPL, AXSL1... O evaluare cât mai completă a NMPc va trebui să facă referire la toți acești markeri. Viitorul, cu o genetică moleculară în plină dezvoltare (NGS, PCR digital etc) va aduce și mai multe clarificări în această patologie heterogenă.

Prin toate cele expuse mai sus consider că obiectivele acestui studiu au fost atinse și rezultatele obținute confirmă importanța pe care acești markeri o au în diagnosticul NMPc.

nr.din Nr **Bibliografie selectivă**  
teza

- 7 1 James C1, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive Nature. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.
- 12 2 Lyon MF. The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. American Journal of Human Genetics 42, 8-16 (1988)
- 35 3 Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Bjorkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. Haematologica 2010; 95: 1216–1220.
- 36 4 Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, et al. Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. Br J Cancer 2009; 100: 822–828.
- 41 5 Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009 114:937-951;
- 47 6 Fialkow P. Philadelphia chromosome (Ph1)-negative chronic myelogenous leukemia (CML): a clonal disease with origin in a multipotent stem cell. Blood 56, 70-73 (1980).
- 48 7 Fialkow P, Faguet G, Jacobson R, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. Blood 58, 916-919 (1981).
- 51 8 M Baccarani, et al. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. 2013 Oxford Journals Medicine & Health Annals of Oncology Volume 23, Issue suppl 7 Pp. vii72-vii77.
- 60 9 Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Carobbio A, Rumi E, et al. Masked polycythemia Vera (mPV): Results of an international study. American Journal of Hematology Volume 89, Issue 1, Version of Record online: 19 SEP 2013
- 86 10 Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. Leukemia. 2013;27(9):1874.
- 88 11 Vannucchi AM, Pieri L, Guglielmelli P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. Ther Adv Hematol. 2011 Feb; 2(1): 21–32.
- 91 12 Tevet M, Ionescu R, Dragan C, Lupu AR. Influence of the JAK2 V617F Mutation and Inherited Thrombophilia on the Thrombotic Risk among Patients with Myeloproliferative Disorders. Maedica (Buchar). 2015 Mar; 10(1): 27–32.
- 98 13 Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 V617F allele burden. Leukemia (2007) 21, 1952–1959.
- 100 14 Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. Cancer 2006; 106: 631–635.
- 101 15 Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. Leukemia. 2010;24(9):1574-1579.



- 102 16 Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FW, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*. 2008 May 15;111(10):4922-9.
- 125 17 Teofili L, Martini M, Cenci T, Guidi F, Torti L, Giona F, et al. Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *Int J Cancer*. 2008; 123(7):1586-92 (ISSN: 1097-0215)
- 136 18 Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014 Jun;27(2):129-40.
- 158 19 Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014 Mar 6; 123(10): 1544–1551.
- 160 20 Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1472-7.
- 161 21 Chao MP, Gotlib J. Two faces of ET: CALR and JAK2. *Blood* 2014 123:1438-1440.
- 164 22 Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization–essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* 2012 120:5128-5133.
- 176 23 Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013 Feb;88(2):141-50.
- 186 24 Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Gangat N, Vaidya R, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the Mayo clinic experience. *Mayo Clin Proc*. 2012 Jan;87(1):25-33.
- 187 25 Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014 123:2220-2228.
- 188 26 Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1861-9.
- 190 27 Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, et al. 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*. 2008 Apr;22(4):756-61.
- 192 28 Vladareanu AM, Popov V, Bumbea H, Onisai M, Ilea A, Dobrea C, Miulescu M. Splanchnic vein thrombosis, the onset manifestation in JAK positive chronic myeloproliferative disorders neoplasms. *M. J Med Life*. 2011 Jan-Mar;4(1):97-101.
- 193 29 Gabert J, Beillard E, et al. Standardization of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* (2003), No. 17(12), p. 2318-2357.
- 194 30 Pieri L, Spolverini A. Concomitant Occurrence of BCR-ABL and JAK2V617F Mutation. *Blood* (2011), No. 118, p. 344–346.
- 195 31 Hussein K, Bock O, et al. Chronic Myeloproliferative Diseases with Concurrent BCR-ABL Junction and JAK2V617F Mutation. *Leukemia* (2008), No. 22, p. 1059–1062.
- 199 32 Lussana F, Carobbio A, Randi ML, Elena C, Rumi E, Finazzi G, et al. A lower intensity of treatment may underlie the increased risk of thrombosis in young patients with masked polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2014 Nov;167(4):541-546.
- 200 33 Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: Morphology and clinical practice. *American Journal of Hematology*, Volume 91, Issue 4, pages 430-433, April 2016.
- 203 34 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016 127:2391-2405.

- 204 35 Smalberg JH, Murad SD, Braakman E. Myeloproliferative disease in the pathogenesis and survival of Budd–Chiari syndrome. *Haematologica*. 2006;9(12):1712–1713.
- 206 36 Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011 118:1723-1735.
- 207 37 Kiladjian JJ. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *ASH Education Book* December 8, 2012 vol. 2012 no. 1 561-566.
- 213 38 Marty C, Lacout C, Martin A, Hasan S, Jacquot S, Birling MC, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood* 2010 116:783-787.
- 214 39 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-61.
- 215 40 Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387-97.
- 217 41 Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014 124:1062-1069.
- 218 42 Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007 109:2310-2313.
- 219 43 Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005 Dec 3;366(9501):1945-53.
- 220 44 Scott MA, Erber WN. The integrated approach to the diagnosis of hematological malignancies. *Diagnostic techniques in hematological malignancies*, Cambridge University Press, 2010; 111-126.
- 222 45 Covic M, Stefanescu D, Sandovici I. *Genetica bolii canceroase*. *Genetica Medicala*, 2004.:496-515.
- 225 46 Beer PA, Green A. Myeloproliferative neoplasms. *Diagnostic techniques in hematological malignancies*, Cambridge University Press, 2010; 283-306.
- 226 47 Vannucchi AM, Barbui T, Cervantes F, Harrison C, Kiladjian JJ, Kröger N, Thiele J, Buske C. Philadelphia Chromosome-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines. Published in 2015 – *Ann Oncol* (2015) 26 (suppl 5): v85-v99.
- 227 48 Butoianu E, Niculescu Mizil E. Leucemia mieloidă cronică. *Tratat de medicină internă*, Hematologie -partea a IIa, 1999; 133-162.
- 239 49 Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379-90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347. Epub 2013 Dec 10.
- 240 50 Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2391-405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542. Epub 2013 Dec 10.
- 241 51 Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2452-66.
- 244 52 Jones AV, Kreil S. Widespread Occurrence of The JAK2 V617F Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders. In: *Blood* (2005), No. 106, p. 2162–2168
- 245 53 Ursuleac I, Colita A, Adam T, Jordan C, Ilea A, Coriu D et al. The Concomitant Occurrence of JAK2V617F Mutation and BCR/ABL Transcript with Phenotypic Expression - An Overlapping Myeloproliferative Disorder or Two Distinct Diseases? - Case Report. In: *Journal of Medicine and Life* (2013), No. 6(1), p. 34-37.
- 247 54 Tefferi A1. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):3-13. Epub 2007 Sep 20.

- 248 55 Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; **6**: 372–375.
- 249 56 Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, Kutok J, Clark J, Galinsky I, Griffin JD, Cross NC et al, A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348:1201–1214.
- 250 57 Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):840-6
- 252 58 A. Tefferi, P. Noel, C.A. Hanson, Uses and abuses of JAK2 and MPL mutation tests in myeloproliferative neoplasms *J Mol Diagn*, 13 (2011), pp. 461–466
- 253 59 Laborator Synevo. Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate 2012. Ref Type: Catalog
- 254 60 N C P Cross, H E White, D Colomer, H Ehrencrona, L Foroni, E Gottardi, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia, *Leukemia* (2015) 29, 999–1003
- 255 61 Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):14-22
- 256 62 Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008 Jul;22(7):1299-307.
- 257 63 Robert Kralovics, Ph.D., Francesco Passamonti, M.D., Andreas S. Buser, M.D., Soon-Siong Teo, B.S., Ralph Tiedt, Ph.D., Jakob R. Passweg, M.D., Andre Tichelli, M.D., Mario Cazzola, M.D., and Radek C. Skoda, M.D. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders *N Engl J Med* 2005; 352:1779-1790