



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterització i classificació genòmica de les neoplàsies mieloproliferatives

Marta Garrote i Ordeig

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

CARACTERITZACIÓ I CLASSIFICACIÓ GENÒMICA DE LES NEOPLÀSIES MIELOPROLIFERATIVES

**Memòria de tesi doctoral presentada per Marta Garrote i Ordeig per
optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona**



Direcció i tutoria per Alberto Alvarez Larrán

Hematòleg Consultor al Servei d'Hematologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona

Grup de Neoplàsies Mieloides, Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer, Barcelona

Departament de Medicina, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona

Programa de Doctorat en Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Abril de 2024

Agraïments

En primer lloc, vull fer un agraïment al Dr. Alberto Alvarez Larrán, per acollir-me des del principi en el camp de les neoplàsies mieloproliferatives i fer-me'n partícip. També vull deixar constància de la confiança dipositada en mi des del principi i del treball en equip portat a terme.

També vull fer un agraïment a tots els membres del GEMFIN (*Grupo Español de Neoplasias Mieloproliferativas Filadelfia Negativas*) per la seva col·laboració i bona predisposició al treball conjunt, que és fonamental en la recerca que fem.

M'agradaria fer una menció especial a les meves companyes del laboratori d'hematopatologia, amb qui treballo en el meu dia a dia i han viscut de prop el procés d'elaboració d'aquesta tesi doctoral. Sense el seu suport diari, aquest projecte s'hagués fet molt més feixuc.

Aquest treball el dedico a la meva mare, al meu pare i al meu germà, que des que era ben petita han acompanyat el meu interès pel coneixement i la ciència, l'han recolzat i sé que veuen aquest treball com una fita important en aquesta direcció. Gràcies, pare, per algunes lectures difícils de pair, i gràcies, mare, pel dibuix de la portada i la contraportada.

Vull agrair a les meves amigues i als meus amics el suport aquests últims mesos i, en realitat, el suport a la vida en general. Em sento molt estimada i recolzada en els meus projectes, siguin cantar a una coral o presentar una tesi doctoral. Gràcies de tot cor!

Un reconeixement especial a l'Adrià, el meu company. Gràcies per la teva paciència i estima i per totes les rialles que es necessiten per portar bé aquest procés.

Finalment, gràcies als i a les pacients que han participat al nostre treball. Aquest projecte us el dedico també a vosaltres.

Finançament

Aquesta tesi s'ha finançat mitjançant dos projectes FIS:

- PI18/00205, titulat “Evolución natural, caracterización molecular y disfunción endotelial de las neoplasias mieloproliferativas que debutan en forma de trombosis esplácica”.
- PI21/00231, titulat “Caracterización molecular de los pacientes con trombocitemia esencial que desarrollan resistencia a la hidroxiurea. Correlación clínica y repercusión pronóstica”.

Aquests projectes han estat concedits per el *Instituto de Salud Carlos III* (ISCIII), a través del *Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación* (FEDER), essent l'investigador principal el Dr. Alberto Alvarez Larrán i la doctoranda Marta Garrote i Ordeig, investigadora col·laboradora. Addicionalment, els estudis de seqüenciació s'han finançat parcialment mitjançant una beca rebuda per part del *Grupo Español de Neoplasias Mieloproliferativas Filadelfia Negativas* (GEMFIN).

Índex de continguts

Agraïments	7
Finançament	9
Índex de taules	15
Índex de figures	16
Abreviatures i acrònims	17
Enumeració dels articles de la tesi	19
1. Introducció	21
1.1. Introducció a les neoplàsies mieloproliferatives	23
1.1.1. La leucèmia mieloide crònica, com a model de NMP	24
1.1.2. Les NMP Filadèlfia negatives i les altres entitats reconegudes	26
1.2. Patogènia de les NMP i la via de senyalització JAK-STAT	27
1.3. Les mutacions <i>driver</i> en les NMP	29
1.3.1. La mutació de <i>JAK2</i> V617F	29
1.3.2. Altres mutacions de <i>JAK2</i>	31
1.3.3. La mutació de <i>MPL</i>	31
1.3.4. La mutació de <i>CALR</i>	32
1.4. Epidemiologia i supervivència de les NMP	34
1.4.1. Incidència i característiques demogràfiques de les NMP	34
1.4.2. Supervivència en les NMP	34
1.4.3. Progressió a MF i LMA	35

1.5.	Característiques clíniques, troballes morfològiques i criteris diagnòstics en les NMP	36
1.5.1.	Característiques clíniques i criteris diagnòstics de la PV	37
1.5.2.	Característiques clíniques i criteris diagnòstics de la TE i la MF post-TE ...	40
1.5.3.	Característiques clíniques i criteris diagnòstics de la MFP i de la MFP pre-fibròtica	42
1.6.	El perfil genòmic de les NMP	46
1.6.1.	Les mutacions “clonal driver” en les NMP	47
1.6.2.	La classificació genòmica de Grinfeld de les NMP	48
1.6.3.	El perfil genòmic de la MFP i la MFS.....	50
1.7.	Les NMP i la trombosi	52
1.7.1.	El perfil molecular de les NMP i el risc trombòtic	54
1.7.2.	Les NMP i la trombosi esplàcnica.....	55
1.8.	Fonamentació dels estudis realitzats	57
2.	Hipòtesis	59
3.	Objectius.....	63
4.	Materials, mètodes i resultats	67
4.1.	Primer treball	69
4.2.	Segon treball.....	85
5.	Discussió	103
5.1.	Classificació genòmica en pacients joves amb PV i TE en funció de la presència de TVE i la seva cronologia.....	106
5.2.	Classificació genòmica de pacients amb MFP i MFS	111

5.3. L'aplicació de les classificacions genòmiques en les NMP	117
6. Conclusions	121
7. Bibliografia.....	127

Índex de taules

Taula 1. Categories diagnòstiques reconegudes en les neoplàsies mieloproliferatives...	24
Taula 2. Criteris pel diagnòstic de la PV segons la ICC (2022)	38
Taula 3. Criteris pel diagnòstic de la MF post-PV segons la ICC (2022)	38
Taula 4. Criteris pel diagnòstic de la TE segons la ICC (2022)	40
Taula 5. Criteris pel diagnòstic de la MF post-TE segons la ICC (2022).....	41
Taula 6. Criteris pel diagnòstic de la MFP pre-fibròtica segons la ICC (2022)	43
Taula 7. Criteris pel diagnòstic de la MFP establerta segons la ICC (2022)	44

Índex de figures

Figura 1. La via de JAK-STAT	28
Figura 2. L'estructura de JAK2.....	30
Figura 3. L'estructura de MPL.....	32
Figura 4. Estructura de CALR i les seves mutacions més habituals	33
Figura 5. Histopatologia en la policitèmia vera.....	39
Figura 6. Histopatologia en la trombocitèmia essencial.....	42
Figura 7. Histopatologia en la mielofibrosi	46
Figura 8. Algoritme de Grinfeld.....	50
Figura 9. Proporcions de les categories genòmiques de Grinfeld en cada una de les NMP	51

Abreviatures i acrònims

- **CCUS:** citopènia clonal de significat desconegut, de l'anglès *clonal cytopenia of unknown significance*
- **CHIP:** hematopoesi clonal de potencial indeterminat, de l'anglès *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*
- **DTA:** abreviatura per referir-se conjuntament als gens *DNMT3A*, *TET2* i *ASXL1*
- **EPO:** eritropoetina
- **EPOR:** receptor de l'eritropoetina
- **G-CSF:** factor estimulant de colònies de granulòcits, de l'anglès *granulocyte colony-stimulating factor*
- **G-CSFR:** receptor del factor estimulant de colònies de granulòcits, de l'anglès *granulocyte colony-stimulating factor receptor*
- **Hb:** hemoglobina
- **IC:** interval de confiança
- **ICC:** *International Consensus Classification*
- **JAK:** quinasa Janus
- **LDH:** lactat deshidrogenasa
- **LMA:** leucèmia mieloide aguda
- **LMC:** leucèmia mieloide crònica
- **MF:** mielofibrosi
- **MF post-PV:** mielofibrosi post-policitèmia vera
- **MF post-TE:** mielofibrosi post-trombocitèmia essencial
- **MFP:** mielofibrosi primària
- **MFS:** mielofibrosi secundària

- **MPL**: receptor de la trombopoetina
- **NGS**: seqüenciació de nova generació, de l'anglès *next-generation sequencing*
- **NMP**: neoplàsies mieloproliferatives
- **NMP-U**: neoplàsia mieloproliferativa, no classificable, de l'anglès *unclassifiable*
- **OMS**: Organització Mundial de la Salut
- **PCR**: reacció en cadena de la polimerasa, de l'anglès *polymerase chain reaction*
- **PV**: policitèmia vera
- **SMD**: síndrome mielodisplàstica
- **STAT**: transductor de senyal i activador de la transcripció
- **TE**: trombocitèmia essencial
- **TPO**: trombopoetina
- **TVE**: trombosi venosa esplàcnica
- **TVP**: trombosi venosa profunda
- **VAF**: freqüència al·lèlica d'una variant, de l'anglès *variant allele frequency*

Enumeració dels articles de la tesi

Tesi en format de compendi de publicacions. La tesi consta de 5 objectius i 2 articles, que són investigacions originals i que s'enumeren a continuació.

1. Autors: **Marta Garrote**, Mónica López-Guerra, Juan Carlos García-Pagán, Eduardo Arellano-Rodrigo, Francisca Ferrer-Marín, Juan Carlos Hernández-Boluda, Beatriz Bellosillo, Meritxell Nomdedeu, Virginia Hernández-Gea, Ana Triguero, Francesca Guijarro, José Álamo, Anna Baiges, Fanny Turon, Dolors Colomer, Francisco Cervantes, Alberto Alvarez-Larrán

Títol: **Genomic Classification and Outcomes of Young Patients with Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia according to the Presence of Splanchnic Vein Thrombosis and its Chronology**

Nom de la revista, any, volum i pàgines: Annals of Hematology, 2024; 103(3):737-747

Categoria: Hematologia

Factor d'impacte i quartil: 3.5 (Q2)

2. Autors: **Marta Garrote**, Mónica López-Guerra, Eduardo Arellano-Rodrigo, María Rozman, Sara Carbonell, Francesca Guijarro, Marta Santaliestra, Ana Triguero, Dolors Colomer, Francisco Cervantes, Alberto Alvarez-Larrán

Títol: **Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Primary and Secondary Myelofibrosis according to the Genomic Classification Using Targeted Next-Generation Sequencing**

Nom de la revista, any volum i pàgines: Cancers (Basel), 2023; 15(15):3904

Categoria: Oncologia

Factor d'impacte i quartil: 5.2 (Q2)

1. Introducció

1.1. Introducció a les neoplàsies mieloproliferatives

Les neoplàsies mieloproliferatives (NMP) són trastorns clonals que afecten a l'hematopoesi. El seu origen radica en l'adquisició d'alteracions genètiques, normalment mutacions somàtiques en els precursors hematopoètics, que ocasionen un canvi en el seu funcionament; en el cas de les NMP, les alteracions adquirides proporcionen un avantatge proliferatiu a les cèl·lules precursors i, com a resultat, es produeix una acumulació d'elements sanguinis madurs, tant al moll de l'os (hipercel·lularitat medul·lar) com a la sang perifèrica (leucocitosi, trombocitosi i/o poliglobúlia) (1–4). De forma addicional, els pacients amb NMP presenten de manera habitual esplenomegàlia o hepatomegàlia, ja sigui per depuració de la sang de l'excés de cèl·lules sanguínies o per la proliferació hematopoètica descontrolada, que pot donar-se també en aquests òrgans (1).

A diferència d'altres neoplàsies mieloides que afecten a l'hematopoesi, com les síndromes mielodisplàstiques, l'excés en la proliferació no va acompanyat d'una hematopoesi ineficaç, excepte en la mielofibrosi, tal i com s'explicarà més endavant. Per aquest motiu, les citopènies no són habituals en els estadis inicials de la malaltia. Així i tot, les NMP tenen potencial de progressió a entitats més agressives que provoquen una fallada medul·lar, com pot ser la leucèmia mieloide aguda (LMA) (1,4).

La classificació de les NMP no ha canviat en els últims anys. Les últimes publicacions de grups científics internacionals (5,6) (ICC, *International Consensus Classification*, 2022; OMS, Organització Mundial de la Salut, 2022) reconeixen set entitats diferents, que es distingeixen fonamentalment pel tipus d'element sanguini que es produeix en excés, juntament amb la detecció de l'alteració genètica característica. La *Taula 1* recull les categories diagnòstiques reconegudes actualment, juntament amb els trets analítics característics i l'alteració genètica freqüentment associada en cada un dels casos. En

l'actualitat, el diagnòstic de les NMP es basa en la integració de les dades clíniques i analítiques dels pacients, amb l'estudi morfològic, citogenètic i molecular de la sang perifèrica i el moll de l'os (1,5).

Taula 1. Categories diagnòstiques reconegudes en les neoplàsies mieloproliferatives

Categoria diagnòstica	Tret característic	Alteració genètica adquirida
Leucèmia mieloide crònica	Leucocitosi amb neutrofilia i mielèmia: acumulació d'elements granulocítics madurs i semi-madurs	Gen quimèric <i>BCR::ABL1</i> , resultat de la translocació cromosòmica t(9;22)
Policitemia vera	Poliglobúlia: acumulació de glòbuls vermells	<i>JAK2</i> V617F o altres mutacions de <i>JAK2</i> (exons 12 a 14)
Trombocitemia essencial	Trombocitosi: acumulació de plaquetes	<i>JAK2</i> V617F, mutació a <i>CALR</i> o mutació a <i>MPL</i>
Mielofibrosi primària	Acumulació de teixit fibròtic al moll de l'os, associat a una proliferació anòmala de megacariòcits	<i>JAK2</i> V617F, mutació a <i>CALR</i> o mutació a <i>MPL</i>
Leucèmia neutrofílica crònica	Leucocitosi amb neutrofilia	Mutació a <i>CSF3R</i>
Leucèmia eosinofílica crònica, no altrament especificada	Eosinofília	Diagnòstic d'exclusió, sense mutació definitiva
Neoplàsia mieloproliferativa, no classificable	Acumulació de qualsevol element sanguini madur, sense complir criteris diagnòstics de cap de les entitats prèvies	Diagnòstic d'exclusió, sense mutació definitiva

Taula original de l'autora, feta a partir d'informació extreta de: Gianelli et al, Virchow Archiv. 2023;482(1):53-68 (7).

1.1.1. La leucèmia mieloide crònica, com a model de NMP

La leucèmia mieloide crònica (LMC) és la NMP que es va descriure en primer lloc i la primera neoplàsia hematològica en la qual es va poder relacionar una alteració genètica

amb la patogènia de la malaltia (8,9), motiu pel qual ha servit de model per les altres NMP i també per les neoplàsies hematològiques en general.

Es tracta d'una NMP en la qual predomina una proliferació descontrolada de la sèrie granulocítica en diversos estadis maduratiu, que resulta en un moll d'os extremadament cel·lular, leucocitosi amb neutrofília i mielèmia, juntament amb esplenomegàlia (1,8). Com s'esmenta a la Taula 1, l'alteració genètica causant és una translocació entre els cromosomes 9 i 22, la t(9;22)(q34.1;q11.2), amb l'aparició d'un nou cromosoma, el cromosoma Filadèlfia, que conté un gen de fusió resultant de la translocació: el *BCR::ABL1* (1). Aquest gen quimèric dona lloc a una tirosina-quinasa que es troba activada constitutivament, és a dir, que es troba en funcionament de forma permanent i perd la seva capacitat autoreguladora (9), la qual cosa explica la patogènia de la malaltia. Tot i que en la resta de NMP no es produeix un gen quimèric, el que tenen gairebé totes en comú és l'adquisició de mutacions que, d'una manera o una altra, també resulten en l'activació constitutiva d'un receptor de membrana associat a tirosina-quinasa o de la seva via de senyalització intracel·lular (1).

El cas de la LMC és únic, ja que una sola alteració genètica, el gen *BCR::ABL1*, explica tots els casos de la malaltia i en defineix l'entitat. El coneixement de l'alteració genètica causant de la LMC ha permès desenvolupar fàrmacs inhibidors de la quinasa ABL, que aconsegueixen modificar l'evolució natural de la malaltia, sent el paradigma de tractament del càncer dirigit a una diana molecular.

En la resta de NMP, la patogènia és més variada i més d'una alteració genètica pot donar un quadre clínic similar; així i tot, el nombre d'alteracions genètiques que es produeixen recurrentment en les NMP i n'expliquen, almenys parcialment, la seva base molecular és baix i s'anomenen mutacions *driver*.

1.1.2. Les NMP Filadèlfia negatives i les altres entitats reconegudes

Dins de les NMP, la policitemia vera (PV), la trombocitemia essencial (TE) i la mielofibrosi primària (MFP) comparteixen una sèrie de característiques clíniques i genètiques, que permeten englobar-les en un conjunt, tal com es veurà en les següents seccions (2). Tradicionalment, s'han anomenat NMP "Filadèlfia negatives", en contraposició a la LMC.

Les altres dues categories recollides per les classificacions internacionals (leucèmia neutrofílica crònica i leucèmia eosinofílica crònica) són entitats poc freqüents, no tan ben definides a nivell molecular, i amb unes bases fisiopatològiques diferents (7). En no ser objecte d'estudi d'aquesta tesi, no es desenvoluparà més informació sobre elles.

Cal fer una menció especial a la darrera categoria de NMP contemplada per les classificacions internacionals (5,6): la neoplàsia mieloproliferativa, no classificable (NMP-U, de l'anglès *unclassifiable*). Es tracta d'un calaix de sastre, on s'hi engloba un grup heterogeni de casos, que es caracteritzen per presentar signes de mieloprolifерació sense encaixar en cap de les altres categories diagnòstiques. Aquests casos comparteixen característiques clíniques, morfològiques i moleculars amb les altres NMP, però sense complir els requisits diagnòstics, bé sigui per trobar-se en estadis molt precoços de la malaltia, per presentar característiques intermèdies entre dues entitats o bé per presència concomitant d'altres malalties, que n'emascaren el diagnòstic (7).

Com que la present tesi doctoral se centra únicament en les NMP Filadèlfia negatives, la PV, la TE i la MFP, a partir d'aquest moment, sempre que ens referim a NMP, ens referirem a aquestes tres entitats i quan ens referim a NMP-U seran casos amb un *background* genètic en comú amb elles.

1.2. Patogènia de les NMP i la via de senyalització JAK-STAT

Les NMP tenen en comú que l'alteració genètica adquirida afecta, de manera més o menys directa, una via de senyalització intracel·lular que controla la mieloproliferació, que en el cas de la PV, la TE i la MFP és la via de JAK-STAT. En condicions fisiològiques, aquesta via de senyalització es troba regulada per mecanismes externs, és a dir, la seva activació es produeix quan una citocina/factor de creixement s'uneix a la superfície cel·lular. En canvi, amb l'adquisició de les mutacions *driver*, aquesta via es troba activada de manera constitutiva.

La via de JAK-STAT (JAK, de quinasa Janus, i STAT, de transductor de senyal i activador de la transcripció) és una via de senyalització intracel·lular altament preservada a nivell evolutiu i que participa en una gran quantitat de processos dins del nostre organisme. La via JAK-STAT s'activa a través d'un receptor a la membrana cel·lular, en resposta a la unió de diversos lligands (citocines, factors de creixement, interferons i hormones), participant en la regulació d'un nombre ampli de processos cel·lulars, com són el creixement, la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi (10,11). A nivell de l'hematopoesi, és conegut que aquesta via contribueix a la regulació de l'eritropoesi, la megacariopoesi i la granulopoesi, mitjançant la seva activació a través de les hormones eritropoetina (EPO), trombopoetina (TPO) i el factor estimulant de colònies de granulòcits (G-CSF), respectivament, a partir de la unió als seus respectius receptors de membrana: el receptor de l'EPO (EPOR), el receptor de la TPO (MPL) i el receptor del G-CSF (G-CSFR) (12).

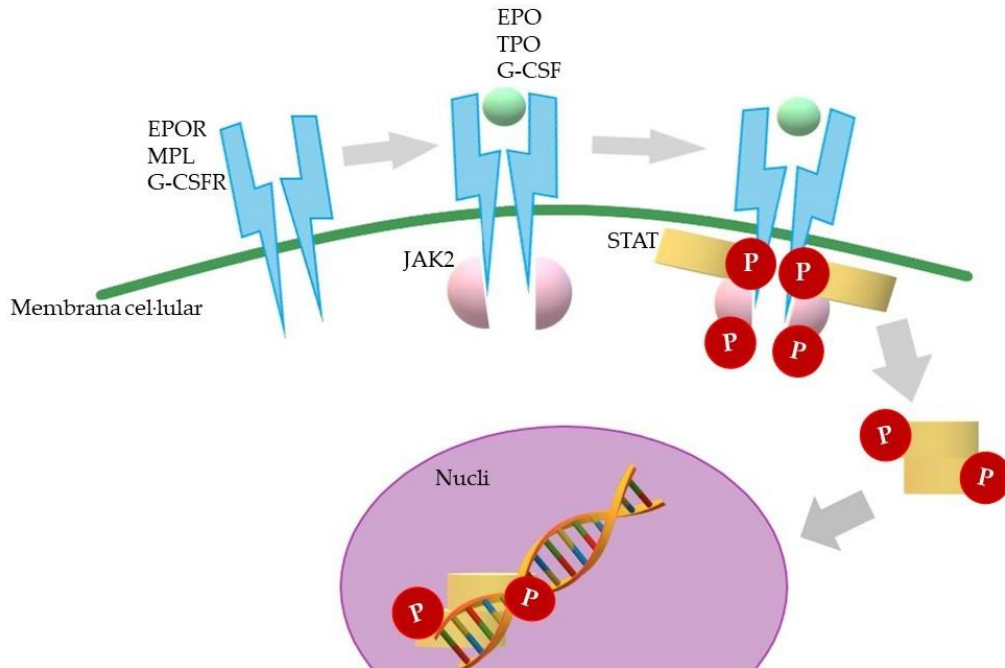


Figura 1. La via de JAK-STAT

Simplificació del funcionament de la via JAK-STAT en la regulació de l'hematopoesi. En unir-se l'hormona en qüestió (EPO, TPO o G-CSF) al dímer del receptor de membrana, aquest recluta dues proteïnes JAK2, que es fosforilen mútuament. Això causa l'atracció de STAT, que també es fosforila i constitueix dímers, els quals es traslladen al nucli i activen la transcripció. *Figura adaptada de: Hu et al, Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):402 (11).*

Un cop el lligand s'ha unit al receptor de membrana, s'envia un senyal d'activació intracel·lular a través de JAK. Això ocorre amb la unió del receptor de membrana a JAK, que presenta activitat tirosina quinasa; el que succeeix és que dues proteïnes JAK es fosforilen mútuament i, com a resultat, hi ha un reclutament de proteïnes STAT que, també mitjançant la fosforilació, constitueixen homodímers actius, que es dirigeixen al nucli, on interactuen amb regions promotores de gens i n'activen la seva transcripció (10). A la *Figura 1* es presenta un esquema sobre aquest procés molecular. Hi ha diversos tipus de JAK i STAT però, en el cas de l'hematopoesi, les proteïnes que hi participen són JAK2 i STAT1, STAT3 i STAT5 (12).

1.3. Les mutacions *driver* en les NMP

Les NMP presenten mutacions *driver*, que es produeixen als gens *JAK2*, *MPL* i *CALR*, ocasionant una activació perenne de la via de senyalització JAK-STAT. Aproximadament el 85% de les NMP presenten una mutació *driver* canònica, que n'explica la seva patogènia i que és exactament la mateixa en la majoria dels casos (13). Tot i que els pacients poden presentar addicionalment altres mutacions en gens associats a neoplàsies mieloides, aproximadament el 55-60% de les NMP no presenten mutacions addicionals (14,15), cosa que fa pensar que la mutació *driver* com a única alteració genètica és suficient pel desenvolupament de la malaltia, si es donen les condicions ambientals adequades al nínxol hematopoètic (16). En la gran majoria de casos, la mutació *driver* és somàtica o adquirida, però s'ha vist que la seva adquisició pot ser molt precoç, fins i tot durant el període fetal, molts anys abans del desenvolupament de la malaltia (17).

El fet que les mutacions *driver* tinguin tanta relació amb la patogènia de la malaltia i que es trobin presents en la gran majoria dels casos, fa que la seva detecció sigui essencial pel correcte diagnòstic d'aquestes entitats (5).

1.3.1. La mutació de *JAK2* V617F

La mutació de *JAK2* V617F és la mutació *driver* més freqüent en les NMP i va ser la primera alteració canònica en identificar-se l'any 2005 (18,19). Es troba present en més del 95% de les PV i entre el 50% i el 60% de les TE i les MFP (13,15). Es tracta d'una mutació puntual tipus *missense* (c.1849G>T), la qual ocasiona el canvi d'una valina per una fenilalanina al codó 617 (18). Això succeeix al domini pseudoquinasa JH2 de *JAK2*, limitant la funció autoinhibitòria sobre JH1. En conseqüència, es produeix una

fosforilació constitutiva al domini JH1, que provoca l'activació contínua de STAT5, amb el conseqüent estímul constant de l'hematopoesi. La *Figura 2* mostra l'estructura de la proteïna JAK2 i la ubicació de V617F.



Figura 2. L'estructura de JAK2

L'estructura de JAK2 és molt similar a la resta de proteïnes de la família JAK. La proteïna està constituïda per 7 dominis d'homologia (JH), i JH1 és el que té activitat tirosina quinasa. Tal com es veu, la mutació V617F es produeix al domini JH2 (pseudoquinasa). El gen de *JAK2* es troba ubicat al braç curt del cromosoma 9. *Figura adaptada de: Hu et al, Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):402 (11).*

Aquesta alteració somàtica també es troba present de manera menys habitual a altres neoplàsies mieloides, com la leucèmia mielomonocítica crònica o la neoplàsia mielodisplàstica/mieloproliferativa amb mutació de *SF3B1*/sideroblasts en anell i trombocitosi (20), i s'ha vist en el 0.1-0.2% de la població general, en absència d'una malaltia hematològica, en el context d'hematopoesi clonal de potencial indeterminat (CHIP, de l'abreviació en anglès) (16,21). És conegut que els individus que mostren *JAK2* V617F en absència de criteris de NMP tenen nivells més alts d'hemoglobina, recomptes de plaquetes i leucòcits superiors i un risc més de 200 vegades superior a la població general de desenvolupar una NMP. A més, mostren 2 i 3 vegades més risc de patir una cardiopatia isquèmica i una trombosi venosa profunda, respectivament (21).

1.3.2. Altres mutacions de *JAK2*

Una proporció baixa de pacients amb PV, aproximadament el 3% d'ells, poden presentar mutacions activadores de *JAK2* diferents a la V617F, les quals afecten fonamentalment a l'exó 12 del gen (7,22). Aquest tipus de mutacions es van descriure per primera vegada l'any 2007 en pacients amb eritrocitosi sense la mutació V617F (23), i des de llavors s'han publicat treballs que inclouen un nombre modest de casos amb mutacions diverses que afecten aquesta regió del gen (22,24). Es tracta de mutacions puntuals o delecions/insercions de pocs parells de bases amb un marc de lectura conservat, que causen la pèrdua de dos aminoàcids a prop de la posició 540 de la proteïna (22,23).

Els pacients amb mutacions a l'exó 12 de *JAK2* presenten unes característiques clíniques i histopatològiques diferents d'aquells diagnosticats de PV amb mutació de *JAK2* V617F. La mutacions activadores a l'exó 12 estan associades a un quadre clínic d'eritrocitosi aïllada, sense alteracions de la granulopoesi ni de la megacariopoesi (22,25,26). La presència d'aquestes mutacions s'inclou en els criteris diagnòstics de PV en les últimes recomanacions internacionals (6,7).

1.3.3. La mutació de *MPL*

Les mutacions adquirides a *MPL* es troben presents en un 5-10% de les MFP i en un 1-4% de les TE (27,28). La proteïna MPL que, com s'ha comentat, es correspon al receptor transmembrana de la TPO, està constituïda per 615 aminoàcids i el gen que la codifica es troba al cromosoma 1 (27). Tal i com es pot veure a la *Figura 3*, està constituïda per 3 dominis: el domini extracel·lular, el domini transmembrana i el domini citoplasmàtic (27,28).

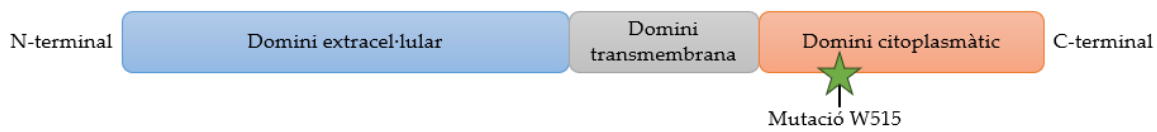


Figura 3. L'estructura de MPL

A la figura s'observen els tres dominis que constitueixen el receptor transmembrana MPL. S'ha marcat en verd la posició de la mutació més freqüentment associada a neoplàsies mieloproliferatives, la W515. *Figura adaptada de: Palumbo et al, Front Oncol. 2019;9(321):1-10 (28).*

Les mutacions de *MPL* que s'associen a NMP són mutacions puntuals activadores i la primera en descriure's va ser la W515L, a l'exó 10, l'any 2006 (29). En aquest treball, es va portar a terme una seqüenciació dels dominis transmembrana i juxtamembrana dels receptors *EPOR*, *G-CSFR* i *MPL* en pacients amb NMP sense mutació de *JAK2* i es va identificar aquesta variant en alguns casos. A més, es va poder demostrar que aquesta variant té un efecte d'activació constitutiva del receptor. Posteriorment, s'han identificat altres mutacions activadores a *MPL*, moltes de les quals afecten al mateix exó 10 i particularment al mateix residu 515 (W515L, W515K, W515A, W515R) o a residus propers (S505N). Mitjançant tècniques de seqüenciació de l'exoma, també s'han identificat mutacions somàtiques activadores en posicions més allunyades: T119I, S204F, S204P i E230G (24,27,28,30).

1.3.4. La mutació de *CALR*

Les mutacions a *CALR* es van identificar de forma més tardana, l'any 2013 (31,32), i es troben en aproximadament el 20-25% dels pacients amb MFP o TE. *CALR* és una proteïna multifuncional, que s'ubica en condicions normals dins el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules. Participa en la via de senyalització intracel·lular del calci i ajuda al plegament de proteïnes destinades a la secreció o a la inserció a la membrana

cel·lular, contribuint de manera molt important a l'homeòstasi cel·lular. També participa en la resposta immune, en la fagocitosi i en l'adhesió cel·lular (28,33).

Per a la retenció de CALR al reticle endoplasmàtic és essencial el domini KDEL terminal de la proteïna, que desapareix amb l'adquisició de les mutacions que afecten a CALR. Tot i que s'han descrit més de 50 mutacions diferents, totes les mutacions identificades són tipus *frameshift*, ocasionant un canvi en el marc de lectura a l'exó 9, que genera una nova seqüència de 36 aminoàcids a l'extrem C-terminal, amb desaparició del motiu KDEL (28,33,34). Les variants més habituals són la tipus 1 (L367fs*46), que és una deleció de 52 parells de bases, i la tipus 2 (K385fs*47), que és una inserció de 5 parells de bases. La pèrdua del motiu KDEL dona lloc a la deslocalització de la proteïna del reticle endoplasmàtic; això permet que formi complexos estables amb MPL, que s'exposen a la superfície cel·lular i permeten la dimerització espontània de MPL i, per tant, l'activació constitutiva de la via de senyalització (33). L'estructura de CALR *wild-type* i mutant tipus 1 i 2 es pot veure a la Figura 4.

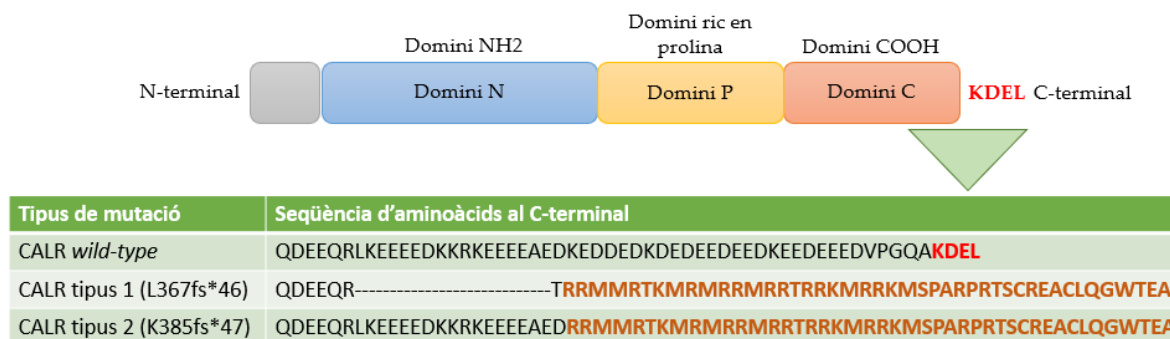


Figura 4. Estructura de CALR i les seves mutacions més habituals

Es representen els dominis que componen la proteïna de CALR. Els dominis N i P participen en l'activitat de xaperona i el domini C actua de tampó del calci, permetent-ne la unió, i participant en la retenció de la proteïna al reticle endoplasmàtic. A la taula inferior s'observa el canvi a la regió C-terminal de la proteïna amb l'adquisició de les mutacions tipus 1 i tipus 2. *Figura original de l'autora, adaptació a partir d'informació extreta de Nangalia et al, N Engl J Med. 2013;369(25):2391-405 (31).*

1.4. Epidemiologia i supervivència de les NMP

1.4.1. Incidència i característiques demogràfiques de les NMP

Es calcula que la incidència global de les NMP es troba al voltant de 2.7 casos per 100.000 habitants per any. La PV i la TE tenen incidències similars, entre 1.1 i 1.2 casos per 100.000 habitants per any. La PV té una incidència més elevada en el sexe masculí (1.5 vs. 0.9 casos per 100.000 habitants per any en sexe masculí i femení, respectivament) i, en canvi, la TE mostra més incidència en el sexe femení (1.3 vs. 1.0 casos per 100.000 habitants per any en sexe femení i masculí, respectivament). La MFP, per una altra banda, és menys freqüent, amb una incidència de 0.33 casos per 100.000 habitants per any, tenint una incidència de gairebé el doble en el sexe masculí que en el femení (0.44 vs. 0.24 casos per 100.000 habitants per any, respectivament) (16,35,36).

Pel que fa a l'edat de diagnòstic de la malaltia, com en la majoria de neoplàsies mieloides, es tracta d'entitats que es diagnostiquen a l'edat adulta avançada. La mitjana d'edat al diagnòstic en la PV es troba entre 61 i 65 anys, diagnosticant-se >90% dels casos en edats superiors als 40 anys (16,37). En la TE, la mitjana d'edat és de 67 anys i els pacients amb mutació de *JAK2 V617F* tenen edats més avançades que aquells que presenten mutació de *CALR* o no tenen cap mutació *driver* coneguda. La MFP és la NMP amb l'edat mitjana de debut més avançada, que es troba al voltant dels 69 anys (16).

1.4.2. Supervivència en les NMP

Tant la PV com la TE són entitats amb un curs crònic i una supervivència llarga. Així i tot, si es fa una comparació amb la població general ajustada per sexe i edat, diversos treballs indiquen que els pacients tenen una supervivència escurçada (16,37–39). Pel que fa a la PV, la mitjana de supervivència descrita es troba entre els 12 i els 15 anys. Un

treball publicat a *Leukemia* l'any 2013 va posar de manifest una supervivència mitjana de 14.1 anys, significativament diferent a l'esperada ajustada per sexe i edat (mitjana de supervivència als 20 anys no assolida) (37). La supervivència als 5 anys es troba al voltant del 89%, essent molt similar a les cohorts de població general de la mateixa edat, i tot indica que l'excés de mortalitat de la PV es dona a partir dels 10 anys de malaltia (16). En la TE, la mitjana de supervivència es troba entre els 14 i els 20 anys, amb una supervivència als 5 anys del 91% (16). En un treball en el qual es va fer un esforç per separar aquells casos de TE de la MFP pre-fibròtica, es va veure una mitjana de supervivència de 14.1 anys en els pacients amb TE, essent comparable a la supervivència de la població general europea de la mateixa edat i sexe (40). En una sèrie de la Clínica Mayo van veure una supervivència mitjana de 19.8 anys, trobant-se aquesta lleugerament per sota de la supervivència poblacional (38).

Pel que fa a la MFP, es tracta d'una NMP amb un pronòstic clarament pitjor, més proper a la síndrome mielodisplàstica (SMD) que a la PV o la TE. La mitjana de supervivència es troba entre 6 i 7 anys en moltes sèries, i d'altres publicacions estimen una probabilitat de supervivència als 5 anys del 35-40% (16,38,41).

En relació a les causes de mort en les NMP, les més habituals són els fenòmens cardiovasculars, la progressió a LMA o a MF i les segones neoplàsies (37,39). En la PV i la TE és més habitual la mort relacionada amb els factors cardiovasculars, mentre que en la MFP, el més freqüent és la mort per progressió de la malaltia, amb o sense transformació a LMA (39,41,42).

1.4.3. Progressió a MF i LMA

Tant la PV com la TE poden progressar a MF després d'uns anys d'evolució: la mielofibrosi secundària (MFS). Addicionalment, les tres NMP poden patir una

transformació més agressiva a LMA, i això és conegut com la fase blàstica de la malaltia (7,42,43).

La freqüència de progressió a MF als 15 anys oscil·la entre el 6 i el 14% en la PV i entre el 4 i l'11% en la TE (40,42). En relació a la transformació a LMA, en la sèrie de la Clínica Mayo esmentada amb anterioritat (38), la incidència acumulada de LMA als 20 anys tenint en compte la mort com un factor competitiu, es va calcular de 3.8% en la TE (interval de confiança [IC] al 95% 1.3-6.2%) i de 6.8% en la PV (IC al 95% 3.3-10.2%), essent significativament més elevada en la MFP (14.2%, amb IC al 95% 9.5-18.6%). Aquestes troballes van ser similars a la cohort italiana inclosa en el mateix treball i també s'apropen als resultats descrits en altres publicacions (37,40,44).

1.5. Característiques clíniques, troballes morfològiques i criteris diagnòstics en les NMP

Les categories diagnòstiques de les NMP s'han mantingut estables en els últims anys (1,5–7). El diagnòstic de cada una de les entitats es basa en el compliment d'un seguit de criteris, que integren dades analítiques, amb dades histopatològiques i moleculars.

L'estudi morfològic mitjançant la biòpsia de moll d'os segueix sent fonamental en molts casos, sobretot per valorar la morfologia i disposició dels megacariòcits i el grau de fibrosi, tenint en compte també la proporció de cel·lularitat global i la distribució de l'hematopoesi (5,7). La identificació de les mutacions *driver* és una peça clau pel diagnòstic i, en les últimes recomanacions, se suggereix l'ús de tècniques d'alta sensibilitat, que permetin detectar les variants més habituals amb una freqüència al·lèlica (VAF, de l'anglès *variant allele frequency*) $\geq 1\%$. Més concretament, es recomana que, segons la sospita diagnòstica, la identificació de la mutació de *JAK2* V617F, les

mutacions a l'exó 12 de *JAK2*, les mutacions de *MPL* que afecten al residu W515 i les mutacions de *CALR* s'avaluïn mitjançant tècniques d'alta sensibilitat dirigides, com són la PCR quantitativa, la PCR digital o la NGS (seqüenciació de nova generació, de l'anglès *next-generation sequencing*).

Les publicacions de la ICC proposen uns criteris diagnòstics per la PV, la TE i la MFP, i també per tres entitats, que formen part de l'evolució cronològica de cada una de les malalties: la mielofibrosi post-policitemia vera (MF post-PV), la mielofibrosi post-trombocitemia essencial (MF post-TE) i la MFP pre-fibròtica (7).

1.5.1. Característiques clíniques i criteris diagnòstics de la PV

Dins de la PV, es reconeixen dues fases de la malaltia: la fase de policitemia, que es defineix per un increment de la massa eritrocitària, i la fase de mielofibrosi (la MF post-PV), en la qual es produeix una fallada medul·lar progressiva amb aparició de citopènies, hematopoesi ineficaç i fibrosi al moll de l'os (1). Els criteris diagnòstics de cada una d'elles d'acord amb l'última classificació de la ICC (5) estan exposats a la *Taula 2* i a la *Taula 3*.

En relació a les característiques clíniques, durant la fase policitemica, la simptomatologia de la PV està fonamentalment associada a l'increment de la massa eritrocitària i inclou: augment de la viscositat de la sang amb dificultat per la circulació i aparició de simptomatologia microvascular (cefalea, parestèsies, eritromelàlgia), trombosis venoses i arterials, hipertensió i pruija (45). La trombosi, sobretot la venosa, és una complicació freqüent, que pot produir-se en el debut de la malaltia i afectar territoris poc habituals, com són els sinus cerebrals o el territori esplàncnic (7,46). En la fase de mielofibrosi, la MF post-PV té unes característiques clíniques indistingibles de la MFP, que s'expliquen a l'apartat corresponent.

Taula 2. Criteris pel diagnòstic de la PV segons la ICC (2022)

1. Concentració d'Hb elevada (>165g/L en sexe masculí i >160g/L en sexe femení), hematòcrit elevat (>49% en sexe masculí i >48% en sexe femení) o increment de la massa eritrocitària (>25% per sobre la mitja esperable)	Criteri major	Pel diagnòstic de PV cal que es doni alguna d'aquestes situacions: - Compliment dels 3 criteris majors* - Compliment dels criteris 1 i 2, juntament amb el criteri menor *La biòpsia de moll d'os (criteri 2) pot no ser necessària en casos d'eritrocitosi absoluta molt marcada: Hb>185g/L en sexe masculí o >165 en sexe femení o hematòcrit >55.5% en sexe masculí o >49.5% en sexe femení).
2. Biòpsia de moll d'os amb panmielosi (hipercel·lularitat i proliferació de les tres sèries hematopoètiques). Megacariòcits incrementats i pleomòrfics, sense atípies	Criteri major	
3. Presència de JAK2 V617F o mutacions a l'exó 12 de JAK2	Criteri major	
4. Nivells baixos d'eritropoetina	Criteri menor	

Abreviacions: PV, policitemia vera; ICC, *International Consensus Classification*; Hb, hemoglobina. Taula adaptada de: Gianelli et al. *Virchows Arch.* 2023;482(1):53-68 (7).

Taula 3. Criteris pel diagnòstic de la MF post-PV segons la ICC (2022)

1. Diagnòstic previ de PV	Criteri necessari	Pel diagnòstic de MF post-PV calen els 2 criteris necessaris i almenys 2 dels criteris addicionals
2. Biòpsia de moll d'os amb fibrosi grau 2 o 3	Criteri necessari	
3. Anèmia o pèrdua de necessitat de tractament de l'eritrocitosi (amb flebotomies o tractament citoreductor)	Criteri addicional	
4. Quadre leucoeritroblàstic	Criteri addicional	
5. Aparició d'esplenomegàlia palpable o increment >5cm de la ja coneguda	Criteri addicional	
6. Increment dels valors de LDH	Criteri addicional	

Abreviacions: MF post-PV, mielofibrosi post-policitemia vera; PV, policitemia vera; ICC, *International Consensus Classification*; LDH, lactat deshidrogenasa. Taula adaptada de: Gianelli et al. *Virchows Arch.* 2023;482(1):53-68 (7).

Els criteris analítics per demostrar l'increment de la massa eritrocitària no s'han modificat respecte l'anterior classificació, tant pel que fa a la xifra d'hemoglobina com

d'hematòcrit que serveixen de llindar diagnòstic. A més de l'increment de la massa eritrocitària, els pacients poden presentar altres alteracions analítiques com microcitosi, degut a la ferropènia de consum per l'alta producció de sèrie vermella, o altres signes de proliferació hematopoètica, com leucocitosi amb neutrofilia o trombocitosi (3,7,46).

La biòpsia de moll d'os mostra una cel·lularitat gairebé sempre incrementada per l'edat, amb la troballa de panmielosi, és a dir, increment de les tres sèries hematopoètiques, amb lleugera desviació a l'esquerra a les sèries eritroide i granulocítica. Els megacariòcits es troben generalment incrementats, tenen un aspecte pleomòrfic, no mostren atípies i poden formar grups laxos. Hi pot haver certa fibrosi, però no superior a grau 1 (7). A la *Figura 5* es poden veure imatges de les troballes típiques de PV a la biòpsia de moll d'os.

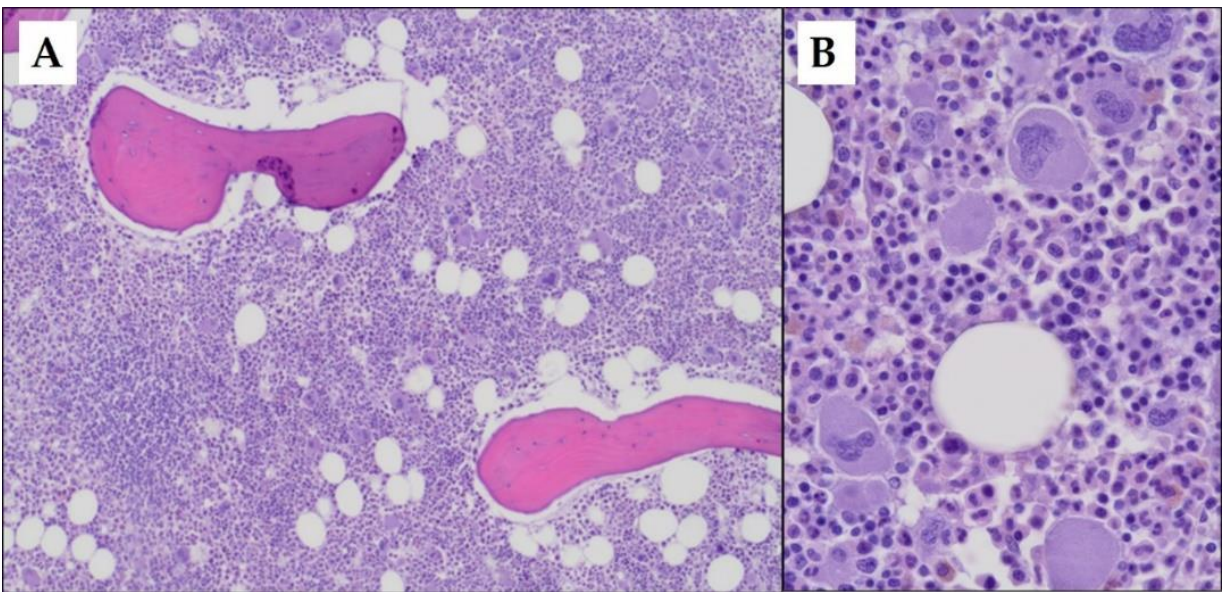


Figura 5. Histopatologia en la policitèmia vera

Biòpsia de moll d'os amb tinció amb hematoxilina-eosina d'un cas amb diagnòstic de policitèmia vera. A la imatge A (10x) veiem la hipercel·lularitat i a la imatge B (40x) s'observa un increment dels megacariòcits, que formen grups laxos. *Imatges cortesia de la Dra. Maria Rozman en mostres propietat de l'Hospital Clínic de Barcelona.*

1.5.2. Característiques clíniques i criteris diagnòstics de la TE i la MF post-TE

Tal i com succeeix amb la PV, a la TE hi ha dues fases ben establertes de la malaltia: la fase de trombocitèmia, amb la trombocitosi (xifra de plaquetes $>450 \times 10^9/L$) com a troballa característica a l'analítica, i la fase de MF (MF post-TE), que sol ocórrer anys després del diagnòstic inicial. Els criteris diagnòstics d'acord amb l'última classificació de la ICC (5) es troben a la *Taula 4* i a la *Taula 5*.

Taula 4. Criteris pel diagnòstic de la TE segons la ICC (2022)

1. Recompte de plaquetes $\geq 450 \times 10^9/L$	Criteri major	Pel diagnòstic de TE cal que es doni alguna d'aquestes situacions: - Compliment dels 4 criteris majors - Compliment dels criteris 1,2 i 3, juntament amb el criteri menor
2. Biòpsia de moll d'os amb proliferació megacariocítica: proporció incrementada de megacariòcits de mida gran, amb nucli hiperlobulat, sense formar grups densos (o molt ocasionalment). Sense alteracions a les sèries granulocítica/eritroide i sense fibrosi (com a màxim grau 1)	Criteri major	
3. No compliment dels criteris diagnòstics de LMC, PV, MFP o altres neoplàsies mieloides. Es tracta d'un diagnòstic d'exclusió	Criteri major	
4. Presència de mutacions a JAK2, CALR o MPL	Criteri major	
5. Presència d'un marcador clonal (mitjançant citogenètica o NGS) o absència d'evidència de trombocitosi reactiva	Criteri menor	

Abreviacions: TE, trombocitèmia essencial; ICC, *International Consensus Classification*; LMC, leucèmia mieloide crònica; PV, policitèmia vera; MFP, mielofibrosi primària; NGS, *next-generation sequencing*. *Taula adaptada de: Gianelli et al. Virchows Arch. 2023;482(1):53-68 (7).*

Més del 50% dels pacients amb TE es troben asimptomàtics al moment del diagnòstic i són identificats de manera casual en una analítica de rutina. Pel que fa als símptomes,

poden estar relacionats amb la trombocitosi i l'increment de la viscositat sanguínia (cefalea, parestèsies, trombosis venoses i arterials), de manera similar a la PV (45), o bé en relació a fenòmens hemorràgics, que es donen fonamentalment en casos de trombocitosi extrema (xifra de plaquetes $>1500 \times 10^9/L$), degut a la síndrome de von Willebrand adquirida (47). Entre el 15 i el 20% dels pacients presenten esplenomegàlia; la leucocitosi o l'increment de l'hemoglobina són poc habituals (7). De la mateixa manera que succeeix amb la MF post-PV, les característiques clíniques de la MF post-TE són indistingibles de la MFP.

Taula 5. Criteris pel diagnòstic de la MF post-TE segons la ICC (2022)

1. Diagnòstic previ de TE	Criteri necessari	Pel diagnòstic de MF post-TE calen els 2 criteris necessaris i almenys 2 dels criteris addicionals
2. Biòpsia de moll d'os amb fibrosi grau 2 o 3	Criteri necessari	
3. Anèmia amb un descens de la concentració de Hb de $>20g/L$	Criteri addicional	
4. Quadre leucoeritroblàstic	Criteri addicional	
5. Aparició d'esplenomegàlia palpable o increment $>5cm$ de la ja coneguda	Criteri addicional	
6. Aparició d'almenys 2 dels següents símptomes: pèrdua de $>10\%$ del pes en 6 mesos, sudoració nocturna o febre inexplicable ($>37.5^{\circ}C$)	Criteri addicional	

Abreviacions: MF post-TE, mielofibrosi post-trombocitèmia essencial; ICC, *International Consensus Classification*; TE, trombocitèmia essencial; Hb, hemoglobina. Taula adaptada de: Gianelli et al. *Virchows Arch.* 2023;482(1):53-68 (7).

La biòpsia de moll d'os juga un paper clau en el diagnòstic de la TE, ja que permet fer el diagnòstic diferencial amb altres NMP, sobretot la PV emmascarada (48) i la MFP pre-fibròtica (49–51), que poden cursar amb quadres clínics indistingibles. La histopatologia en la TE es caracteritza per un moll d'os generalment normocel·lular o, ocasionalment, amb cel·lularitat mínimament incrementada, i amb una sèrie vermella i granulocítica

amb troballes dins de la normalitat. Destaca un increment proporcional dels megacariòcits, que són de mida gran o molt gran, amb nucli hiperlobulat i citoplasma abundant i madur, sense atípies. Aquests poden formar grups laxos i hi pot haver cert grau de fibrosi (màxim grau 1) (7,50). A la *Figura 6* es mostren imatges típiques d'una biòpsia de moll d'os en un pacient amb TE.

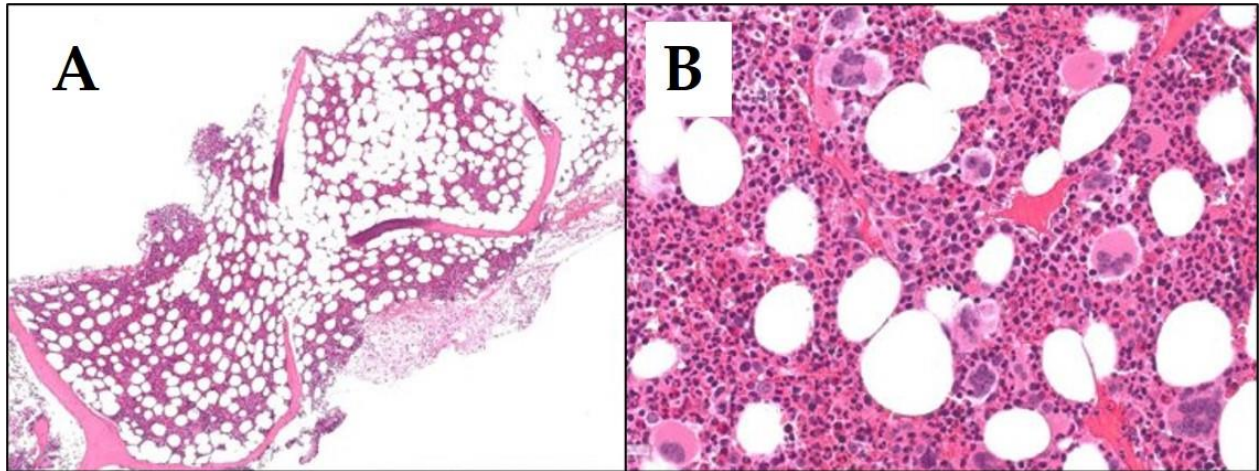


Figura 6. Histopatologia en la trombocitèmia essencial

Biòpsia de moll d'os amb tinció amb hematoxilina-eosina d'un cas amb diagnòstic de trombocitèmia. A la imatge A (4x) veiem un moll d'os normocel·lular, amb proporció de greix conservada i a la imatge B (20x) un increment dels megacariòcits, que són de mida gran i amb nucli hiperlobulat. *Imatges cortesia de la Dra. Maria Rozman en mostres propietat de l'Hospital Clínic de Barcelona.*

1.5.3. Característiques clíniques i criteris diagnòstics de la MFP i de la MFP pre-fibròtica

Pel que fa a la MFP, també hi ha dues fases ben definides: la MFP pre-fibròtica i la MFP establerta (7). Els criteris per cada una de les entitats en la publicació de la ICC es troben a la *Taula 6* i a la *Taula 7*.

La MFP pre-fibròtica és una fase precoç de la malaltia i sol afectar a persones més joves. Entre el 30 i el 40% dels pacients es troben asimptomàtics. La simptomatologia més habitual és el quadre constitucional, que està present en aproximadament el 20% dels

casos (52). Les alteracions analítiques característiques són anèmia lleu, amb leucocitosi i/o trombocitosi de grau variable, que solen acompanyar-se d'una elevació de la lactat deshidrogenasa (LDH). L'esplenomegàlia s'observa en la majoria dels pacients, però sol ser discreta (7,52). Com ja s'ha comentat, en els casos amb trombocitosi aïllada el diagnòstic diferencial amb la TE és fonamental (50).

Taula 6. Criteris pel diagnòstic de la MFP pre-fibròtica segons la ICC (2022)

1. Biòpsia de moll d'os amb proliferació i atípia megacariocítica (megacariòcits de mides variables, amb nuclis amb núvol o hipercromàtics i amb constitució de grups densos). Fibrosi inferior a grau 2. Cel·lularitat incrementada amb proliferació granulocítica	Criteri major	Pel diagnòstic de MFP pre-fibròtica cal el compliment dels 3 criteris majors i almenys 1 dels menors
2. Mutacions a JAK2, CALR o MPL; o bé presència d'un altre marcador clonal; o bé descartar l'origen reactiu de la fibrosi medul·lar	Criteri major	
3. Diagnòstic d'exclusió: cal descartar la LMC, la PV, la TE, la SMD i altres neoplàsies mieloides	Criteri major	
4. Anèmia persistent no atribuïble a altres causes	Criteri menor	
5. Leucocitosi persistent $\geq 11 \times 10^9/L$	Criteri menor	
6. Esplenomegàlia palpable	Criteri menor	
7. Elevació de la LDH persistent	Criteri menor	

Abreviacions: MFP, mielofibrosi primària; ICC, *International Consensus Classification*; LMC, leucèmia mioide crònica; PV, policitemia vera; TE, trombocitèmia essencial; SMD, síndrome mielodisplàstica; LDH, lactat deshidrogenasa. *Taula adaptada de: Gianelli et al. Virchows Arch. 2023;482(1):53-68 (7).*

En la MFP establerta, en canvi, més del 95% dels pacients presenten algun tipus de simptomatologia, essent l'astènia una constant en gairebé tots els casos (45). El quadre constitucional és habitual (30-40% dels pacients), però també poden aparèixer dolors

ossis, febre, caquèxia o complicacions trombohemorràgiques (7,52). Les organomegàlies s'observen en més del 80% dels casos i poden arribar a ser molt marcades (43,52,53). A nivell analític, l'anèmia és molt freqüent i sol ser més pronunciada que en la fase pre-fibròtica. Tot i que els pacients poden presentar leucocitosi i trombocitosi, no són inhabituals la leucopènia i la trombocitopènia, que es poden veure en el 15-20% dels casos (52). L'elevació de la LDH i el quadre leucoeritroblàstic també són característics i formen part dels criteris diagnòstics menors de l'entitat (7).

Taula 7. Criteris pel diagnòstic de la MFP establerta segons la ICC (2022)

1. Biòpsia de moll d'os amb proliferació i atípia megacariocítica (megacariòcits petits o gegants, amb nuclis en núvol o hipercromàtics i amb constitució de grups densos), juntament amb fibrosi grau 2 o 3	Criteri major	Pel diagnòstic de MFP establerta cal el compliment dels 3 criteris majors i almenys 1 dels menors
2. Mutacions a JAK2, CALR o MPL; o bé presència d'un altre marcador clonal; o bé descartar l'origen reactiu de la fibrosi medul·lar	Criteri major	
3. Diagnòstic d'exclusió: cal descartar la LMC, la PV, la TE, la SMD i altres neoplàsies mieloides	Criteri major	
4. Anèmia persistent no atribuïble a altres causes	Criteri menor	
5. Leucocitosi persistent $\geq 11 \times 10^9/L$	Criteri menor	
6. Esplenomegàlia palpable	Criteri menor	
7. Elevació de la LDH persistent	Criteri menor	
8. Quadre leucoeritroblàstic	Criteri menor	

Abreviacions: MFP, mielofibrosi primària; ICC, *International Consensus Classification*; LMC, leucèmia mieloide crònica; PV, policitèmia vera; TE, trombocitèmia essencial; SMD, síndrome mielodisplàstica; LDH, lactat deshidrogenasa. *Taula adaptada de: Gianelli et al. Virchows Arch. 2023;482(1):53-68 (7).*

Tant en la MFP pre-fibròtica com en l'establerta, la biòpsia de moll d'os és una peça clau per arribar al diagnòstic (50). En la MFP pre-fibròtica és característic trobar un moll d'os hipercel·lular amb una sèrie granulocítica prominent, la qual mostra desviació a l'esquerra. Els megacariòcits es troben de manera invariable incrementats, tenen un aspecte pleomòrfic i mostren atípies (nuclis en núvol i amb formes estranyes). A més, es distribueixen formant grups densos, sense hematopoesi entre ells. La fibrosi es troba absent o, com a màxim, es pot veure en grau 1 (7,50,54). En el cas de la MFP establerta, les troballes són variables, ja que depenen del moment evolutiu de la malaltia. El grau de cel·lularitat canvia amb el temps: en estadis inicials sol estar incrementada i va disminuint progressivament, a mesura que la fibrosi avança i substitueix l'hematopoesi. És característica la disminució proporcional de la sèrie vermella. La dilatació dels sinusoides, l'aparició d'hematopoesi intrasinusoïdal i, en estadis finals, la substitució del teixit hemopoètic per neoformació òssia (osteosclerosi) també són troballes típiques de l'entitat (7,43,54). És fonamental pel diagnòstic la presència de fibrosi medul·lar en almenys grau 2 (55). A la *Figura 7* es poden veure imatges de les troballes característiques a la biòpsia de moll d'os per cada un dels tipus de MFP. En el cas de la MF post-PV i MF post-TE les troballes esperades són les mateixes que en la MFP establerta (7).

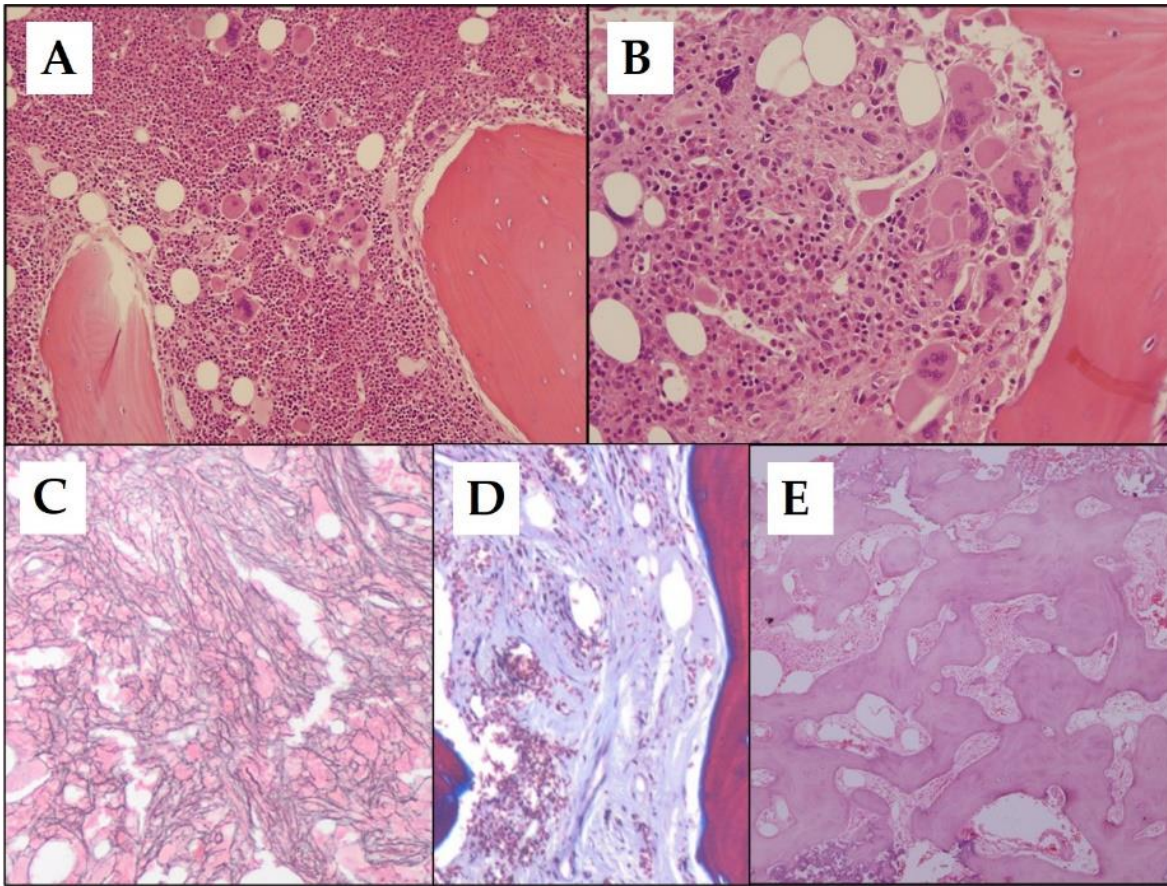


Figura 7. Histopatologia en la mielofibrosi

Imatges de biòpsia de moll d'os amb troballes típiques de mielofibrosi. Imatges A (10x) i B (40x) amb tinció amb hematoxilina eosina, on s'observa hipercel·lularitat amb megacariòcits atípics, que formen grups densos. La imatge C (20x) mostra una tinció de reticulina, on s'observa fibrosi medul·lar grau 2. La imatge D (20x) mostra una tinció amb tricròmic de Masson, on s'observa fibrosi col·làgena. La imatge E mostra un cas amb osteosclerosi, una situació de malaltia molt avançada, en la qual s'ha perdut pràcticament tot el teixit hematopoètic medul·lar. *Imatges cortesia de la Dra. Maria Rozman i de l'autora en mostres propietat de l'Hospital Clínic de Barcelona.*

1.6. El perfil genòmic de les NMP

El paisatge molecular de les NMP va més enllà de les mutacions *driver*. Una revisió publicada recentment (56) proposa dividir les alteracions moleculars que es troben en les NMP en dos grups: les mutacions "*disease driver*" i les "*clonal driver*". Les "*disease driver*" són les que afecten als gens de *JAK2*, *CALR* i *MPL* i són responsables del fenotip

de proliferació hematopoètica característic. Les cèl·lules que presenten aquestes mutacions són capaces de generar una NMP en models animals (57). Les “*clonal driver*”, en canvi, no són capaces per si mateixes de generar el fenotip de NMP en humans ni en models animals però, si es combinen amb les mutacions “*disease driver*”, poden modificar-ne el fenotip i l’evolució. En els estudis genòmics en NMP que inclouen un major nombre de pacients, s’ha vist que al voltant del 55% de les NMP presenten mutacions “*clonal driver*” addicionals a les “*disease driver*”. El nombre de mutacions “*clonal driver*” varia en funció del tipus de NMP, essent més alt en la mielofibrosi (on es troben en el 70-80% dels casos) i més baix en la PV i la TE (20-30% dels casos) (14).

1.6.1. Les mutacions “*clonal driver*” en les NMP

Les mutacions addicionals a la *driver* són variants patogèniques/probablement patogèniques que es detecten en les NMP però no en són exclusives, ja que són comunes amb altres neoplàsies mieloides (58,59) i poden trobar-se en contextos no neoplàstics o pre-malignes, com és el cas de la CHIP o la citopènia clonal de significat incert (CCUS, de l’anglès *clonal cytopenia of unknown significance*) (60,61).

En les NMP, els gens més freqüentment mutats són els modificadors epigenètics *TET2*, *ASXL1* i *DNMT3A*, trobant-se variants patogèniques/probablement patogèniques en el 5-15% dels casos (14,15,62). Altres gens recurrentment mutats i que es troben, cada un d’ells, present en l’1-3% dels casos són *CBL*, *PPM1D*, *SF3B1*, *NFE2*, *EZH2*, *U2AF1* i *ZRSR2* (14). Tampoc són inhabituals les anomalies cromosòmiques, essent les més freqüents aquelles que afecten a 20q, en forma de deleció, i al cromosoma 9, amb pèrdua d’heterozigositat (14,15). Les disrupcions de *TP53* són poc freqüents en els pacients amb PV/TE (<2%) però són més habituals en fenotipus més agressius de NMP, com és la

mielofibrosi (5%) i, sobretot, en la transformació a LMA, en la qual poden estar presents en el 16-50% dels casos (56).

Tot i que els pacients poden adquirir noves mutacions “*clonal driver*” durant l’evolució de la malaltia, sembla que en general s’adquireixen de manera precoç (62) i que el perfil genòmic es manté bastant estable durant l’evolució (15). Així i tot, aquestes mutacions poden expandir-se en moments determinats de la malalta, i contribuir al canvi de fenotip de la NMP. Un treball publicat recentment indica que l’arquitectura clonal, és a dir, tant l’ordre en què s’han adquirit les mutacions “*clonal driver*” respecte a la “*disease driver*” com si aquestes es troben en el mateix clon o en clons separats tenen influència en l’evolució clínica i el pronòstic de les NMP amb mutació de *JAK2 V617F* (63).

Diverses investigacions han avaluat l’impacte pronòstic de les mutacions “*disease driver*” en les NMP (14,15,64,65). En aquest sentit, les mutacions de *TP53*, *RUNX1*, *NFE2*, *U2AF1*, *SRSF2*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1* i *EZH2* s’ha vist que impacten de manera negativa el pronòstic de la malaltia, sigui quin sigui el tipus de NMP. Addicionalment, la mutació de *SF3B1* també podria tenir un impacte negatiu, però no s’ha demostrat de manera persistent en tots els subtipus de NMP.

1.6.2. La classificació genòmica de Grinfeld de les NMP

Una de les publicacions més importants dels últims anys en el camp de les NMP és el treball de Grinfeld et al., publicat l’any 2018 (14). És la investigació en NMP que inclou informació genòmica més enllà de les mutacions *driver* amb un nombre més gran de casos, en total 2035 pacients: 1321 TE, 356 PV, 309 MF i 49 NMP amb altres diagnòstics. Aquesta publicació proposa una classificació genòmica jeràrquica, que es basa en un algoritme, el qual conté 8 categories diagnòstiques. En aquesta classificació, aquelles alteracions cromosòmiques i moleculars que s’associen a un pitjor pronòstic, en primer

lloc les disrupcions de *TP53* i l'aneuploidia (categoria 1), seguides de les anomalies en gens de cromatina o *splicing* (categoria 2, i que inclou aberracions a *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *PHF6*, *CUX1*, *ZRSR2*, *SRSF2*, *U2AF1*, *KRAS*, *NRAS*, *GNAS*, *CBL*, *RUNX1*, *STAG2*, *BCOR* i pèrdua d'heterozigositat de 7p o 4q i monosomia del cromosoma 7), prevalen a les mutacions *driver*. Les categories 3 a 6 són aquelles en què el pronòstic i fenotipus de la malaltia ve determinat per la mutació *driver* (*CALR*, *MPL* i *JAK2*), separant aquells casos amb mutació de *JAK2* en funció de si es troba en homozigosi o en heterozigosi, cosa rellevant, ja que la pèrdua d'heterozigosi o l'increment de la VAF de *JAK2* s'ha associat en múltiples ocasions a mal pronòstic o progressió de la malaltia (62,66). Finalment, les categories 7 i 8 són aquelles que no mostren cap variant inclosa en les anteriors, presentant una altra mutació *driver* o cap mutació coneguda, respectivament. Aquestes últimes categories es denominen sota del concepte de "mieloproliferació" per distingir-les de les altres categories on s'utilitza el terme NMP. Una adaptació de l'algoritme es pot veure en la *Figura 8*. Les categories que engloben un major nombre de pacients són la 2, la 3 la 5 i la 6 i cada una d'elles es troba enriquida amb un tipus concret de NMP; la categoria 2 mostra predomini de MF, la categoria 3, de TE, la categoria 5, de PV i la categoria 6 mostra una proporció elevada tant de TE com de PV. La *Figura 9* mostra les proporcions de cada categoria genòmica en funció del tipus de NMP. Tot i que aquesta classificació integra la informació genòmica de manera eficient i ha demostrat tenir significat pronòstic, de moment ha estat poc implementada en l'estudi genòmic i la classificació de les NMP.

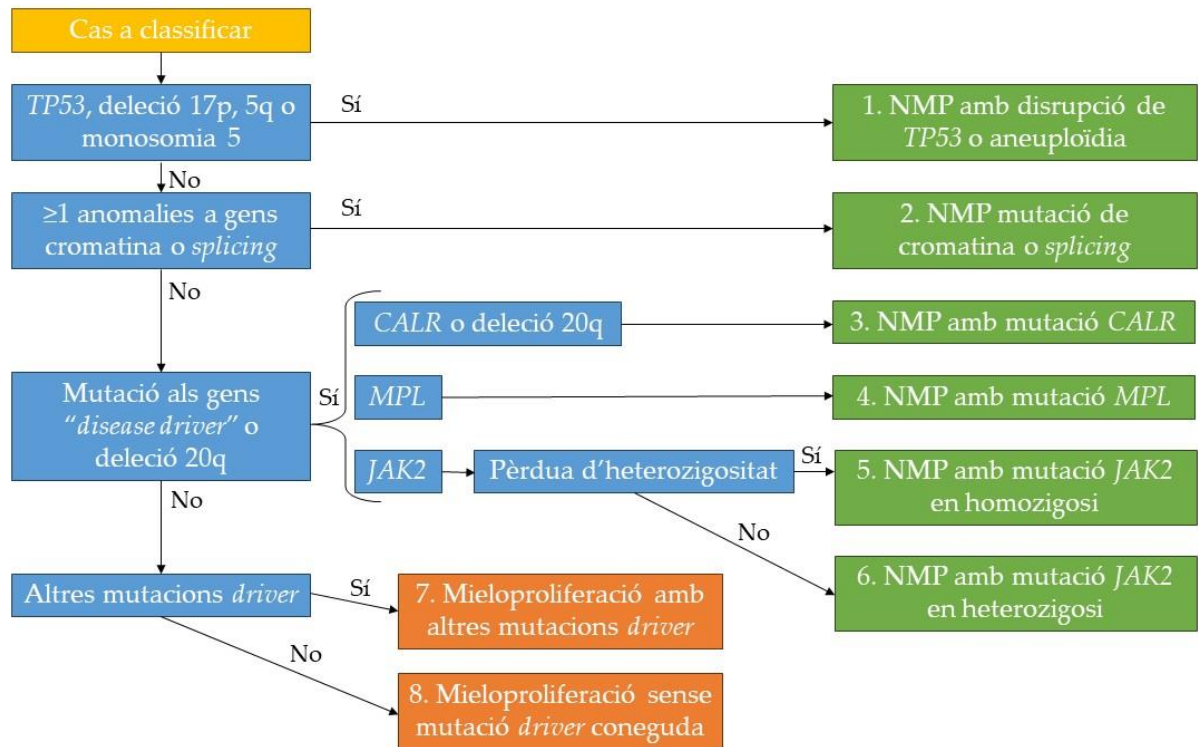


Figura 8. Algoritme de Grinfeld

Algoritme per a la classificació genòmica de les neoplàsies mieloproliferatives. Figura adaptació de: Grinfeld et al. *N Engl J Med.* 2018;379(15):1416-30 (14).

1.6.3. El perfil genòmic de la MFP i la MFS

La MF és la NMP amb el perfil genòmic més complex, tant si és primària com secundària. Així i tot, hi ha diversos treballs que indiquen que es tracta d'entitats amb *backgrounds* moleculars diferenciats, troballa esperable, ja que són malalties amb un origen cronològic diferent. Un treball publicat per Courtier et al. l'any 2019 (67) indica que, tot i que el nombre de mutacions addicionals entre la MFP i la MFS podria ser similar, la distribució dels gens mutats és diferent en cada una de les entitats. En concret, les mutacions en gens de *splicing* probablement són més freqüents en la MFP, amb predomini de les mutacions a *SRSF2* i a *U2AF1*, mentre que les mutacions a *ZRSR2* són més freqüents en la MFS. Les mutacions a *ASXL1* també semblen presentar una

major prevalença en la MFP, mentre que les de *TP53* semblen predominar en la MFS. Aquestes troballes són congruents amb treballs publicats posteriorment (68,69). Les mutacions a la via de RAS podria tenir major prevalença en la MFP que en la MFS (68).

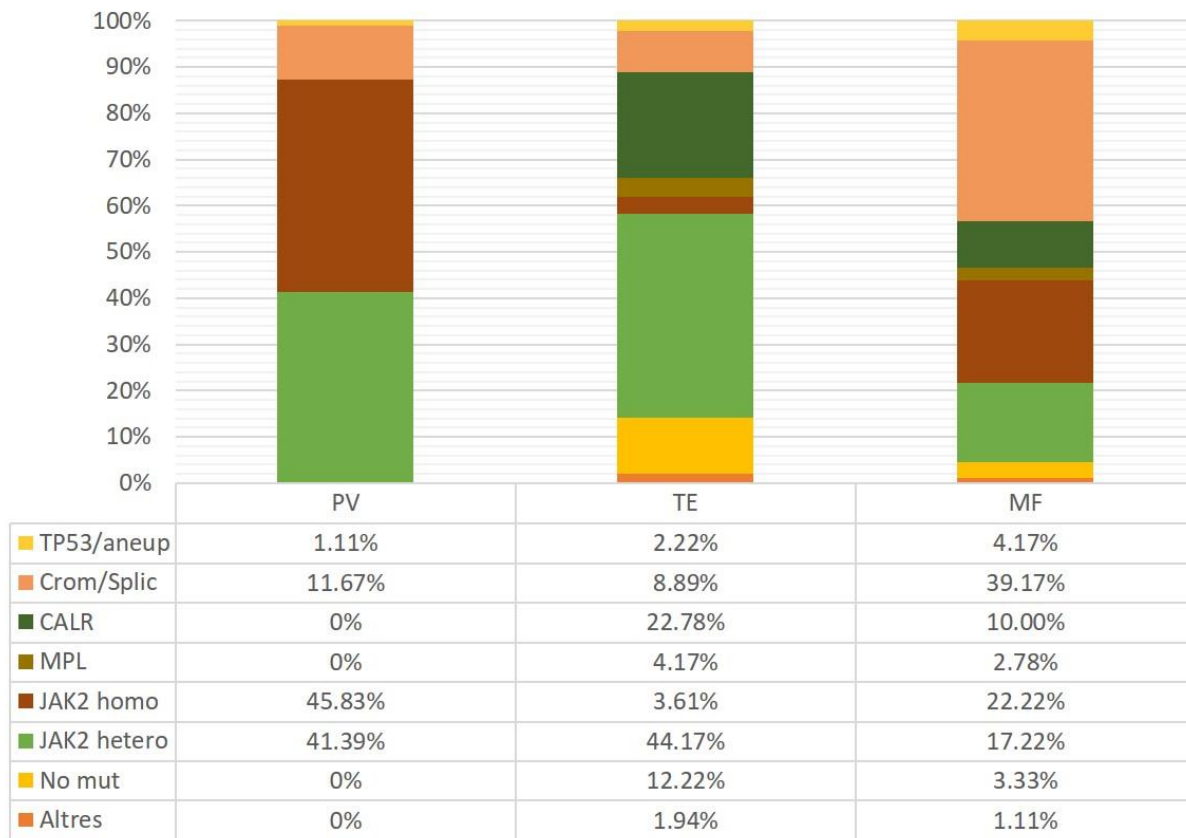


Figura 9. Proporcions de les categories genòmiques de Grinfeld en cada una de les NMP

En aquesta figura es representa la proporció de pacients en cada categoria genòmica segons el tipus de NMP en els pacients inclosos a l'article de Grinfeld et al. S'observa que la categoria de NMP amb disrupció de *TP53* o aneuploïdia va ser poc freqüent en les tres entitats. En la PV, la categoria més habitual va ser NMP amb *JAK2* en homozigosi; en la TE, la més habitual va ser NMP amb *JAK2* en heterozigosi; en canvi, en la MF, es va veure un predomini clar de la categoria NMP amb mutació de cromatina o *splicing*.

Abreviacions: PV, policitemia vera; TE, trombocitèmia essencial, MF; mielofibrosi; TP53/aneup, NMP amb disrupció de *TP53* o aneuploïdia; Crom/Splic, NMP amb mutació de cromatina o *splicing*; CALR, NMP amb mutació de *CALR*; MPL, NMP amb mutació de *MPL*; JAK2 homo, NMP amb mutació de *JAK2* en homozigosi; JAK2 hetero, NMP amb mutació de *JAK2* en heterozigosi; No mut, mieloproliferació sense mutació *driver* coneguda; Altres, mieloproliferació sense mutació *driver* coneguda. La figura és original de l'autora, a partir d'informació extreta del material suplementari de: Grinfeld et al. *N Engl J Med.* 2018;379(15):1416-30 (14).

El significat pronòstic de les mutacions addicionals s'ha estudiat de manera àmplia a la MFP però, en canvi, no és tan clar a la MFS, ja que aquests casos es troben exclosos de molts estudis que contenen informació genòmica extensa. A la MFP, les mutacions que es consideren de pronòstic advers, i que afecten a *IDH1*, *IDH2*, *EZH2*, *SRSF2*, *U2AF1* i *ASXL1*, es troben incloses en els sistemes de puntuació pronòstics acceptats a nivell internacional (MIPSS70 i MIPSS70+) (70–72). Addicionalment, altres mutacions s'han associat a pronòstic advers, com són les mutacions de la via de RAS (*CBL*, *NRAS* i *KRAS*) (73,74) i a *TP53* (74,75). En estudis que inclouen casos amb MFS, s'ha confirmat el pronòstic advers de les mutacions a *TP53*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1*, *CBL*, *KRAS* i *NRAS* a la MFS (14,68).

Tot i haver-se considerat una mutació amb pronòstic advers, el valor de *ASXL1* es troba en entredit actualment. Un estudi del grup francès publicat l'any 2021 (68), el qual inclou casos de MFP i MFS, identifica la mutació de *ASXL1* com un element habitual i precoç en el desenvolupament molecular de la malaltia; així i tot, conclouen que és insuficient *per se* per conferir mal pronòstic. En el treball indiquen que, en canvi, sí que pren valor pronòstic desfavorable si es troba conjuntament amb altres alteracions moleculars d'alt risc. Per altra banda, una investigació del grup italià (69) identifica les mutacions de *ASXL1* com un factor de risc advers independent en la MFP, que no es manté en la MFS. Finalment, un treball recent centrat en la MFP posa l'èmfasi de l'impacte pronòstic de *ASXL1* en la seva VAF, i apunta que només aquelles mutacions amb una VAF >20% podrien tenir un impacte pronòstic negatiu en la MFP (75).

1.7. Les NMP i la trombosi

La susceptibilitat pel desenvolupament de fenòmens trombòtics en els pacients amb NMP s'ha estudiat de manera àmplia i els fenòmens cardiovasculars, tant venosos com

arterials, són una de les causes principals de mortalitat en aquests individus (76,77). A la PV, la incidència de fenòmens trombòtics mortals i no mortals es troba al voltant de 1.5% i 3.8% anual, respectivament, essent la causa cardiovascular responsable del 40% de les morts en global (76). Per una altra banda, la incidència de fenòmens trombòtics és similar en la TE i la MFP, trobant-se en el 2% i el 4% anual en trombosi mortal i no mortal, respectivament (78,79). A la PV, la incidència de fenòmens trombòtics venosos i arterials és similar (76), mentre que a la TE els fenòmens arterials són entre 2 i 3 vegades més freqüents que els venosos (78). Així i tot, sembla que la incidència de fenòmens arterials en les NMP és propera a la població general, mentre que la probabilitat de trombosi venosa és més elevada, tant a la PV com a la TE (76,80). Els fenòmens trombòtics tenen tendència a ocórrer de manera precoç en el curs de la malaltia, tant abans del diagnòstic com poc després (81); una meta-anàlisi ha posat de manifest que al voltant d'un 20% de les NMP debuten amb un fenomen trombòtic, essent més habitual en el cas de la PV (82).

El desenvolupament de fenòmens trombòtics en les NMP té una fisiopatologia complexa, que depèn de múltiples factors, com són com l'edat, el sexe, els factors de risc cardiovascular, la fibril·lació auricular o la teràpia hormonal (77,81). L'edat hi té un paper clau i, en pacients joves, són més habituals les trombosis venoses, mentre que, en pacients d'edat avançada, hi ha un predomini clar de trombosis arterials (81). Un dels factors que contribueix en major mesura a la trombosi, sobretot a la PV, és l'increment de la massa eritrocitària, però anomalies quantitatives i qualitatives en les plaquetes i els leucòcits també hi participen significativament (83). Un treball observacional prospectiu publicat recentment a partir de dades de pacients amb PV diagnosticats als Estats Units identifica la leucocitosi $>12 \times 10^9/L$ com un factor de risc pel desenvolupament de fenòmens trombòtics, en pacients amb un bon control de l'hematòcrit (84).

L'estat protrombòtic dels pacients amb NMP es troba relacionat amb un procés inflamatori, que implica nivells elevats de proteïna C reactiva i interleucina-6, agents coneguts que participen en el procés d'arterioesclerosi (81,85). En les NMP, les cèl·lules sanguínies passen per un procés d'activació, que inclou la secreció de citocines i l'expressió de molècules d'adhesió. Aquests canvis també afecten a l'endoteli, que respon a citocines, a la hiperviscositat i a proteases secretades pels leucòcits. En conseqüència, s'afavoreix l'adhesió de les cèl·lules sanguínies a la paret vascular, cosa que facilita l'activació de la cascada de la coagulació, amb el dipòsit de fibrina (77). Recentment, s'ha identificat l'índex neutròfil/limfòcit, un marcador d'inflamació en què es divideix el recompte de neutròfils a la sang perifèrica pel de limfòcits, com un bon predictor de trombosi venosa a la PV (86). Concretament, s'ha vist que un índex neutròfil/limfòcit superior a ≥ 5 és un predictor independent pel desenvolupament de trombosis venoses majors.

1.7.1. El perfil molecular de les NMP i el risc trombòtic

La mutació de *JAK2* V617F té un paper clau en el desenvolupament de fenòmens trombòtics i el procés inflamatori associat, tant en les NMP com en contextos no neoplàstics tipus CHIP (81,87,88). A la TE, la presència de la mutació de *JAK2* V617F és un factor de risc trombòtic a l'escala de puntuació utilitzada habitualment (IPSET, de l'anglès *International Prognostic Score for Thrombosis in Essential Thrombocythemia*) (89). A la PV, s'ha vist que la freqüència al·lèlica de *JAK2* V617F té rellevància pel que fa al risc trombòtic, essent 4 vegades més alt en aquells pacients que tenen una VAF $\geq 50\%$, incrementant principalment el risc de desenvolupar trombosis venoses (90,91). En el context de CHIP, la presència de *JAK2* V617F s'ha associat a més risc trombòtic en diversos treballs, tant arterial com venós (21,60,92); això contrasta amb el CHIP de

CALR que, tot i que s'associa a valors de plaquetes més elevats, no mostra una associació clara amb els fenòmens trombòtics (92). Aquesta troballa reforça el paper de *JAK2 V617F* en la fisiopatologia de la trombosi, més enllà de la modificació dels valors analítics.

Alguns treballs han explorat el rol de les mutacions addicionals en els esdeveniments trombòtics. Una investigació de l'any 2020 publicada a *Cancers* (93) va identificar les mutacions a *DNTM3A*, *TET2* i *ASXL1* (gens anomenats conjuntament DTA), amb pes sobretot de les mutacions a *TET2*, com a factor de risc pel desenvolupament de trombosi en la PV, sense trobar dades concloents en TE i MFP. Una publicació de Pasquer et al. a *Leukemia* (94) va identificar les mutacions a *TET2* i *DNTM3A*, com a factor de risc independent pel desenvolupament de trombosis arterials en les NMP, mentre que l'alta càrrega mutacional de *JAK2* definida amb una VAF $\geq 50\%$ es va associar a un major risc de trombosi venosa, sense identificar cap altra alteració molecular que conferís un risc independent de trombosi venosa. La presència de mutacions en els gens DTA ja s'havia associat amb anterioritat a patologia cardiovascular en el context de CHIP (60).

1.7.2. Les NMP i la trombosi esplènica

La susceptibilitat a la trombosi en les NMP pot donar lloc a fenòmens trombòtics en territoris inusuals, com és el territori esplènic, que poden afectar a les venes porta, hepàtica, esplènica o mesentèriques (95). En aquest sentit, les NMP i la presència de *JAK2 V617F* són de les causes més habituals de trombosi venosa esplènica (TVE), en el context d'un fetge no cirròtic i no tumoral. En una meta-anàlisi que va incloure a 1062 pacients amb síndrome de Budd-Chiari (oclusió parcial o total del flux venós hepàtic de sortida) i 855 amb trombosi portal, es va identificar el diagnòstic de NMP en 41% i 32% dels casos, respectivament (96). La prevalença de la TVE dins de les NMP sembla estar

al voltant del 5-10% en la PV i la TE, essent més infreqüent en la MFP, on podria trobar-se propera a l'1% (97-99).

En aproximadament el 50% dels pacients amb TVE i NMP, la TVE es produeix en el moment del diagnòstic de la NMP, en el 20% la TVE precedeix el diagnòstic i en el 30% restant, la TVE es produeix durant l'evolució (100,101). És conegut que els pacients amb NMP i TVE tenen unes característiques demogràfiques concretes que, a més, probablement són específiques d'aquells pacients en els quals la TVE coincideix o precedeix el diagnòstic de NMP: presenten una mitjana d'edat uns 20 anys inferior a la resta de NMP i hi ha predomini del sexe femení, sobretot en el cas de PV (100-105). A més, el diagnòstic més freqüent sol ser la PV (100,106). La fisiopatologia per la qual aquests pacients desenvolupen una TVE no és ben coneguda del tot (95,98).

Les característiques clíniques i analítiques dels pacients amb NMP i TVE també són diferents de les que presenten els pacients amb NMP sense TVE. Aquells que desenvolupen una TVE tenen més probabilitat de presentar esplenomegàlia o una trombosi venosa profunda (TVP) (101), mentre que tenen una menor prevalença de factors de risc cardiovascular i de trombosis arterials (102). A nivell analític, les NMP amb TVE, especialment les que debuten amb la TVE, mostren una menor expressió de la NMP en el seu hemograma, amb valors d'hemoglobina, hematòcrit i plaquetes més propers a la normalitat (101,102,105). Tot i que s'ha suggerit la hipòtesi de que aquestes diferències en l'hemograma podrien estar associades als canvis dilucionals i a la ferropènia que mostren els pacients amb TVE degut a la malaltia hepàtica, es desconeix si altres factors relacionats directament amb la seva NMP podrien tenir-hi influència (95).

Des del punt de vista molecular, les NMP amb TVE presenten unes característiques concretes: hi ha un predomini de la mutació de *JAK2* V617F, que es troba present en un 90-95% dels casos, independentment del tipus de NMP (102,103,106,107). A més, *JAK2*

V617F sol estar present amb una VAF més baixa, si es compara amb la resta de NMP (101,106).

En relació a la supervivència dels pacients amb NMP i TVE, els estudis han mostrat resultats heterogenis, probablement perquè s'han comparat freqüentment amb NMP sense tenir en compte les característiques demogràfiques específiques de les NMP amb TVE (100,102). En aquesta direcció, una publicació dins del grup espanyol va evidenciar que els pacients amb PV o TE que debuten amb TVE tenen una supervivència escurçada, si es comparen amb altres NMP, ajustant per edat i sexe (102). A més, es va veure que aquesta reducció en la supervivència era deguda, fonamentalment, a complicacions relacionades amb la malaltia hepàtica desenvolupada arran de la TVE, mentre que la probabilitat de progressió de la NMP en aquells que debutaven amb TVE era molt baixa (102).

1.8. Fonamentació dels estudis realitzats

Tot i els avenços científics, dins les NMP, hi segueixen havent moltes preguntes en l'àmbit genòmic sense respondre. Aquest problema afecta principalment a aquelles situacions clíniques menys habituals, ja que sovint aquests pacients queden exclosos dels estudis o queden diluïts en grups més grans que no representen les seves peculiaritats. A més, la classificació de Grinfeld, tot i mostrar una capacitat pronòstica elevada, pràcticament no s'ha aplicat en altres treballs genòmics en NMP.

En les NMP amb TVE, pràcticament no hi ha treballs que portin a terme una caracterització completa més enllà de les mutacions *driver* i, a part del treball del grup espanyol comentat amb anterioritat, no hi ha publicacions que facin una comparativa amb altres NMP, ajustant per les característiques demogràfiques ni fent una separació

en funció de la cronologia de la TVE. Pel que fa a la MF, la majoria de treballs estan centrats en la MFP i, si inclouen pacients amb MFS, no solen fer una distinció entre la MF post-PV i la MF post-TE.

La principal motivació dels nostres treballs ha estat participar en ampliar el coneixement genòmic de les NMP, especialment aquelles en situacions menys habituals i poc representades, enfocant-nos en el valor pronòstic de les dades genòmiques en conjunt.

2. Hipòtesis

Les hipòtesis de la tesi s'enumeren a continuació:

1. Els pacients amb una neoplàsia mieloproliferativa que debuten amb una trombosi venosa esplàcnica tenen un perfil genòmic diferent d'aquells pacients amb una neoplàsia mieloproliferativa que no debuten amb una trombosi venosa esplàcnica, i que tenen la mateixa edat, sexe i tipus de neoplàsia mieloproliferativa. Aquest perfil genòmic diferent implica una complexitat genòmica menor, amb una freqüència al·lèlica de *JAK2* més baixa i una menor prevalença d'alteracions genòmiques d'alt risc. Això significa que aquest grup es troba enriquit amb casos dins la categoria neoplàsia mieloproliferativa amb mutació de *JAK2* en heterozigosi.
2. Els pacients amb una neoplàsia mieloproliferativa que debuten amb trombosi venosa esplàcnica presenten una supervivència més curta que els pacients amb una neoplàsia mieloproliferativa sense trombosi venosa esplàcnica. L'escurçament de la supervivència es troba relacionat amb la malaltia hepàtica i l'elevat risc trombòtic i, en canvi, el risc de mort per progressió de la neoplàsia mieloproliferativa és molt baix.
3. La mielofibrosi primària mostra una proporció de mutacions addicionals a la *driver* més alta que la mielofibrosi secundària, que afecten sobretot a gens relacionats amb la cromatina o *splicing*, de manera que els casos es classifiquen majoritàriament com a neoplàsia mieloproliferativa amb mutacions de cromatina/*splicing*.
4. La mielofibrosi post-policitemia vera es troba enriquida amb casos de neoplàsia mieloproliferativa amb mutació de *JAK2* en homozigosi, essent l'increment

progressiu de la càrrega al·lèlica de *JAK2* el mecanisme principal de progressió en aquests pacients.

5. En la mielofibrosi post-trombocitèmia essencial, la majoria de pacients queden classificats dins de les categories de neoplàsia mieloproliferativa amb mutació de cromatina/*splicing*, neoplàsia mieloproliferativa amb mutació de *CALR* i neoplàsia mieloproliferativa amb mutació de *JAK2* en heterozigosi.

3. Objectius

Els objectius de la tesi s'enumeren a continuació:

1. Caracterització i classificació genòmica d'un grup ampli de pacients amb neoplàsia mieloproliferativa i trombosi venosa esplàcnica, separant els casos amb trombosi esplàcnica en funció de la seva cronologia: trombosi esplàcnica prèvia o concomitant al diagnòstic i trombosi esplàcnica evolutiva.
2. Comparació clínica, pronòstica i genòmica dels pacients amb una neoplàsia mieloproliferativa i trombosi esplàcnica prèvia/concomitant i els pacients amb una neoplàsia mieloproliferativa i trombosi esplàcnica evolutiva amb un grup control de neoplàsies mieloproliferatives sense trombosi esplàcnica, ajustat per sexe, edat, tipus de neoplàsia mieloproliferativa i tipus de mutació *driver*.
3. Dins dels pacients amb una neoplàsia mieloproliferativa que debuten amb trombosi esplàcnica, identificació dels perfils moleculars d'alt risc, que impliquen una probabilitat més alta de progressió de la malaltia i un major risc de fenòmens trombòtics.
4. Caracterització i classificació genòmica d'un grup ampli de pacients diagnosticats de mielofibrosi, incloent casos de mielofibrosi primària i secundària.
5. Comparació clínica, pronòstica i genòmica dels casos de mielofibrosi, separant els pacients en tres grups: mielofibrosi primària, mielofibrosi post-policitemia vera i mielofibrosi post-trombocitemia essencial.

4. Materials, mètodes i resultats

4.1. Primer treball

Títol: Classificació genòmica i pronòstic en pacients joves amb policitèmia vera i trombocitèmia essencial en funció de la presència de trombosi venosa esplàcnica i la seva cronologia

Resum:

Introducció: aproximadament el 5% de les neoplàsies mieloproliferatives (NMP) debuten amb una trombosi venosa esplàcnica. Aquests pacients solen ser més joves, presenten un hemograma amb valors més propers a la normalitat i una càrrega al·lèlica de *JAK2* més baixa que la resta de pacients amb NMP. Així i tot, el seu perfil genòmic no és ben conegut.

Objectiu: valorar les característiques clíniques i genòmiques d'una cohort de pacients amb policitèmia vera (PV), trombocitèmia essencial (TE) o NMP inclassificable (NMP-U) amb trombosi esplàcnica, separant els casos en funció de la cronologia de la trombosi. A més, fer una comparació clínica, pronòstica i genòmica amb un grup de PV i TE sense trombosi esplàcnica, que estigui ajustat per sexe i edat.

Mètodes: es van seleccionar 255 pacients amb diagnòstic de PV ($n=159$), TE ($n=75$) o NMP-U ($n=21$) i mutació de *JAK2*, dels quals 90 havien desenvolupat una trombosi esplàcnica: 59 coincident amb el debut de la NMP, 10 prèvia al diagnòstic i 21 durant l'evolució. Els 165 pacients restants van ser utilitats de control, i es van seleccionar ajustats per sexe, edat i tipus de NMP. Mitjançant un panell de NGS que inclou 30 gens recurrentment mutats en neoplàsies mieloides, es va realitzar una caracterització genòmica de tota la sèrie, tenint en compte les variants patogèniques/probablement

patogèniques amb una freqüència al·lèlica $\geq 1\%$. Amb l'aplicació de la classificació genòmica proposada per Grinfeld et al. (*N Engl J Med*, 2018), els casos es van classificar jeràrquicament en 4 categories genòmiques: NMP amb disrupció de *TP53*; NMP amb mutacions de cromatina/*splicing* (*EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *PHF6*, *CUX1*, *ZRSR2*, *SRSF2*, *U2AF1*, *KRAS*, *NRAS*, *GNAS*, *CBL*, *RUNX1*, *STAG2* i *BCOR*); NMP amb *JAK2* en homozigosi; i NMP amb *JAK2* en heterozigosi. Les tres primeres categories es van considerar d'alt risc molecular i l'última, de baix risc.

Resultats: la majoria dels pacients amb NMP i trombosi esplàcnica de debut corresponien a una NMP amb *JAK2* en heterozigosi (87% dels casos vs. 69% en el grup de PV/TE de control, $p < 0.05$), amb una càrrega al·lèlica de *JAK2* baixa ($< 50\%$) i sense mutacions addicionals d'alt risc. Tot i presentar aquesta complexitat genòmica menor, els pacients que debutaren amb trombosi esplàcnica van mostrar una mortalitat més elevada (HR 3.0, IC95% 1.5-6.0, $p = 0.003$) i una supervivència lliure d'esdeveniment més curta (HR 3.0, IC95% 1.9-4.8, $p < 0.001$) que els pacients del grup control sense trombosi esplàcnica. Els pacients amb NMP que presentaren trombosi esplàcnica durant l'evolució de la malaltia, en canvi, es van classificar més freqüentment en categories d'alt risc molecular, comparant amb aquells que debutaren amb trombosi esplàcnica (52% vs. 13%, $p < 0.05$).

En el grup de NMP amb trombosi esplàcnica al debut, els pacients en les categories d'alt risc molecular van mostrar un increment significatiu en el risc de presentar un nou fenomen trombòtic (HR 5.8, IC95% 1.4-24.0, $p = 0.01$). Per altra banda, la classificació genòmica va identificar amb precisió aquells pacients amb major risc de progressió de la malaltia a mielofibrosi o leucèmia aguda, mentre que la presència de mutacions a *DNMT3A*, *TET2* i *ASXL1* va permetre identificar aquells amb major risc de trombosi arterial.

Conclusions: les característiques clíniques i genòmiques dels pacients amb PV/TE que debuten amb trombosi esplàcnica són diferents d'aquells amb PV/TE de la mateixa edat i sexe però sense trombosi esplàcnica i d'aquells amb PV/TE amb trombosi esplàcnica evolutiva. La caracterització genòmica mitjançant NGS i la classificació molecular permet identificar bé aquells pacients amb major risc de re-trombosi i progressió de la malaltia.



Genomic classification and outcomes of young patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia according to the presence of splanchnic vein thrombosis and its chronology

Marta Garrote^{1,2,3} · Mónica López-Guerra^{2,3,4} · Juan Carlos García-Pagán^{3,4,5} · Eduardo Arellano-Rodrigo⁶ · Francisca Ferrer-Marín⁷ · Juan Carlos Hernández-Boluda⁸ · Beatriz Bellosillo^{4,9} · Meritxell Nomdedeu⁶ · Virginia Hernández-Gea^{3,4,5} · Ana Triguero¹⁰ · Francesca Guíjarro^{2,3} · José Álamo² · Anna Baiges^{3,4,5} · Fanny Turon^{3,4,5} · Dolors Colomer^{1,2,3,4} · Francisco Cervantes³ · Alberto Alvarez-Larrán^{3,10}

Received: 20 November 2023 / Accepted: 23 December 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

To elucidate the role of splanchnic vein thrombosis (SVT) and genomic characteristics in prognosis and survival, we compared patients with polycythemia vera (PV) or essential thrombocythemia (ET) presenting SVT at diagnosis ($n=69$, median age 43 years) or during follow-up ($n=21$, median age 46 years) to a sex- and age-matched control group of PV/ET without SVT ($n=165$, median age 48 years). The majority of patients presenting with SVT at diagnosis were classified as myeloproliferative neoplasm with heterozygous *JAK2* mutation (87% of cases vs. 69% in PV/ET control group, $p<0.05$), characterized by low *JAK2* allele burden and no high-risk mutations. Despite this lower molecular complexity, patients presenting with SVT showed a higher risk of death (HR 3.0, 95% CI 1.5–6.0, $p=0.003$) and lower event-free survival (HR 3.0, 95% CI 1.9–4.8, $p<0.001$) than age- and sex-matched PV/ET controls. In patients presenting with SVT, molecular high-risk was associated with increased risk of venous re-thrombosis (HR 5.8, 95% CI 1.4–24.0, $p=0.01$). Patients developing SVT during follow-up were more frequently allocated in molecular high-risk than those with SVT at diagnosis (52% versus 13%, $p<0.05$). In the whole cohort of patients, molecular classification identified PV/ET patients at higher risk of disease progression whereas *DNMT3A/TET2/ASXL1* mutations were associated with higher risk of arterial thrombosis. In conclusion, clinical and molecular characteristics are different in PV/ET patients with SVT, depending on whether it occurs at diagnosis or at follow-up. Molecular characterization by NGS is useful for assessing the risk of thrombosis and disease progression in young patients with PV/ET.

✉ Marta Garrote
garrote@clinic.cat

¹ Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

² Hematopathology Unit, Pathology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

³ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁴ Centro Investigación Biomédica en Red (CIBER) Oncología (CIBERONC) y Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain

⁵ Barcelona Hepatic Hemodynamic Lab, Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁶ Hemotherapy and Hemostasis Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁷ Hematology Department, Hospital Morales-Messeguer, Murcia, Spain

⁸ Hematology Department, Hospital Clínico-INCLIVA, Valencia, Spain

⁹ Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

¹⁰ Hematology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Abbreviations

VAF	variant allele frequency
MPN	myeloproliferative neoplasm
SVT	splanchnic vein thrombosis

Introduction

Individuals with myeloproliferative neoplasms (MPN), including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (MF), are at increased risk of thrombosis, which can involve unusual sites such as the splanchnic area [1–3]. Approximately 5% of MPN have splanchnic vein thrombosis (SVT) at presentation or during follow-up and it has been postulated that these patients have specific demographic and phenotypic features including younger age, female predominance and a milder hematological picture, with a complete blood count closer to normal values [4–6].

It has been suggested that MPN with SVT have a differentiated genomic background: more than 95% of MPN presenting with SVT harbor *JAK2* V617F regardless of MPN subtype. In addition, a lower allele frequency (VAF) of the driver mutation is described, if compared with MPN patients without SVT. However, whether these findings are associated with lower molecular complexity is not fully understood since studies including a comparison with age and sex-matched MPN patients and taking SVT chronology into account are lacking [5–7]. Moreover, contradictory results have been reported in relation to survival and disease progression of MPN patients with SVT due to design heterogeneity of published works, regarding type of underlying MPN, SVT chronology or control groups employed for comparison [4–6, 8, 9].

The aim of the present study is to assess clinical and molecular characteristics of a cohort of PV/ET with SVT taking into consideration chronology of SVT. For such purpose, main clinical outcomes and molecular data derived from targeted Next-Generation Sequencing (NGS) are compared with a sex- and age-matched PV/ET control group without SVT.

Methods

Patient selection and data collection

Ninety-seven patients with SVT were selected from a database of patients diagnosed with MPN in our institution (from 1995 to 2022). SVT patients with primary myelofibrosis ($n=3$), MPN without *JAK2* mutation ($n=3$) and patients with other diagnosis ($n=1$) were excluded due to

heterogeneity and low representation. The final number of MPN with SVT was 90. Selected cases did not have other factors that may explain predisposition to SVT before MPN diagnosis, such as liver cirrhosis, cancer, known thrombophilia or paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In relation to SVT chronology, in MPN with previous SVT, SVT developed at least 6 months before MPN diagnosis; and in MPN with SVT during follow-up, SVT occurred at least 6 months after MPN diagnosis.

A matched control group was constituted, including 1 or 2 *JAK2*-mutated MPN patients without SVT for every SVT case, with same sex, similar age at diagnosis (a maximum of a 5-year difference was allowed) and same MPN diagnosis (PV or ET). Cases presenting with SVT and diagnosed with MPN, unclassifiable (MPN-U), were matched with one PV case and one ET case. MPN-U cases without SVT are notably uncommon and typically exhibit distinct characteristics; hence, they were considered unsuitable for the matching. The final control group comprised 165 MPN patients without SVT. MPN diagnosis was established based on World Health Organization criteria (2016). Main clinical data at MPN diagnosis, including age, sex, cardiovascular risk factors and complete blood count, besides complications during evolution (thrombosis, bleeding and progression to myelofibrosis or acute leukemia) and status at last follow-up were collected. Signed informed consent according to local institutional review board requirements was obtained from all participants.

Molecular analysis

DNA from peripheral blood at diagnosis ($n=192$, 75%) or during follow-up ($n=63$, 25%) and stored in Biobank Hospital Clínic (R121004-094) was used. Targeted sequencing using a 32-gene customized commercial panel from Sophia Genetics was performed using Illumina MiSeq platform (see Supplemental Table S1). GRCh37 (hg19) was used as reference genome. Variant calling was performed using *SOPHiA DDM*TM. Only variants with a VAF $\geq 1\%$ were considered and classified based on information from databases (COSMIC, ClinVar, Seshat, Franklin and Varsome) and published works on myeloid neoplasms. Only pathogenic/likely pathogenic variants were taken into account for further analysis.

Subsequently, genomic classification proposed by Grinfeld et al. [10] – referred from this point as the Grinfeld algorithm – was applied to every case, according to mutational data. Briefly, patients were hierarchically allocated into four molecular subgroups: *TP53* disruption or aneuploidy (*TP53* mutation, Chr17pLOH or Chr5-/Chr5q-); ≥ 1 genetic aberrations in chromatin or spliceosome genes (*EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *PHF6*, *CUX1*, *ZRSR2*, *SRSF2*, *U2AF1*,

KRAS, *NRAS*, *GNAS*, *CBL*, Chr7/7qLOH, Chr4qLOH, *RUNX1*, *STAG2* and *BCOR*); homozygous *JAK2* mutation (allele frequency $\geq 50\%$ or Chr9pLOH, when available); and heterozygous *JAK2* mutation. Patients belonging to heterozygous *JAK2* mutation group were classified as molecular low-risk whereas patients allocated in the other three groups were considered as molecular high-risk. Pathogenic or likely pathogenic mutations in *DNMT3A*, *TET2* or *ASXL1* genes were defined as DTA mutations.

Statistical analysis

Qualitative variables were compared through Chi-squared test and quantitative variables through Student's t-test, Mann-Whitney U test or ANOVA. Overall survival and time-to-event curves were drawn using the method of Kaplan-Meier with log-rank test for comparisons. Event-free survival was calculated as time free of thrombosis, major bleeding, disease progression or death, whichever occurred first. Variables evaluated for their potential prognostic significance were age, sex, history of SVT, hematological values at diagnosis, genomic classification and DTA mutations. Multivariate analyses of the factors predicting the different outcomes were done by Cox regression. All statistical analyses were carried out with R and SPSS software.

Results

General characteristics

A total of 255 patients were included (PV, $n=159$; ET, $n=75$; MPN-U, $n=21$). Ninety patients developed SVT: 59 at MPN presentation, 10 before MPN diagnosis and 21 during follow-up. The remaining 165 patients were used as controls. Regarding SVT localization, in 58 patients (64%) affected the splenoportal area, 29 patients (32%) had Budd-Chiari syndrome, and in 3 patients (3%) comprehended both territories.

The main clinical and hematological features at diagnosis, according to the presence of SVT and its chronology, are shown in Table 1. There were no significant differences among cases and controls regarding age (median age at MPN diagnosis, 47 y-o) and sex (female sex, 56%), as groups were balanced on purpose. A higher proportion of patients with MPN-U were observed among MPN presenting with SVT. In such cases, a normal blood count was the reason to establish MPN-U diagnosis whereas in controls the small proportion of patients with MPN-U had phenotypic characteristics between PV and ET.

Patients presenting with SVT showed lower hemoglobin level and platelet count and higher frequency of

splenomegaly. Those with evolutive SVT showed similar clinical characteristics at diagnosis than PV/ET controls, except for higher frequency of splenomegaly ($p<0.0001$) (Table 1).

Molecular features and classification

The main molecular characteristics of the patients according to the presence of SVT and its chronology are shown in Table 2. *JAK2* V617F VAF was significantly different between groups (Fig. 1; Table 2). Patients presenting with SVT showed significant lower *JAK2* VAF than age- and sex-matched patients without SVT. Patients developing SVT during follow-up showed the highest *JAK2* VAF, with the differences being statistically significant in comparison with patients presenting with SVT but not with those without SVT (Fig. 1; Table 2).

There were no significant differences in the number of pathogenic/likely pathogenic variants among patients presenting with SVT and age- and sex-matched MPN without SVT. Patients developing SVT after diagnosis showed a significantly higher number of pathogenic/likely pathogenic mutations than patients presenting with SVT (Table 2). *TP53* mutations and spliceosome/chromatin mutations were significantly more frequently observed in the group of patients developing SVT during follow-up (Table 2). There were no significant differences among groups regarding the frequency of DTA mutations (Table 2).

The stated divergences in *JAK2* allele burden and the presence of *TP53*, spliceosome or chromatin gene mutations resulted in significant differences in relation to molecular classification according to Grinfeld algorithm (Fig. 2). Of note, 87% of cases presenting with SVT fell into MPN with heterozygous *JAK2* mutation category indicating less molecular complexity and this was significantly different from patients without SVT. Cases developing SVT during follow-up was the group with the highest molecular complexity with only 48% of them being classified as MPN with heterozygous *JAK2* mutation.

Survival analysis

With a median follow-up of 10 years, and without significant differences regarding follow-up time between groups, 39 patients died. Causes of death according to the presence or absence of SVT and its chronology are shown in Table 3.

Median survival was 24 and 39 years in patients with SVT and MPN without SVT, respectively ($p=0.038$). Results were similar when patients developing SVT during follow-up were excluded from the analysis (Fig. 3). Molecular high-risk patients also showed a shorter survival than patients with heterozygous *JAK2* mutation (median survival

Table 1 Main clinical and hematological characteristics at MPN diagnosis in 90 MPN with SVT and 165 age- and sex-matched MPN controls

	MPN without SVT, <i>n</i> = 165	MPN presenting with SVT or previous SVT¶, <i>n</i> = 69	MPN with evolu- tive SVT, <i>n</i> = 21	<i>p</i> value†
Age*	48 (37–60)	43 (36–56)	46 (33–55)	0.47
Female sex, <i>n</i> (%)	91 (55)	41 (59)	10 (48)	0.61
Type of MPN				0.003
PV, <i>n</i> (%)	106 (64)	41 (59)	12 (57)	
ET, <i>n</i> (%)	53 (32)	15 (22)	7 (33)	
MPN-U, <i>n</i> (%)	6 (4) ²	13 (19) ¹	2 (9.5)	
CVRF	49%	48.5%	57%	0.7
Hemoglobin level, g/L*	161 (150–180) ²	143 (123–164) ¹	157 (143–172)	< 0.001
Leukocyte count, ×10 ⁹ /L*	9.4 (7.8–11.7)	8.3 (6.6–12)	11.1 (8.6–13.5)	0.26
Platelet count ×10 ⁹ /L*	660 (463–760) ²	414 (245–499) ¹	482 (303–662)	< 0.001
Pruritus	17%	7% ³	36% ²	0.02
Microvascular symptoms	26% ²	5% ¹	7%	0.002
Palpable spleen	13% ^{2,3}	42% ¹	40% ¹	< 0.001
Previous/at diagnosis hemorrhage	4.2%	19%	4.8%	< 0.001
Previous/at diagnosis non-SVT thrombosis	13%	13%	29%	0.14
High-risk according to the ELN‡, <i>n</i> (%)	38%	100%	48%	< 0.001

Abbreviations: MPN, myeloproliferative neoplasm; SVT, splanchnic vein thrombosis; PV, polycythemia vera; ET, essential thrombocythemia; MPN-U, myeloproliferative neoplasm, unclassifiable; CVRF, cardiovascular risk factors; ELN, European LeukemiaNet

*Median (Interquartile range); ‡High-risk defined as age ≥ 60 years-old and/or history of thrombosis or hemorrhage

¶Includes 59 patients presenting with SVT and 10 patients with history of SVT prior to MPN diagnosis

†*p* value, as a result of comparison of the three groups

¹*p* < 0.05 in comparison with MPN without SVT

²*p* < 0.05 in comparison with MPN presenting with SVT

³*p* < 0.05 in comparison with MPN with evolutive SVT

23 years and not reached, respectively, *p* = 0.036). At multivariate analysis, patients presenting with SVT showed a significant higher risk of death (HR 3.0, 95% CI 1.5–6.0, *p* = 0.003) after correction by age (HR 1.1, 95% CI 1.08–1.15, *p* < 0.001), sex (not significant), and molecular risk (not significant).

Event-free survival (EFS) according to the presence of SVT at MPN diagnosis is shown in Fig. 4. Median EFS was 8 and 17 years in SVT-presenting and non-SVT groups, respectively (*p* < 0.001). Male sex and molecular high-risk were also associated with significant shorter EFS (data not shown). At multivariate analysis, MPN patients presenting with SVT showed a higher risk of presenting any event (HR 3.0, 95% CI 1.9–4.8, *p* < 0.001), adjusted by age (HR 1.04, 95% CI 1.02–1.05, *p* < 0.001), sex (*p* not significant), and molecular risk (*p* not significant).

Thrombosis and bleeding

In order to avoid bias by selection, patients developing SVT after diagnosis were excluded from thrombosis/bleeding analysis; MPN with previous/presenting SVT (*n* = 69) and MPN controls (*n* = 165) were compared. During follow-up, 36 patients presented at least one thrombotic event resulting

in a 10-year probability of thrombosis of 13%. The probability of thrombosis at 10 years in MPN patients presenting with SVT and in age- and sex-matched MPN without SVT was 27% and 8%, respectively (*p* = 0.001). Sex, cardiovascular risk factors, molecular classification and DTA mutations were not associated with higher risk of thrombosis. At multivariate analysis, MPN presenting with SVT showed a higher risk of total thrombosis (HR 3.2, 95% CI 1.6–6.4, *p* = 0.001), adjusted by age (HR 1.03, 95% CI: 0.99–1.06, *p* = 0.07), sex (*p* not significant), presence of cardiovascular risk factors (*p* not significant) and molecular high-risk (*p* not significant).

A total of 15 arterial thrombotic events were registered resulting in a 10-year probability of arterial thrombosis of 4.9%. Male sex, cardiovascular risk factors and DTA mutations were associated with a significantly higher probability of arterial thrombosis, whereas Grinfeld classification and SVT at diagnosis were not. At multivariate analysis, DTA mutations were associated with a higher risk of arterial thrombosis (HR, 2.9; 95%CI, 1.1–8.7; *p* = 0.049) after correction by age (HR, 1.04; 95%CI, 0.99–1.08; *p* = 0.07) and presence of cardiovascular risk factors (HR, 4.0; 95%CI, 0.86–18.9; *p* = 0.08). The higher probability of arterial thrombosis observed in patients carrying DTA mutation was restricted to the MPN control group since none of the 9

Table 2 Main molecular characteristics of 90 MPN patients with SVT and 165 age- and sex-matched MPN controls

	MPN without SVT, <i>n</i> = 165	MPN presenting with SVT or previous SVT, <i>n</i> = 69	MPN with evolutive SVT, <i>n</i> = 21	<i>p</i> value†
<i>JAK2</i> VAF*	34 (30–38) ²	25 (21–29) ^{1,3}	45 (34–56) ²	0.001
Number of mutations*	1.3 (1.2–1.4) ³	1.2 (1.1–1.3) ³	1.7 (1.1–2.1) ^{1,2}	0.03
Additional mutation, <i>n</i> (%)	42 (25.5)	13 (19)	6 (29)	0.5
<i>TP53</i> mutation, <i>n</i> (%)	7 (4) ³	2 (3) ³	4 (19) ^{1,2}	0.009
Chromatin/spliceosome mutation, <i>n</i> (%)	11 (7)	2 (3) ³	4 (19) ²	0.03
Homozygous <i>JAK2</i> or mutation in <i>TP53</i> /chromatin/spliceosome genes, <i>n</i> (%)	51 (31) ²	9 (13) ^{1,3}	11 (52) ²	0.001
DTA mutation, <i>n</i> (%)	34 (21)	9 (13)	4 (19)	0.6
<i>TET2</i> , <i>n</i> (%)	21 (13)	6 (9)	2 (9.5)	0.8
<i>DNMT3A</i> , <i>n</i> (%)	6 (4)	2 (3)	2 (9.5)	0.5
<i>ASXL1</i> , <i>n</i> (%)	11 (7)	1 (1)	0 (0)	0.2

Abbreviation: MPN, myeloproliferative neoplasm; SVT, splenic vein thrombosis; VAF, variant allele frequency; DTA, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*

*Mean (95%CI). †*p* value, as a result of comparison of the three groups

¹*p* < 0.05 in comparison with MPN without SVT

²*p* < 0.05 in comparison with MPN presenting with SVT

³*p* < 0.05 in comparison with MPN with evolutive SVT

MPN patients presenting with SVT who carried DTA mutations experienced arterial thrombosis during follow-up.

Regarding venous thrombosis, 23 events were reported resulting in a probability of venous thrombosis at 10 years of 9%. Six of these events occurred in the control group and 17 in the SVT group. Among the latter, 3 events were attributed to deep vein thrombosis/pulmonary embolism (DVT/PE), while 14 were instances of SVT progression or SVT re-thrombosis. As expected, the probability of venous thrombosis was significantly different among groups (28% and 1.6% in MPN presenting with SVT and age- and sex-matched MPN controls, respectively, *p* < 0.0001). When the types of venous thrombosis were analyzed separately in MPN presenting with SVT group, the 10-year probabilities of DVT/PE and SVT were 4.4% and 23.6%, respectively. Although we identified a higher probability of developing

DVT/PE during the evolution in the SVT group (10-year probability of 1.6% vs. 4.4% in the control vs. SVT group, respectively), this difference did not reach statistical significance.

In patients presenting with SVT, the probability of a new thrombotic event of any type was significantly different according to molecular classification (22% and 64% at 10 years in molecular low- and high-risk, respectively, *p* = 0.01), whereas sex and DTA mutations were not associated with thrombosis. At multivariate analysis restricted to MPN patients presenting with SVT, molecular high-risk was associated with increased risk of a new thrombotic event of any type (HR 5.8, 95% CI 1.4–24.0, *p* = 0.01) after adjustment by age (*p* not significant) and *JAK2* allele burden (*p* not significant).

Major bleeding was registered in 28 patients. The probability of major bleeding at 10 years in MPN patients presenting with SVT and in age- and sex MPN matched controls without SVT was 27% and 3.3%, respectively (*p* < 0.0001). Anti-platelet therapy and anticoagulation were also associated with higher probability of major bleeding, while molecular classification and DTA mutations were not (data not shown).

Cytoreductive and antithrombotic treatment

With reference to cytoreductive therapy, 72.5% received hydroxyurea; 13.7%, anagrelide; 11.8%, interferon; 9.4%, JAK inhibitors; 3.9%, P32; and 2% busulfan. The proportion of patients that received each treatment was very similar between those who presented SVT previous or at diagnosis and those who did not develop SVT. None of the minimal differences observed were statistically significant (Supplemental Table S3). Specifically, 114 of 165 patients in the control group (69.1%) received hydroxyurea and 52 out of 69 received this drug in the SVT group (75.4%) (*p* = 0.43).

On the other side, antithrombotic treatment was significantly different between control and SVT group, in favor of anti-platelet treatment in the control group and anticoagulant treatment in the SVT group. 88.5% of non-SVT control group received anti-platelet treatment, in contrast to 20.3% who received this therapy in SVT group (*p* < 0.001%). Moreover, only 10.3% of controls received anticoagulant therapy unlike SVT group, in which 92.8% of patients received long-term anticoagulant treatment (*p* < 0.001%).

The proportion of patients that received each therapy was also evaluated within SVT group, according to the molecular risk (heterozygous *JAK2* mutation vs. molecular high-risk) and no significant differences were observed between both subgroups in respect of cytoreductive therapy. In relation to antithrombotic treatment, the proportion of patients with anticoagulant drugs was similar between groups (93.3% vs.

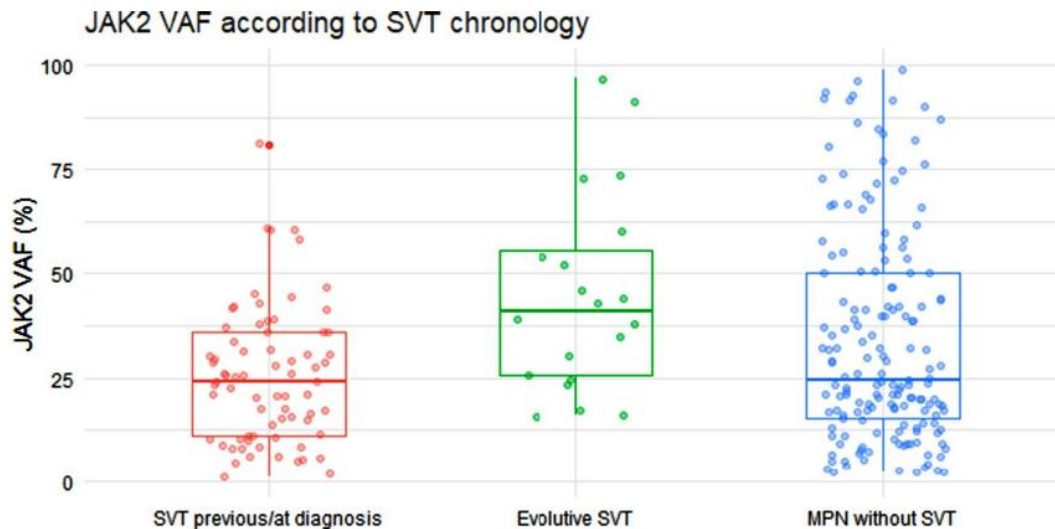


Fig. 1 *JAK2* VAF (%) in 255 MPN patients separated according to SVT chronology. This box plot plus jitter shows *JAK2* VAF distribution according to SVT chronology. Only very few cases of SVT at MPN diagnosis or previously presented a VAF $\geq 50\%$, which is very differ-

ent from MPN without SVT. MPN with evolutive SVT showed the highest *JAK2* allele VAF. **Abbreviation:** VAF, variant allele frequency; MPN, myeloproliferative neoplasm; SVT, splanchnic vein thrombosis

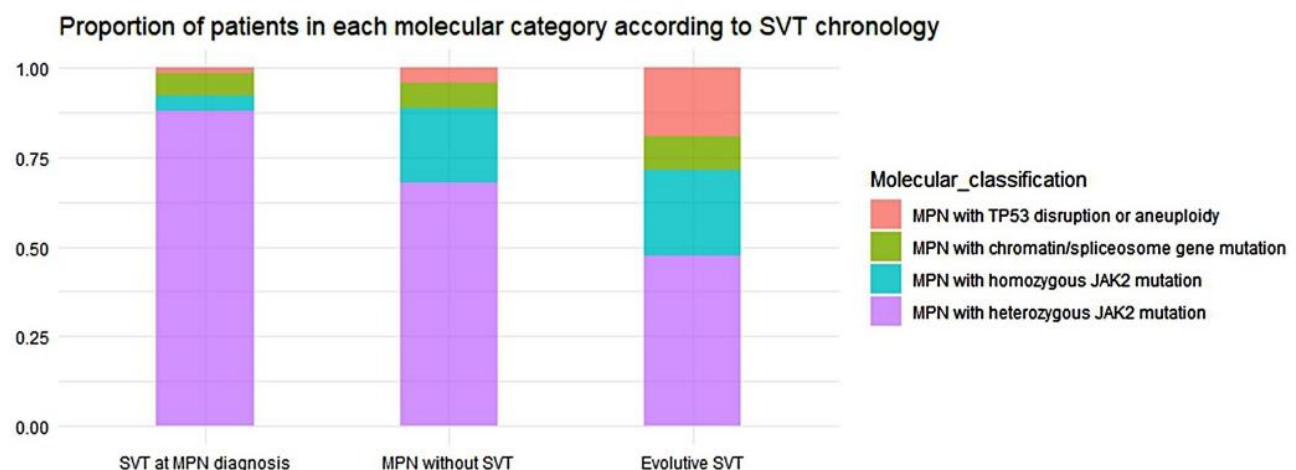


Fig. 2 Proportion of patients in each molecular category according to SVT chronology. The bar plot shows the difference on the proportion of patients in each molecular category according to SVT chronology. MPN presenting with SVT group showed a low proportion of cases in high-risk categories (1.7% *TP53* disruption or aneuploidy, 3.4% chromatin/spliceosome gene mutation and 5.1% homozygous *JAK2* mutation) and a very high proportion of patients falling into heterozygous *JAK2* mutation category. The proportions differed from those in MPN without SVT (4.2% *TP53* disruption or aneuploidy, 6.1% chromatin/

spliceosome gene mutation, 20.6% homozygous *JAK2* mutation and 69.1% heterozygous *JAK2* mutation) and those in MPN with evolutive SVT (19% *TP53* disruption or aneuploidy, 9.5% chromatin/spliceosome gene mutation, 23.8% homozygous *JAK2* mutation and 47.6% heterozygous *JAK2* mutation). The differences seen on the proportion of patients in each category were statistically significant ($p=0.006$). **Abbreviation:** MPN, Myeloproliferative neoplasm; SVT, Splanchnic vein thrombosis

88.9%, $p=0.5$, in heterozygous *JAK2* and molecular high-risk groups, respectively). Nevertheless, a considerably higher proportion of patients received anti-platelet therapy in the molecular high-risk group (15% vs. 55.9%, $p=0.01$, in heterozygous *JAK2* and molecular high-risk groups, respectively).

Disease progression and second neoplasia

During follow-up, 25 out of 255 patients presented disease progression (MF, $n=20$; AML, $n=6$). The 10- and 20-year probability of disease progression was 5% and 23.5%, respectively, and it was similar in non-SVT group and SVT-presenting group.

Table 3 Causes of death in 90 MPN patients with SVT and 165 age- and sex-matched MPN controls

	MPN without SVT, <i>n</i> =165	MPN presenting with SVT, <i>n</i> =69	MPN with evolutive SVT, <i>n</i> =21
Thrombosis	0	0	2 (9.5)
Bleeding	1 (0.6)	3 (4.3)	1 (4.8)
Hepatic disease	0	3 (4.3)	0
Infection	2 (1.2)	3 (4.3)	1 (4.8)
MF/AML	5 (3)	1 (1.4)	1 (4.8)
Neoplasia	4 (2.4)	5 (7.2)	0
Other/Unknown	6 (3.6)	1 (1.4)	0
Total	18 (11)	16 (23)	5 (24)

Abbreviation: MPN, myeloproliferative neoplasm; SVT, splanchnic vein thrombosis; MF, myelofibrosis; AML, acute myeloid leukemia

There were significant differences on time to progression according to molecular classification (20-year probability of disease progression was 44%, 47%, 61%, and 8% in MPN with *TP53* disruption, MPN with chromatin or spliceosome mutation, MPN with homozygous *JAK2* mutation and MPN with heterozygous *JAK2* mutation, respectively, $p < 0.001$). Most events occurred after more than 10 years from diagnosis, except for MPN patients with homozygous *JAK2* mutation in whom disease progression, mainly to MF, was observed widely after 5 years. Time to disease progression

is shown in Fig. 5. At multivariate analysis, adjusting by sex, age and SVT, the impact of molecular classification remained significant in molecular high-risk patients (HR, 7.6; 95%CI, 2.5–23.2; $p < 0.001$). DTA mutations did not have a significant impact on time to disease progression.

During follow-up, 33 second neoplasia were reported. There were not significant differences regarding time to second neoplasia among MPN patients presenting with SVT and controls (data not shown).

Discussion

Herein we describe a series of patients with MPN (PV/ET/MPN-U) and SVT, which have been analyzed separately according to SVT chronology. To our knowledge, this is one of the largest series of PV and ET patients with SVT that have been published so far, including genomic profiling. In addition, a clinical and genomic comparison with an age- and sex-matched group of patients with the same diagnosis but without SVT has been carried out. We chose this control group to underscore the demographic peculiarities of MPN patients presenting with SVT.

We have observed that patients with PV/ET presenting with SVT have a lower *JAK2* allele burden and a lower

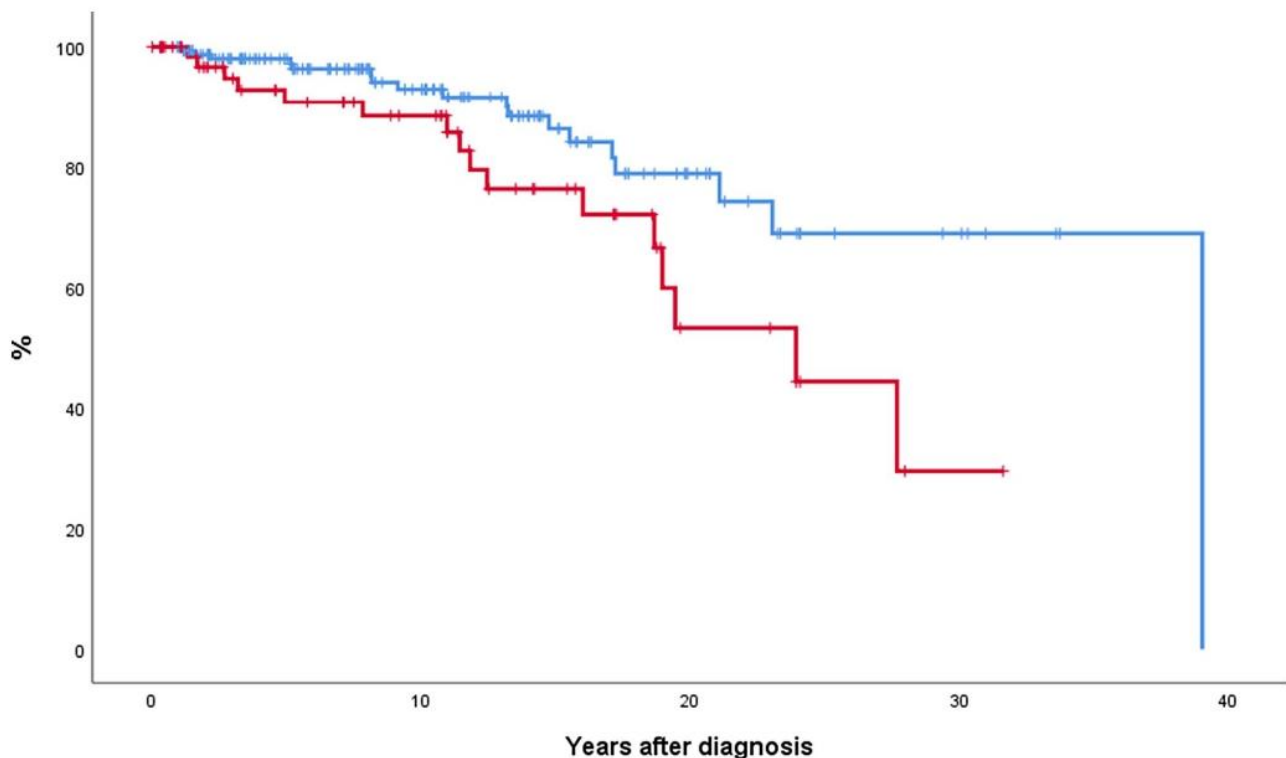


Fig. 3 Probability of survival in 69 MPN patients presenting with SVT (red line) and 165 age- and sex-matched patients without SVT at diagnosis (blue line). Median survival was 24 and 39 years for SVT and

non-SVT groups, respectively ($p = 0.02$). Abbreviation: MPN, myeloproliferative neoplasm; SVT, splanchnic vein thrombosis

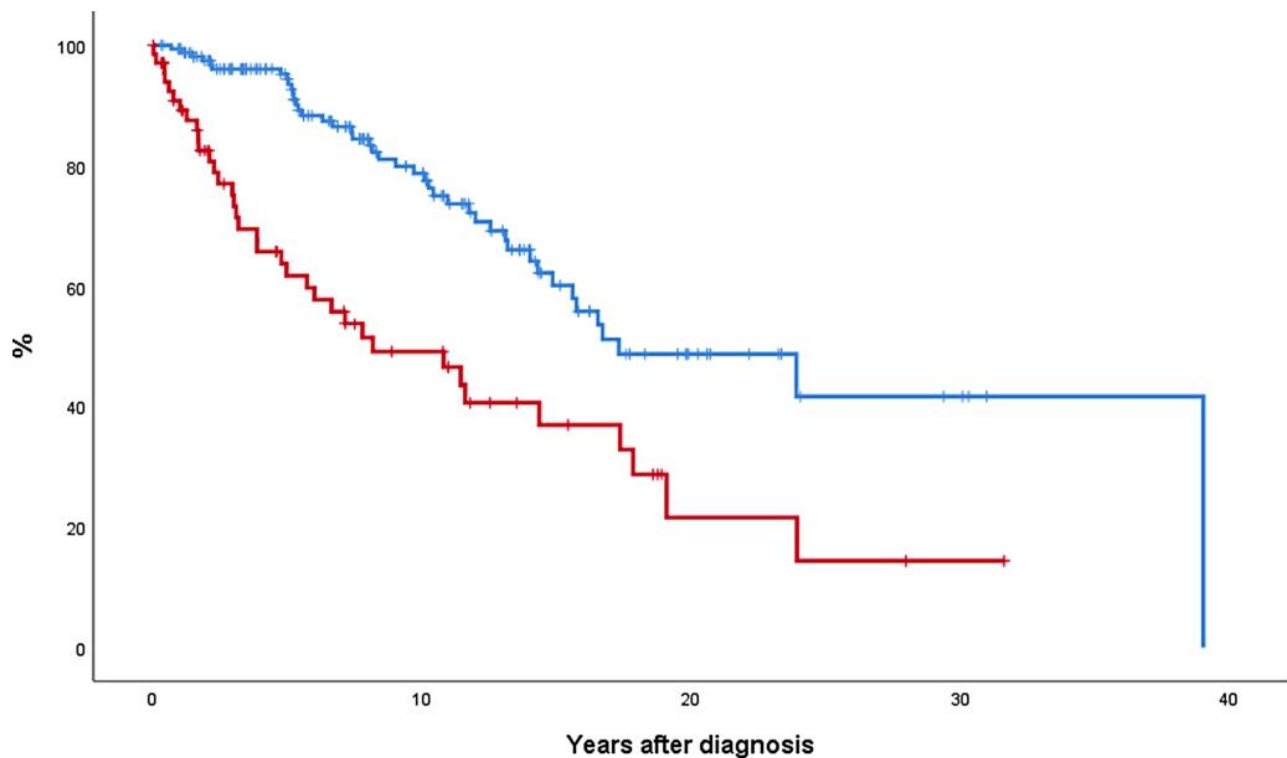


Fig. 4 Event-free survival in 69 MPN patients presenting with SVT (red line) and 165 age- and sex-matched patients without SVT at diagnosis (blue line). Median EFS was 8 and 17 years for patients presenting with SVT and those without SVT at diagnosis, respectively

($p < 0.001$). Event-free survival included death, thrombosis, major bleeding or disease progression to myelofibrosis/acute leukemia, whichever occurred in the first place. *Abbreviation:* MPN, myeloproliferative neoplasm; SVT, splanchnic vein thrombosis

number of pathogenic mutations than matched MPN patients without SVT of the same age, sex, and diagnosis. This lower molecular complexity might explain the milder hematological picture commonly observed in this group of patients [4, 5, 11]. It has been reported that a proportion of MPN patients presenting with SVT show normal blood counts at MPN diagnosis [4, 7, 12]. In our experience, 19% of patients presenting with SVT were classified as MPN-U, mainly due to absence of erythrocytosis or thrombocytosis. Although hypervolemia secondary to hepatic disease and/or hypersplenism might explain the normalization of blood values, the presence of a latent MPN in which a small *JAK2*-positive clone without additional mutations that has not yet been able to develop an overt MPN would be an alternative explanation. In supporting this, a recent publication showed that acquisition of *JAK2* mutation may precede the appearance of the MPN by decades. In addition, *JAK2*-mutated clonal hematopoiesis of indeterminate potential has been associated with an increased risk of thrombosis [13, 14].

When the Grinfeld algorithm was applied, 87% of patients presenting with SVT corresponded to MPN with heterozygous *JAK2* mutation, a molecular group that is associated with a better survival and a lower rate of disease progression. However, despite belonging mainly to a low-risk

molecular group, patients presenting with SVT have a three-fold increased risk of death and a worse event-free survival than controls after correction by age, sex and molecular risk. Prognosis in MPN without SVT is mainly related to MPN subtype, with mortality being associated to MPN progression, especially in MF [6, 15, 16]. We have found that, in PV/ET presenting with SVT, outcome is mostly determined by complications other than MPN progression, especially venous thrombosis, major bleeding and hepatic disease, resulting in a 15-year reduction of median survival.

It is widely known that patients with SVT are at very high risk of recurrent thrombosis despite cytoreductive therapy and anticoagulation [3, 4, 6, 17]. Our work confirms that SVT-presenting MPN has an 8-fold risk of thrombosis recurrence compared with non-SVT MPN, and this risk is even higher when patients belong to a molecular high-risk group. This marked increase risk of thrombosis is present even though there were no significant differences in cytoreductive therapy between groups and a great majority of SVT patients were under anticoagulant therapy.

In addition, we identified the presence of DTA mutations as an independent risk factor for arterial thrombosis in this large cohort of young MPN patients, although the rate of arterial thrombosis in patients presenting with SVT and

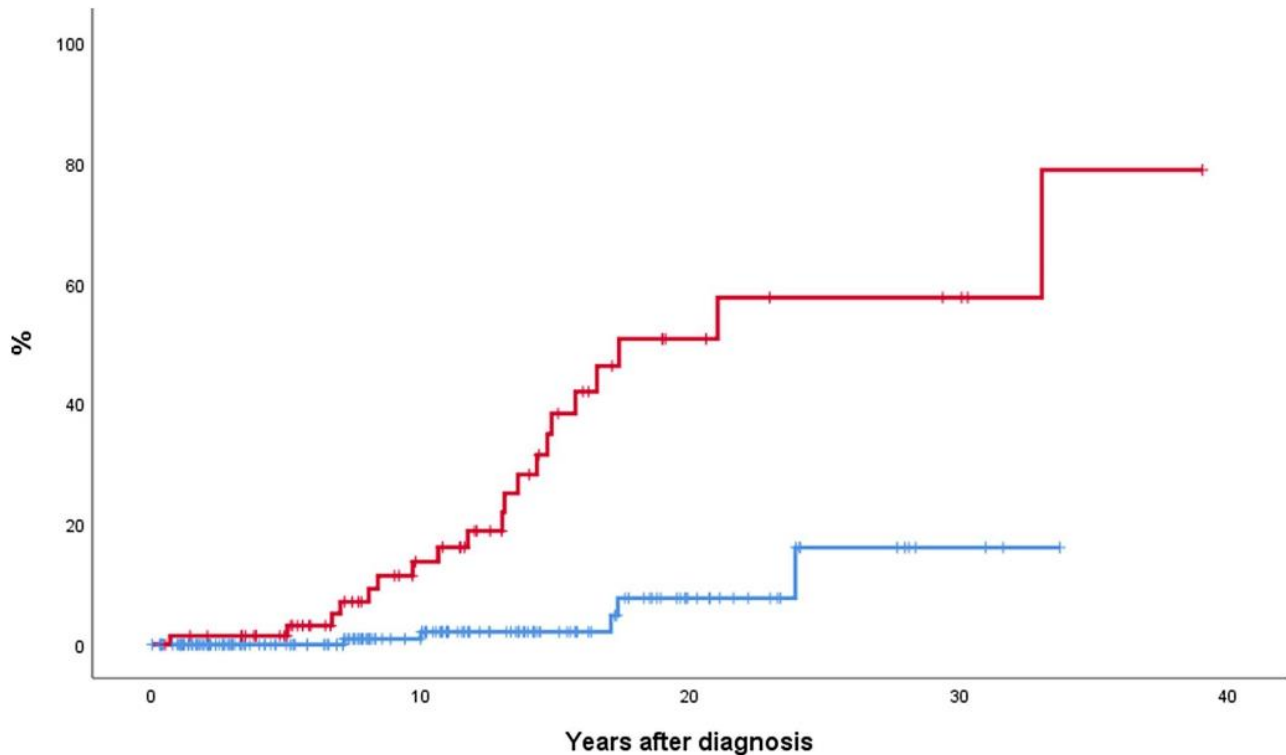


Fig. 5 Disease progression according to molecular risk in 255 MPN patients. Kaplan-Meier estimates of disease progression at 20 years was 51% and 8% in patients classified as high and low molecular risk, respectively ($p < 0.0001$). Molecular high-risk (red line) included

patients with *TP53*, chromatin/spliceosome, or homozygous *JAK2* mutation ($n = 71$). Molecular low-risk (blue line) included patients with heterozygous *JAK2* mutation ($n = 184$). Abbreviation: MPN, myeloproliferative neoplasm; SVT, splanchnic vein thrombosis

controls was similar [14, 18]. Finally, NGS profiling showed its highest fitness in predicting disease transformation, confirming previous observations [7, 10]. All these findings reinforce the relevance of NGS-based mutational profiling in young PV/ET patients and, specifically, in complex cases, such as those presenting with SVT, in whom molecular characterization can lead to identification of patients at higher risk of arterial thrombosis, venous re-thrombosis and disease progression. Genomic information besides driver mutation might be incorporated in therapeutic decisions in the future, especially when balance between thrombosis and bleeding is challenging or young patients at high risk of disease progression.

Regarding patients with PV/ET who developed SVT during follow-up, the clinical and hematological characteristics were superimposable with those without SVT, except for a higher frequency of splenomegaly. Interestingly, patients developing SVT during follow-up showed the highest *JAK2* allele burden and the highest number of additional mutations, resulting in a significantly higher proportion of patients belonging to molecular high-risk categories. These findings reinforce the relevance of separating SVT according to its chronology, as they constitute entities with different genomic backgrounds. This heterogeneity affecting

MPN with SVT might explain some of the differences with respect to other studies.

Debureaux et al. [7] reported that 29% of 80 patients with SVT were classified as high-risk due to the presence of either *JAK2V617F* allele burden $\geq 50\%$ or chromatin/spliceosome or *TP53* mutations, including 5 patients with MF, 4 patients with *CALR* mutation and 7 cases in whom SVT had appeared during follow-up. In our work, restricted to *JAK2*-mutated patients and excluding MF, molecular high-risk was observed in 13% of patients presenting with SVT and in 52% of those developing SVT during follow-up. Despite these differences in design, both studies showed that risk stratification according to molecular classification is highly useful for disease progression prediction in young patients with PV and ET.

The main limitations of our work are its retrospective design, lack of complete cytogenetic information in most patients and that very rarely mutated genes that have prognostic implications are not included in the NGS panel that we have used. The number of patients included with SVT is limited but this is mainly due to the rarity of both MPN and SVT.

In conclusion, PV and ET presenting with SVT mostly correspond to MPN with heterozygous *JAK2* mutation

according to Grinfeld algorithm. Despite this low molecular complexity, MPN presenting with SVT have a shorter survival and event-free survival when compared with PV and ET of similar age and sex without SVT. In young PV/ET patients, the presence of either homozygous *JAK2* mutation or chromatin/spliceosome/*TP53* mutations is associated with a higher risk of disease progression, whereas DTA mutations predict arterial thrombosis. Finally, molecular high-risk predicts development of new thrombotic events in PV/ET patients presenting with SVT.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00277-023-05610-x>.

Acknowledgements This work was supported by grants PI18/00205 and PI21/00231 from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), through the Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación. We are indebted to the Genomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS) for NGS sequencing support.

Author contributions MG selected the patients, collected the data, performed the genomic analysis, interpreted the statistical analysis and wrote the paper. AAL designed the study, selected the patients, collected the data, performed and interpreted the statistical analysis and wrote the paper. MLG and DC performed the genomic analysis. JCGP, EAR, FFM, JCHB, BB, MN, VH, AT, AB, DC and FC collected the data. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature.

Data availability Data that has been generated during this research project is available from the corresponding author upon reasonable request. Additional information can be found in Supplemental data.

Declarations

Ethical approval The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Hospital Clínic de Barcelona (HCB/2019/155, January 11th 2019 and HCB/2022/0945, November 10th 2022). Signed informed consent according review board requirements was obtained from all participants.

Conflict of interest JCGP is a consultant for COOK and has received a research grant from GORE. DC has received honoraria from AbbVie, AstraZeneca, Incyte, Novartis and ThermoFisher for speaking at education activities. AAL is a consultant and has received honoraria from AOP for speaking at education activities. The other authors do not have competing interests to declare.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended

use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A (2009) Blood cell activation in myeloproliferative Neoplasms. *Haematologica* 94:1484–1488. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.013375>
- De Stefano V, Martinelli I (2010) Splanchnic vein Thrombosis: clinical presentation, risk factors and treatment. *Intern Emerg Med* 5:487–494. <https://doi.org/10.1007/s11739-010-0413-6>
- De Stefano V, Vannucchi AM, Ruggeri M et al (2016) Splanchnic vein Thrombosis in myeloproliferative Neoplasms: risk factors for recurrences in a cohort of 181 patients. *Blood Cancer J* 6:1–7. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.103>
- Alvarez-Larrán A, Pereira A, Magaz M et al (2020) Natural history of polycythemia vera and essential thrombocythemia presenting with splanchnic vein Thrombosis. *Ann Hematol* 99:791–798. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03965-z>
- How J, Zhou A, Oh ST (2017) Splanchnic vein Thrombosis in myeloproliferative Neoplasms: pathophysiology and molecular mechanisms of Disease. *Ther Adv Hematol* 8:107–118. <https://doi.org/10.1177/2040620716680333>
- Sant'Antonio E, Guglielmelli P, Pieri L et al (2020) Splanchnic vein thromboses associated with myeloproliferative Neoplasms: an international, retrospective study on 518 cases. *Am J Hematol* 95:156–166. <https://doi.org/10.1002/ajh.25677>
- Debureaux PE, Cassinat B, Soret-Dulphy J et al (2020) Molecular profiling and risk classification of patients with myeloproliferative Neoplasms and splanchnic vein thromboses. *Blood Adv* 4:3708–3715. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002414>
- Gangat N, Wolanskyj AP, Tefferi A (2006) Abdominal vein Thrombosis in essential thrombocythemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic implications. *Eur J Haematol* 77:327–333. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2006.00715.x>
- Lavu S, Szuber N, Mudireddy M et al (2018) Splanchnic vein Thrombosis in patients with myeloproliferative Neoplasms: the Mayo clinic experience with 84 consecutive cases. *Am J Hematol* 93:E61–E64. <https://doi.org/10.1002/ajh.24993>
- Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ et al (2018) Classification and personalized prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 379:1416–1430. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1716614>
- Greenfield G, McMullin MF (2018) Splanchnic venous Thrombosis in *JAK2* V617F mutation positive myeloproliferative Neoplasms - long term follow-up of a regional case series. *Thromb J* 16:33. <https://doi.org/10.1186/s12959-018-0187-z>
- Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, Kiladjian JJ, Janssen HL, Leebeek FW (2012) Myeloproliferative Neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein Thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 120:4921–4928. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-376517>
- Williams N, Lee J, Mitchell E et al (2022) Life histories of myeloproliferative Neoplasms inferred from phylogenies. *Nature* 602:162–168. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04312-6>
- Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ et al (2017) Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 377:111–121. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1701719>
- Hoekstra J, Bresser EL, Smalberg JH, Spaander MC, Leebeek FW, Janssen HL (2011) Long-term follow-up of patients with portal vein Thrombosis and myeloproliferative Neoplasms. *J Thromb Haemost* 9:2208–2214. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04484.x>

16. Tremblay D, Vogel AS, Moshier E et al (2020) Outcomes of splanchnic vein Thrombosis in patients with myeloproliferative Neoplasms in a single center experience. *Eur J Haematol* 104:72–73. <https://doi.org/10.1111/ejh.13335>
17. Hargreaves R, Subhan M, Alimam S et al (2022) S199 a national retrospective cohort study of MPN-SVT: results from the UK myeloproliferative Neoplasms associated splanchnic vein Thrombosis (MASCOT) registry. *HemaSphere* 6(S3):205–206
18. Segura-Díaz A, Stuckey R, Florido Y et al (2020) Thrombotic risk detection in patients with Polycythemia Vera: the predictive role of *DNMT3A/TET2/ASXL1* mutations. *Cancers (Basel)* 12:934. <https://doi.org/10.3390/cancers12040934>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.2. Segon treball

Títol: Característiques clíniques i pronòstic en pacients amb mielofibrosi primària i secundària d'acord amb la classificació genòmica portada a terme a partir de dades de seqüenciació de nova generació

Resum:

Introducció: la mielofibrosi (MF) és una neoplàsia mieloproliferativa (NMP) heterogènia, des del punt de vista clínic, pronòstic i genòmic. Grinfeld et al. (*N Engl J Med*, 2018) van proposar una classificació genòmica de les NMP amb valor pronòstic; així i tot, aquesta classificació ha tingut poca implementació en l'àmbit de la MF.

Objectiu: aplicar la classificació genòmica de Grinfeld a una sèrie unicèntrica de pacients diagnosticats de MF, separant els casos en funció de si es tracta d'una mielofibrosi primària (MFP) o secundària (MFS), sigui post-policitemia vera (MF post-PV) o post-trombocitemia essencial (MF post-TE).

Mètodes: es van seleccionar 175 pacients diagnosticats de MF, 81 amb MFP i 94 amb MFS. Mitjançant un panell de NGS i dades de citogenètica convencional, es van classificar els casos de forma jeràrquica en 8 categories moleculars: disrupció de *TP53* o aneuploidia (mutació de *TP53*, Chr17pLOH o Ch5-/Chr5q-); ≥1 alteracions en gens de cromatina/*splicing* (*EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *PHF6*, *CUX1*, *ZRSR2*, *SRSF2*, *U2AF1*, *KRAS*, *NRAS*, *GNAS*, *CBL*, *RUNX1*, *STAG2* i *BCOR*), o bé Chr7/7qLOH o Chr4qLOH; mutació de *CALR*; mutació de *MPL*; mutació de *JAK2* en homozigosi; mutació de *JAK2* en heterozigosi; presència d'una altra mutació *driver*; sense mutació *driver* coneguda.

Per a la classificació, es van tenir en compte les variants patogèniques o probablement patogèniques amb una freqüència al·lèlica $\geq 1\%$.

Resultats: la MF amb disrupció de *TP53* ($n=12$, 7%) es va observar en major proporció (9% vs. 5%) i amb freqüències al·lèliques més altes (57% vs. 15%) en la MFS que en la MFP. La supervivència en aquesta categoria va ser de 5.3 anys. Un terç dels pacients van mostrar progressió a leucèmia mieloide aguda, amb una probabilitat de leucèmia aguda als 5 anys del 52%.

La MF amb mutacions de cromatina/*splicing* ($n=73$, 42%) va ser la categoria més prevalent en la MFP. La supervivència global en aquesta categoria va ser de 6.2 anys i 11 dels 73 casos van mostrar progressió a leucèmia aguda (probabilitat als 5 anys del 14%). El 60% dels pacients en aquesta categoria van desenvolupar dependència transfusional.

La categoria de MF amb *JAK2* en homozigosi ($n=40$, 23%) estava enriquida amb pacients d'edat avançada i amb diagnòstic de MFS, després d'una policitemia vera de llarga evolució. La supervivència va ser de 7.3 anys i la probabilitat de leucèmia aguda als 5 anys del 18%. La MF amb *JAK2* en heterozigosi ($n=22$, 13%) va mostrar una distribució similar entre MFP i MFS. En aquesta categoria, no es va assolir la mitjana de supervivència i no hi va haver casos de progressió a leucèmia aguda.

La MF amb mutació de *CALR* ($n=19$, 11%) va mostrar una representació similar de les mutacions tipus 1 i tipus 2, amb una freqüència al·lèlica mitjana del 46%. En aquesta categoria, s'observà un predomini de MF post-TE. La mitjana de supervivència fou de 10.7 anys, sense haver-se documentat cap progressió a leucèmia aguda. Els 9 casos restants van classificar-se dins les categories MF amb mutació de *MPL* ($n=4$), MF amb altres mutacions ($n=2$) i MF sense mutacions conegudes ($n=3$).

Conclusions: la classificació genòmica posa de manifest que la MFP i la MFS són malalties amb una base genòmica diferent. A més, aquesta classificació permet identificar els pacients amb pitjor pronòstic i major risc de progressió a leucèmia aguda.

Article

Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Primary and Secondary Myelofibrosis According to the Genomic Classification Using Targeted Next-Generation Sequencing

Marta Garrote ^{1,*}, Mónica López-Guerra ^{1,2}, Eduardo Arellano-Rodrigo ³, María Rozman ¹, Sara Carbonell ³, Francesca Guijarro ¹, Marta Santaliestra ⁴, Ana Triguero ³, Dolores Colomer ^{1,2,5}, Francisco Cervantes ³ and Alberto Álvarez-Larrán ³

- ¹ Hematopathology Section, Pathology Department, Hospital Clínic Barcelona-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain; lopez5@clinic.cat (M.L.-G.); mrozman@clinic.cat (M.R.); fguijarro@clinic.cat (F.G.); dcolomer@clinic.cat (D.C.)
 - ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
 - ³ Hematology Department, Hospital Clínic Barcelona-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain; arellano@clinic.cat (E.A.-R.); scarbonell@clinic.cat (S.C.); atriguero@clinic.cat (A.T.); fcervan@clinic.cat (F.C.); aalvar@clinic.cat (A.Á.-L.)
 - ⁴ Hematology Department, Hospital Universitari Mutua Terrassa, 08221 Terrassa, Spain; msantaliestra@mutuaterrassa.cat
 - ⁵ Medicine Campus, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- * Correspondence: garrote@clinic.cat; Tel.: +34-93-227-55-72



Citation: Garrote, M.; López-Guerra, M.; Arellano-Rodrigo, E.; Rozman, M.; Carbonell, S.; Guijarro, F.; Santaliestra, M.; Triguero, A.; Colomer, D.; Cervantes, F.; et al. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Primary and Secondary Myelofibrosis According to the Genomic Classification Using Targeted Next-Generation Sequencing. *Cancers* **2023**, *15*, 3904. <https://doi.org/10.3390/cancers15153904>

Received: 14 June 2023

Revised: 25 July 2023

Accepted: 25 July 2023

Published: 31 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Myelofibrosis is a heterogeneous disease regarding its mutation landscape as well as its clinical presentation and outcome. A genomic classification with prognostic implications of myeloproliferative neoplasms has been previously proposed, however, this classification has hardly been implemented in myelofibrosis. The aim of our work is to evaluate this genomic classification in a large series of myelofibrosis patients from a single institution, taking into account whether cases are primary or secondary. We found that both primary and secondary myelofibrosis have distinctive molecular landscapes and that genomic profiling provides accurate information regarding prognosis and disease progression.

Abstract: Myelofibrosis (MF) is a heterogeneous disease regarding its mutational landscape, clinical presentation, and outcomes. The aim of our work is to evaluate the genomic classification of MF considering whether it is primary or secondary. One-hundred seventy-five patients, 81 with primary MF (PMF) and 94 with secondary MF (SMF) were hierarchically allocated into eight molecular groups. We found that *TP53* disruption/aneuploidy ($n = 16$, 9%) was more frequent (12% versus 6%) and showed higher allele burden (57% versus 15%, $p = 0.01$) in SMF than in PMF, and was associated with shorter survival (median 3.5 years). Mutations in chromatin/spliceosome genes ($n = 72$, 41%) represented the most frequent genomic group in PMF. Homozygous *JAK2* mutation ($n = 40$, 23%) was enriched with old patients with SMF after long-standing polycythemia vera, whereas MF with heterozygous *JAK2* mutation ($n = 22$, 13%) was similarly distributed among PMF and SMF. MF with *CALR* mutation ($n = 19$, 11%) predominated in post-essential thrombocythemia MF. The remaining genomic groups were infrequent. *TP53* disruption, chromatin/spliceosome mutation, and homozygous *JAK2* mutation were associated with significantly shorter survival and higher risk of progression. In conclusion, genomic classification reveals different pathogenic pathways between PMF and SMF and provides relevant information regarding disease phenotype and outcomes.

Keywords: myelofibrosis; myeloproliferative neoplasms; genomic classification; prognosis; personalized medicine

1. Introduction

Myelofibrosis (MF) is a heterogeneous myeloproliferative neoplasm (MPN), from both a clinical and a prognostic point of view [1]. Thus, while some patients remain asymptomatic and do not require treatment for years, others suffer from a debilitating and progressive disease in which constitutional symptoms, transfusion dependence, and splenomegaly impair quality of life and result in reduced survival [1,2]. The disease can appear de novo (primary MF, PMF) or as a result of disease progression from another MPN (secondary MF, SMF), such as polycythemia vera (PV) or essential thrombocythemia (ET) [1,3]. Although there are no differences in terms of clinical manifestations and treatment, both types of MF are usually considered different entities [1,3,4].

Clinical variability reflects the complex and heterogeneous landscape of MF. Most patients harbor a driver mutation in signaling recurrent genes, such as *JAK2*, *CALR*, or *MPL*. These mutations are mutually exclusive and do show correlation with disease phenotype and prognosis [5–7]. Additional mutations in genes involved in epigenetic regulation, affecting the RAS signaling pathway or the tumor suppressor *TP53* also play a fundamental role in the transformation of the malignant cell and, therefore, in its clinical expression [8–11].

Recently, a molecular classification of MPN including eight genomic groups has been proposed as a useful tool for personalizing the prognosis and treatment of MPN patients [10].

It is a hierarchical classification based on an algorithm that contains eight categories; molecular and chromosomal abnormalities associated with worse prognosis prevail in the classification. Cases presenting with *TP53* disruption or chromatin/spliceosome mutations are included in categories one and two, respectively. Categories three to six include MPN with driver mutations (*CALR*, *MPL*, or *JAK2*) that lack definitory abnormalities within categories one and two. Patients with *JAK2* mutations are separated into two categories, according to allele burden (categories five and six). Finally, categories seven and eight include cases with no known mutations and MPN with other driver mutations, respectively.

This molecular classification offers relevant prognostic information in addition to the MPN driver mutation and it allows us to identify those patients at higher risk of progression, disease complications, and death, regardless of the disease phenotype. However, it has hardly been implemented in clinical practice. The aim of the present study is to evaluate the genomic classification of MF in a large series of MF patients from a single institution, taking into account whether cases are primary or secondary.

2. Materials and Methods

All patients diagnosed with PMF or SMF at our institution with available DNA samples were included in the present study. The diagnosis was carried out according to World Health Organization 2016 criteria [12]. IPSS and MYSEC prognostic scores (see Supplemental Table S1) at diagnosis were calculated for all patients as previously described [13,14]. Informed consent was obtained and the study was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínic (Barcelona, Spain).

DNA samples were isolated from peripheral blood at diagnosis ($n = 131$, 75%) or during follow-up ($n = 44$, 25%) and stored in the Hematopathology Collection (Biobank Hospital Clínic—IDIBAPS; R121004-094). DNA samples that were collected during follow-up were obtained shortly after diagnosis or at a time in which clinical characteristics have not changed significantly since diagnosis. Targeted sequencing by Next-Generation Sequencing (NGS) was performed using commercial panels from Sophia Genetics (customized Myeloid Solution panel MIC_v1, MiSeq system, Illumina platform) or Thermo Fisher Scientific (Oncomine Myeloid Assay, Ion GeneStudio S5 system, Ion Torrent platform). Myeloid Solution by Sophia genetics included the following 32 genes: *ABL1*, *ASXL1*, *BRAF*, *CALR*, *CBL*, *CEBPA*, *CSF3R*, *CSNK1A1*, *DNMT3A*, *ETV6*, *EZH2*, *FLT3*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KMT2A*, *KRAS*, *MPL*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *WT1*, *ZRSR2*. Oncomine Myeloid Research Assay by Thermo Fisher contained the following genes: *ABL1*, *ASXL1*, *BCOR*, *BRAF*, *CALR*, *CBL*, *CEBPA*,

CSF3R, DNMT3A, ETV6, EZH2, FLT3, GATA2, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, JAK2, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NF1, NPM1, NRAS, PHF6, PRPF8, PTPN11, RB1, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SH2B3, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZRSR2. GRCh37 (hg19) was used as the reference genome in both panels. Variant calling and analysis were carried out using the SOPHiA DDM™ platform and Ion Reporter Software 5.18™. Further information comparing each NGS panel is detailed in Supplemental Table S2.

Only variants with a variant allele frequency (VAF) $\geq 1\%$ were considered and classified within the following categories: pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign, and benign. Variant categorization was carried out using genomic databases and predictors for the general population and cancer (COSMIC, ClinVar, Seshat, Franklin, and Varsome) and published references in myeloid neoplasms [10,15,16]. Only pathogenic and likely pathogenic variants were taken into account for further analysis. Pathogenic and likely pathogenic variants found with their VAF can be found in Supplemental Table S3.

The genomic classification was performed as reported by Grinfeld et al. [10]. Briefly, patients were hierarchically allocated into eight molecular categories: MF with *TP53* disruption or aneuploidy (*TP53* mutation, Chr17pLOH or Chr5-/Chr5q-); MF with ≥ 1 genetic aberration in chromatin or spliceosome genes (*EZH2, IDH1, IDH2, ASXL1, PHF6, CUX1, ZRSR2, SRSF2, U2AF1, KRAS, NRAS, GNAS, CBL, Chr7/7qLOH, Chr4q/LOH, RUNX1, STAG2*, and *BCOR*); MF with *CALR* mutation; MF with *MPL* mutation; MF with homozygous *JAK2* mutation; MF with heterozygous *JAK2* mutation; MF with other driver mutation; MF with no known mutation. For genomic allocation, cytogenetic data from medical records when available, and mutational and copy number variation information derived from NGS were employed.

Qualitative variables were compared through a Chi-squared test and quantitative variables through Student's *t*-test, Mann-Whitney U test, or ANOVA, as appropriate. Overall survival and time-to-event curves were drawn using the method of Kaplan-Meier with a log-rank test for comparisons. Multivariate analyses of the factors predicting the different outcomes were carried out by Cox regression. A Cox regression model with a competing risk analysis (cumulative incidence), taking into account death as a competitor, was carried out in order to calculate time to acute myeloid leukemia. All statistical analyses were carried out with RStudio 2022.07.1 (554) and SPSS Statistics version 23 software.

3. Results

3.1. General Characteristics

A total of 175 patients were included in the study (PMF, $n = 81$ and SMF, $n = 94$). SMF corresponded to post-ET MF ($n = 53$) and post-PV MF ($n = 41$). In SMF, the median elapsed time from MPN diagnosis to MF was 13.3 years (range, 2–33 years) for PV and 10.4 years (range, 3–32 years) for ET. The median age at MF diagnosis was 66 years (range 24–93) and 85 cases (49%) were males. Disease genotype defined by driver mutations evaluated by conventional techniques (PCR or Sanger sequencing) was as follows: MF with *JAK2* mutation ($n = 113$, 65%), MF with *CALR* mutation ($n = 39$, 22%), MF with *MPL* mutation ($n = 8$, 5%) and triple-negative MF ($n = 15$, 9%). G-banding karyotype was available in 74 patients, and a normal karyotype was detected in 34 cases. Main cytogenetic alterations included 20q deletion ($n = 12$), 5q deletion ($n = 4$) and 7q deletion. A complex karyotype was seen in 3 cases and 1 case presented with 17p deletion, affecting *TP53*.

3.2. NGS Studies

JAK2 V617F mutation was detected in 114 patients. Additionally, 4 variants with conflicting interpretations were found in *JAK2* in 3 different patients: two variants in one case (T875N and F694S), and a single variant in the other 2 cases (R1063H and N1108S). Variant T875N was considered likely pathogenic and therefore used for genomic classification [17,18]; variants F694S and N1108S were classified as of uncertain significance and R1063H as likely benign.

Thirty-nine patients presented *CALR* mutations: type 1 ($n = 22$), type 2 ($n = 15$) and atypical mutations ($n = 2$). A high *CALR* VAF ($\geq 50\%$) was more frequently observed in patients with type 2 *CALR* mutations (9% versus 47% in type 1 and type 2, respectively, $p = 0.02$). Additional mutations in chromatin/spliceosome genes were observed in 20 cases (51%) whereas 3 cases (8%) presented *TP53* disruption/aneuploidy. The proportion of patients with high *CALR* VAF was similar among patients with and without additional mutations in chromatin/spliceosome genes.

MPL variants were detected in 15 patients, including 8 patients with pathogenic variant W515, 2 cases with likely pathogenic mutation S204P, and 5 patients with missense variants of undetermined significance in other positions: L465V ($n = 1$), R592Q ($n = 2$) and Y591D ($n = 2$). Five cases presented with *JAK2* and *MPL* co-mutation, four of them presented *JAK2* V617F with a non-canonical *MPL* variant and one case showed co-mutation of *MPL* W515L and *JAK2* V617F with VAF 83%, and 2%, respectively. Another case presented with co-mutation *MPL* L465V and *CALR* type 2 with 2% and 95% VAF, respectively. Additional mutations in chromatin/spliceosome genes were observed in 8 cases (53%). Among the 10 patients with *MPL* mutations located at W515/S204 positions, 6 cases (60%) presented additional mutations in chromatin/spliceosome genes.

In addition to *JAK2/CALR/MPL*, the most frequent mutated genes were *ASXL1* ($n = 41$, 23%), *TET2* ($n = 35$, 20%), *SRSF2* ($n = 19$, 11%), *U2AF1* ($n = 19$, 11%), *DNMT3A* ($n = 13$, 7%), *TP53* ($n = 12$, 7%), *EZH2* ($n = 12$, 7%), *SF3B1* ($n = 10$, 6%), *ZRSR2* ($n = 9$, 5%), *CBL* ($n = 7$, 4%), *KRAS* ($n = 6$, 3%), *SETBP1* ($n = 6$, 3%), *RUNX1* ($n = 4$, 2%), *PTPN11* ($n = 4$, 2%), *IDH2* ($n = 3$, 2%), *IDH1* ($n = 2$, 1%) and *NRAS* ($n = 2$, 1%). *SRSF2* ($p = 0.03$), *U2AF1* ($p = 0.05$), and *CBL* ($p = 0.05$) were more frequently mutated in PMF compared to SMF. Mutations in splicing genes (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*, and *ZRSR2*) were observed in 43% and 19% of patients with PMF and SMF, respectively ($p = 0.001$). Mutations in the RAS pathway (*KRAS*, *NRAS*, *CBL*) were also more frequent in PMF than in SMF (14% versus 4%, $p = 0.03$). Figure 1 shows which genes had pathogenic or likely pathogenic mutations in each case and the number of mutations per case, according to the type of MF.

3.3. Genomic Classification

Genomic classification according to the algorithm described by Grinfeld was as follows: MF with *TP53* disruption ($n = 16$, 9%), MF with a mutation in chromatin/spliceosome genes ($n = 72$, 41%), MF with homozygous *JAK2* mutation ($n = 37$, 21%), MF with heterozygous *JAK2* mutation ($n = 22$, 13%), MF with *CALR* mutation ($n = 19$, 11%), MF with *MPL* mutation ($n = 4$, 2%), MF with other mutation ($n = 2$, 1%) and MF with no known mutation ($n = 3$, 2%).

Triple-negative MF cases by conventional molecular techniques ($n = 15$) were reclassified by NGS as MF with *TP53* disruption ($n = 2$, 13%), MF with chromatin/spliceosome mutation ($n = 8$, 53%), MF with other mutation ($n = 1$, 7%), MF with no known mutation ($n = 3$, 20%) and other diagnoses ($n = 1$, 7%). Interestingly, a previously diagnosed PV with *JAK2* V617F showed the expansion of a clone with *TP53* mutation with unmutated *JAK2* at the moment of MF progression. *JAK2* V617F negativity at the moment of disease progression was confirmed by digital PCR. The patient with MF with other mutations presented a nonsense variant in *TET2* (R1516*, VAF 32%). The case that finally fulfilled the criteria for an alternative diagnosis showed an aberrant karyotype with t(8;9) and the fusion gene *PCM1::JAK2* was confirmed by NGS; therefore, it was finally reclassified as a myeloid/lymphoid neoplasm with *JAK2* rearrangement, with a clinical picture and bone marrow biopsy compatible with MPN.

The distribution of genomic categories according to MF subgroups is shown in Figure 2. MF with chromatin/spliceosome mutation was more frequent in PMF whereas MF with homozygous *JAK2* mutation and MF with *CALR* mutation prevailed in post-PV and post-ET MF, respectively. The main clinical and hematological characteristics of genomic categories are shown in Table 1.

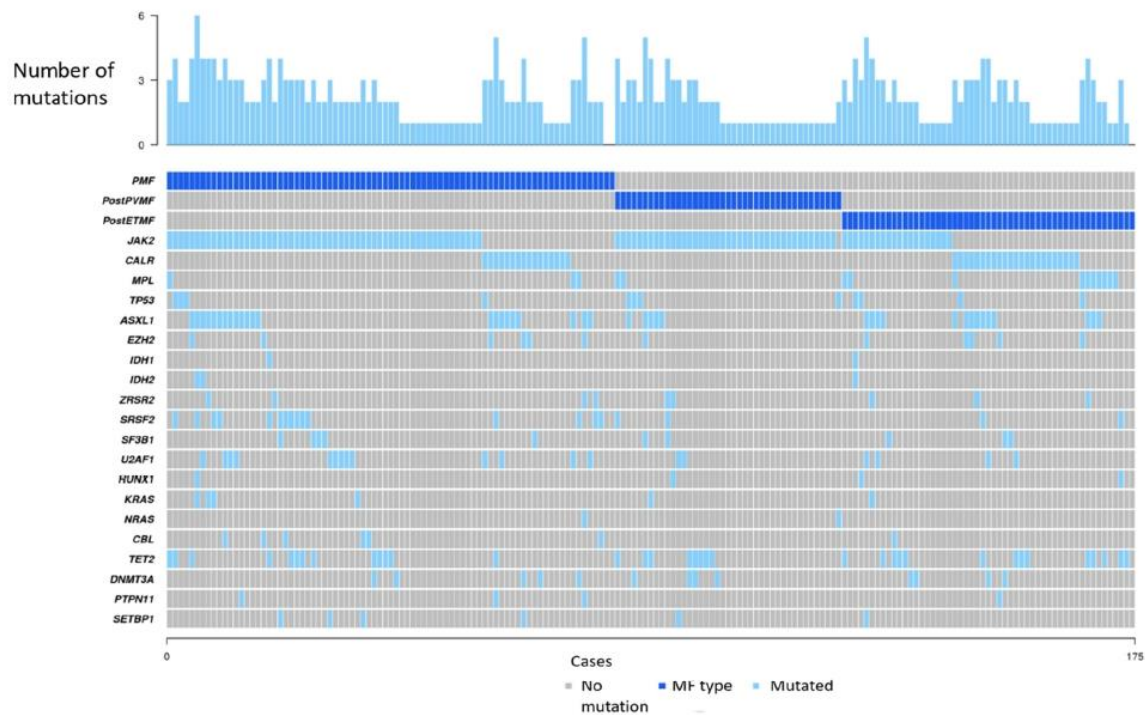


Figure 1. Targeted genes with pathogenic or likely pathogenic mutations in each case, according to the diagnosis of PMF, post-PV MF, or post-ET MF. At the top of the figure, the number of mutations in each case is presented, ranging from no mutation to 6 pathogenic/likely pathogenic mutations. Abbreviations: PMF: primary myelofibrosis. PostPVMF: post-polycythemia vera myelofibrosis. PostETMF: post essential thrombocythemia myelofibrosis.

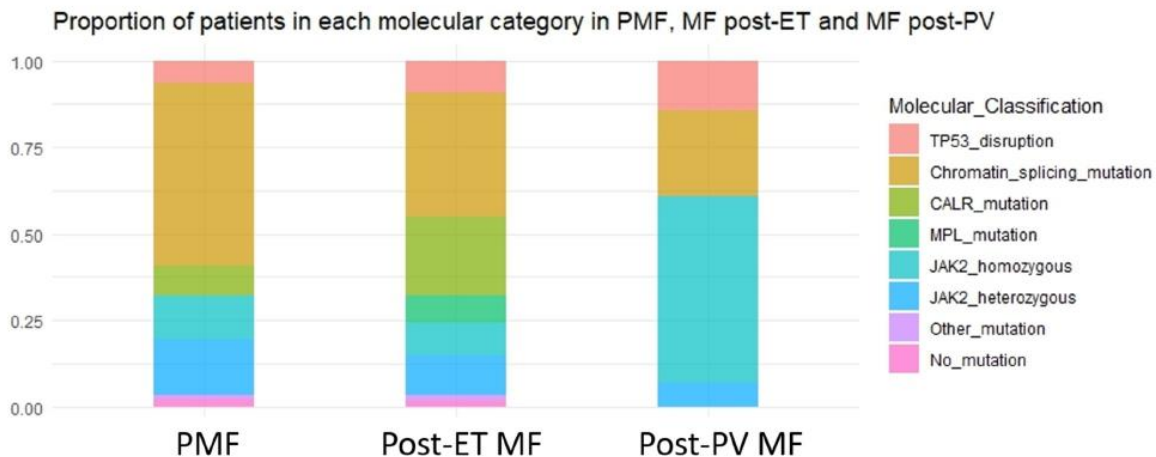


Figure 2. Distribution of patients in each molecular category according to myelofibrosis type: PMF: TP53 disruption/aneuploidy 6%, chromatin/spliceosome mutations 53%, CALR 9%, MPL 0%, homozygous JAK2 12%, heterozygous JAK2 16%, other mutation 1%, no mutation 2.5%. Post-ET MF: TP53 disruption/aneuploidy 9%, chromatin/spliceosome mutations 36%, CALR 23%, MPL 7.5%, homozygous JAK2 9%, heterozygous JAK2 11%, other mutation 2%, no mutation 2%. Groups were significantly different ($p < 0.0001$). Post-PV MF: TP53 disruption/aneuploidy 15%, chromatin/spliceosome mutations 24%, CALR 0%, MPL 0%, homozygous JAK2 54%, heterozygous JAK2 7%, other mutation 0%, no mutation 0%. Abbreviations: PMF: primary myelofibrosis. Post-PV MF: post-polycythemia vera myelofibrosis. Post-ET MF: post essential thrombocythemia myelofibrosis.

Table 1. Main clinical characteristics at diagnosis and outcomes in 175 patients with myelofibrosis according to genomic categorization.

	Global <i>n</i> = 175	<i>TP53</i> Disruption <i>n</i> = 16	Chromatin/ Splicing Mutation <i>n</i> = 72	<i>CALR</i> Mutation <i>n</i> = 19	<i>MPL</i> Mutation <i>n</i> = 4	<i>JAK2</i> Homozygous Mutation <i>n</i> = 37	<i>JAK2</i> Heterozygous Mutation <i>n</i> = 22	Other Mutation <i>n</i> = 2	No Mutation <i>n</i> = 3	<i>p</i> Value ¶
Age *	66 (24–93)	69 (42–88)	66 (31–89)	57 (24–86)	52 (39–62)	70 (35–88)	66 (25–93)	43 (43–44)	62 (48–78)	0.009
Male sex **	85 (49)	10 (62.5)	45 (62.5)	6 (32)	2 (50)	14 (38)	6 (27)	1 (50)	1 (33)	0.04
Type of MF **										
• Primary	81 (46)	5 (31)	43 (60)	7 (37)	-	10 (27)	13 (59)	1 (50)	2 (66)	
• Post-ET	53 (30)	5 (31)	19 (26)	12 (63)	4 (100)	5 (13.5)	6 (27)	1 (50)	1 (33)	
• Post-PV	41 (24)	6 (37.5)	10 (14)	-	-	22 (59.5)	3 (14)	-	-	
Symptomatic splenomegaly **	33 (19)	1 (6)	15 (21)	2 (10.5)	-	8 (22)	6 (27)	1 (50)	-	
Constitutional symptoms **	62 (35)	6 (37.5)	32 (44)	2 (10.5)	-	16 (43)	4 (18)	1 (50)	1 (33)	0.06
Hb, g/L *	106 (63–174)	102 (77–174)	104 (63–150)	102 (84–140)	105 (93–116)	116 (80–159)	108 (87–148)	120 (107–134)	90 (78–92)	0.05
WBC, ×10 ⁹ /L *	10.3 (2–148)	8.6 (2–41)	10 (2.2–133)	6.4 (2.5–26)	8.8 (5.3–15.4)	15.8 (2–148)	8 (4–23)	7.2 (5.2–9.2)	4.5 (4.1–4.6)	0.02
Platelets, ×10 ⁹ /L *	307 (18–1640)	157 (18–1640)	269 (35–1086)	467 (78–1359)	254 (112–684)	316 (41–849)	402 (64–1200)	248 (81–416)	255 (27–309)	ns
Transfusion dependence **	66 (38)	6 (37.5)	42 (58)	5 (26)	3 (75)	7 (20)	2 (9)	1 (50)	0 (0)	0.04
<i>JAKi</i> **	109 (62)	9 (56)	46 (64)	16 (84)	2 (50)	22 (59.5)	11 (50)	-	3 (100)	<0.0001
SRV at 5 years	63%	45%	59%	89%	100%	55%	67%	100%	100%	<0.0001
AML at 5 years	14%	49%	16%	0%	0%	13%	0%	0%	0%	0.001

* Median (range), ** *n* (%), ¶ *p* value corresponded to Chi-square, ANOVA, and Log-rank for categorical variables, continuous variables, and K-M estimates, respectively. Abbreviations: MF: myelofibrosis, ET: essential thrombocythemia, PV: polycythemia vera, Hb: Hemoglobin, WBC: white blood cells, *JAKi*: treatment with *JAK* inhibitors, SRV: survival, AML: progression to acute myeloid leukemia.

MF with *TP53* disruption/aneuploidy was more frequent in SMF than in PMF (12% versus 6%), although the difference was not significant. In 12 patients, mutations in *TP53* were detected by NGS whereas the remaining 4 patients were allocated in this category due to the presence of 5q deletion in G-banding karyotype. Three of these patients presented additional cytogenetic alterations including 7q deletion, 17p deletion, and a complex karyotype in one case each. Those cases with *TP53* mutation, VAF was significantly higher in SMF than in PMF (57% versus 14%, $p = 0.01$).

MF with mutations in chromatin/spliceosome genes represented the most frequent genomic group in PMF and in post-ET MF accounting for 53% and 36% of the patients, respectively, whereas in post-PV MF the frequency was 24%. Development of transfusion-dependent anemia was observed in 58% of these patients, being more frequent among those receiving JAK inhibitors. In multivariate analysis, patients with chromatin/spliceosome mutations were more likely to develop transfusion-dependent anemia (HR 2.9, 95%CI 1.7–5.0, $p < 0.0001$) adjusted by type of MF (HR 1.1, 95%CI 0.7–1.9, $p = 0.6$) and therapy with JAK inhibitors (HR 2.1, 95%CI 1.2–3.7, $p = 0.01$).

MF with homozygous *JAK2* mutation ($n = 40$, 23%) was observed in 54% of patients with post-PV MF. It was associated with advanced age and long-standing PV (median elapsed time from PV diagnosis to MF progression, 14.6 years). MF with heterozygous *JAK2* mutation ($n = 22$, 13%) was similarly distributed among PMF and SMF. MF with *CALR* mutation ($n = 19$, 11%) was equally represented by type 1 ($n = 10$) and type 2 ($n = 9$) *CALR* mutations and predominated among post-ET MF. There was a tendency for a higher proportion of high *CALR* VAF ($\geq 50\%$) in patients carrying type 2 mutations (56% versus 10% or type 2 and type 1 mutation, respectively, $p = 0.06$). A minority of cases belonged to other genomic categories: MF with *MPL* mutation ($n = 4$), MF with other mutation ($n = 2$), and MF with no known mutation ($n = 3$).

SF3B1 mutations, not included as a definitory aberration in the chromatin/spliceosome category, were detected in 10 patients (PMF $n = 5$, post-ET MF $n = 3$, post-PV MF $n = 2$). Three of these cases were allocated in the chromatin/spliceosome group due to the presence of concomitant mutations in one or more of the genes defining this category whereas the remaining cases were classified as MF with *CALR* mutation ($n = 3$), MF with *JAK2* heterozygous mutation ($n = 3$) and MF with homozygous *JAK2* mutation ($n = 1$). Five out of these 10 patients with *SF3B1* mutation (50%) developed transfusion-dependent anemia, median survival was 3.9 years, and a 5-year probability of acute myeloid leukemia (AML) of 14%.

The distribution of genomic subgroups according to risk stratification by IPSS for PMF and MYSEC for SMF is shown in Supplemental Figure S1. MF with *CALR* mutation, MF with *MPL* mutation, MF with heterozygous *JAK2* mutation, and MF with other mutations were classified predominantly in lower risk categories but the differences were not significant (Supplemental Figure S1).

3.4. Survival and Progression to Acute Myeloid Leukemia

With a mean follow-up of 6 years, 92 patients have died resulting in a median survival of 7.6 years. There were no significant differences in survival according to MF type (median survival 8.8, 7.3, and 7.9 years in PMF, post-PV MF, and post-ET MF, respectively). Survival was significantly different according to molecular classification (Figure 3). Median survival was 3.5, 6.2, 7.3, and 10.7 years, and not reached for MF with *TP53* disruption/aneuploidy, MF with chromatin/spliceosome mutations, MF with homozygous *JAK2* mutation, MF with *CALR* mutation, and MF with heterozygous *JAK2* mutation, respectively. Molecular high-risk categories, including patients with *TP53* disruption, chromatin/spliceosome mutations, and homozygous *JAK2* mutation, showed a higher risk of death (HR 2.6, 95%CI 1.4–4.9, $p = 0.003$) after correction by type of MF (HR 0.9, 95%CI 0.7–1.2, $p = 0.4$) and IPSS (HR 1.8, 95%CI 1.4–2.4, $p < 0.001$) (see Supplemental Table S4). When taking into account only cases with PMF, a higher risk of death was also detected in molecular high-risk categories (HR 2.8, 95%CI 1.1–7.2, $p = 0.03$) and cases with a higher IPSS (HR: 2.1, 95%CI 1.5–2.9, $p < 0.0001$). In

an analysis restricted to 39 cases of MF with *CALR* mutation, median survival was 9.6 years (7.9 years and 10.7 years in those with and without chromatin/spliceosome mutation, respectively, $p = 0.28$). High *CALR* VAF was associated with a tendency towards shorter survival (7.1 years and 15.6 years in patients with high and low *CALR* VAF, respectively, $p = 0.06$). In multivariate analysis, high *CALR* VAF was associated with a higher risk of death (HR 2.9, 95%CI 1.04–8.3, $p = 0.04$), after adjusting by the presence of mutations in chromatin/spliceosome genes (HR 1.9, 95%CI 0.75–4.9, $p = 0.2$).

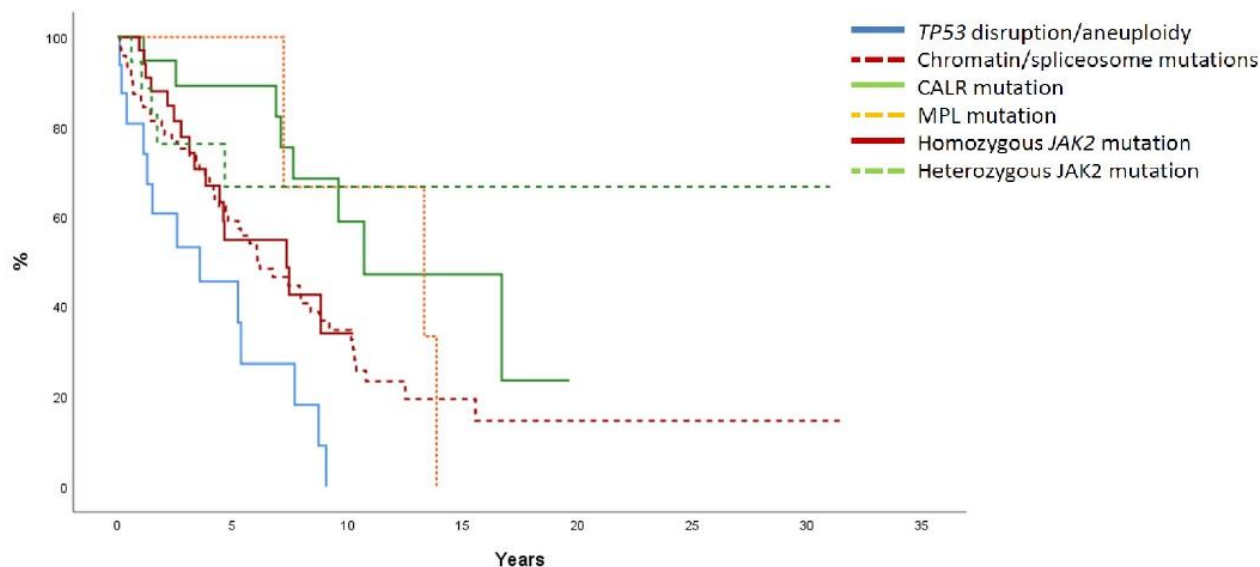


Figure 3. Overall survival in 175 patients with myelofibrosis (MF) according to genomic classification. Kaplan-Meier estimates according to genomic classification. MF with *TP53* disruption/aneuploidy (solid blue line): median survival 3.5 years. MF with chromatin/spliceosome mutations (dotted red line): median survival 6.1 years. MF with homozygous *JAK2* mutation (solid red line): median survival 7.3 years. MF with *CALR* mutation (solid green line): median survival 10.7 years. MF with *MPL* mutation (dotted orange line): median survival 13.3 years. MF with heterozygous *JAK2* mutation (dotted green line): median survival not reached. $p < 0.0001$.

Twenty cases progressed to AML and no differences were observed in the probability of AML according to MF type. These 20 cases corresponded to the following genomic categories: *TP53* disruption/aneuploidy ($n = 6$), chromatin/spliceosome mutations ($n = 11$), and homozygous *JAK2* mutation ($n = 3$), with no case of AML progression recorded in the remaining genomic categories. Five-year probability of AML was 49%, 16%, and 13% for MF with *TP53*, chromatin/spliceosome mutation, and *JAK2* homozygous mutation, respectively ($p = 0.001$ for the comparison according to molecular classification, Figure 4). Those with *TP53* disruption/aneuploidy showed a higher risk of AML (HR 5.7, 95%CI 1.8–18.4, $p = 0.004$) corrected by IPSS (HR 2.0, 95%CI 1.1–3.5, $p = 0.01$) (see Supplemental Table S5).

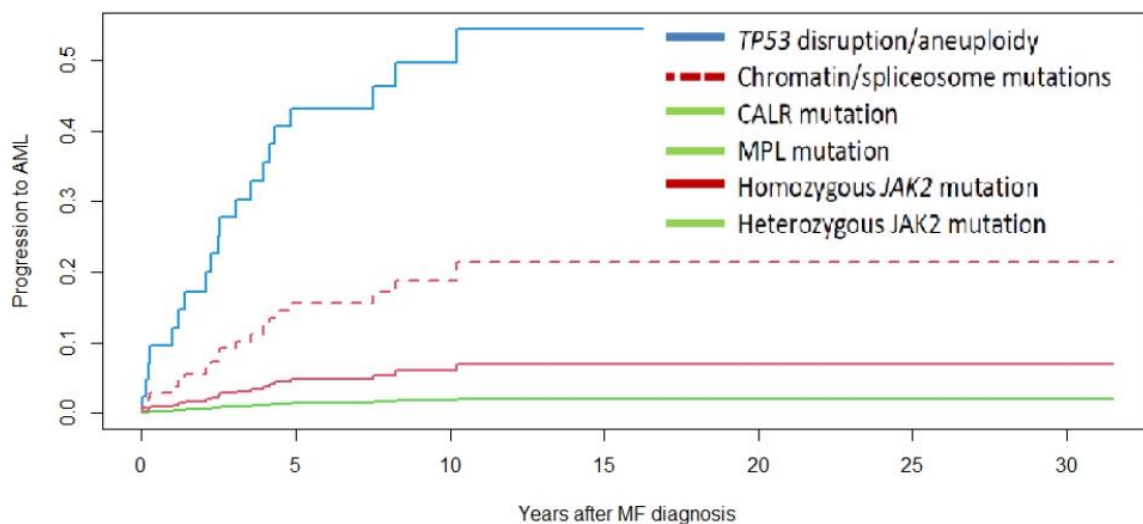


Figure 4. Time to acute myeloid leukemia in 175 patients with myelofibrosis (MF) according to genomic classification. A Cox regression model with a competing risk analysis, taking into account death as a competitor of progression to acute myeloid leukemia has been carried out. MF with *TP53* disruption/aneuploidy (solid blue line). MF with chromatin/spliceosome mutations (dotted red line). MF with homozygous *JAK2* mutation (solid red line). MF with *CALR* mutation, MF with *MPL* mutation, and MF with heterozygous *JAK2* mutation (solid green line). $p < 0.0001$.

4. Discussion

In the present work, we have analyzed the molecular classification proposed by Grinfeld et al. [10] in a large series of patients with MF from a single institution. To the best of our knowledge, this is the first study aimed to apply this classification taking into account the type of MF. In such genomic classification, 8 genomic categories with different clinical characteristics and outcomes were established after analyzing 2035 MPN patients, 309 of them with MF. In our series MF with chromatin/spliceosome mutations was the most frequent genomic subgroup, accounting for 41% of the patients followed by homozygous *JAK2* mutation in 21%, whereas heterozygous *JAK2* mutation and *CALR* mutation represented the third and fourth group being observed in 13% and 11% of cases, respectively. These figures are superimposable to that reported by Grinfeld et al., except for a lower frequency of heterozygous *JAK2* mutation in our series. Moreover, genomic subgroups including MF with *MPL* mutation, MF with other mutation, or MF with no known mutation were infrequent, representing only 5% of MF patients.

Genomic classification was significantly different according to the type of MF, confirming different molecular pathways for disease origin and progression in PMF and SMF. The conception of PMF and SMF as different biological entities was particularly illustrative in post-PV MF, where the presence of the homozygous *JAK2* mutation was the hallmark of the disease in most cases. Moreover, the higher frequency of *TP53* disruption/aneuploidy in SMF in our study, a genomic subgroup associated with shorter survival and progression to AML, further supports the separation of these two entities. These findings are in concordance with a recent publication in which a different impact of *ASXL1* mutations was found in PMF and SMF [19].

Mutations in chromatin/spliceosome genes were present in 53%, and 36% of PMF and post-ET MF, respectively. Clinically, this molecular subgroup was characterized by the development of transfusion-dependent anemia and was associated with shorter survival and AML progression. Of note, the inclusion of mutations affecting the RAS pathway (*KRAS*, *NRAS*, *CBL*) in this subgroup increases the number of high-risk mutations to take into consideration in MF since the majority of NGS-based prognostic risk models restrict high-risk mutations to *ASXL1/U2AF1/SRSF2/EZH2/IDH1/IDH2* genes [20–22]. However,

the Grinfeld algorithm and a recent French study including 479 MF patients, both applying Bayesian analysis, identified mutations in the RAS pathway as an adverse prognostic factor [10,23]. Moreover, Coltro et al. reported mutations in the RAS pathway in 13% of patients with MF, being associated with adverse phenotypic features, lower response to JAK inhibitors, and lower survival, especially in PMF [24]. In addition, Loscoco et al. reported *SF3B1* mutations in 7% and 5% of PMF and SMF, respectively, being associated with reduced survival in SMF [25]. We observed *SF3B1* mutations in 10 cases (6%), with these patients showing a higher rate of transfusion-dependent anemia and reduced survival, similar to that observed in patients included in the chromatin/spliceosome category. Our results and others strongly support the inclusion of *SF3B1* mutations as definitory of the chromatin/spliceosome group.

It has been observed that MF with *CALR* type-1 mutation showed longer survival than those with type-2 mutation [26,27]. In addition, shorter survival and anemia were associated with higher *CALR* VAF in a study including 121 patients with *CALR*-mutated MF, suggesting a more advanced disease [28]. However, high VAF *CALR*-mutated patients were significantly enriched with *ASXL1* mutations indicating that patients with high *CALR* VAF mostly corresponded to MF with chromatin/spliceosome mutations. In contrast, in our series a high *CALR* VAF was more frequently observed in type-2 than in type-1 and was not significantly different according to the presence of chromatin/spliceosome mutations. Moreover, *CALR*-high patients showed an increased risk of death corrected by co-mutations in chromatin/spliceosome genes. These results suggest that homozygosity of the *CALR* mutation might be prognostically relevant explaining in part the shorter survival reported in *CALR* type-2 patients [26,27]. However, the limited number of patients in our study precludes a firm conclusion in this regard.

JAK2-mutated patients showed clear clinical differences according to VAF. Outcomes in MF patients with homozygous *JAK2* mutation were similar to those classified in the chromatin/spliceosome group in terms of survival and AML progression, supporting the inclusion of these patients in the molecular high-risk MF group. In contrast, MF with heterozygous *JAK2* mutation showed the longest survival among the different genomic categories and no case progressed to AML, indicating that these cases might be considered as low-risk MF. Finally, very few patients were classified as MF with *MPL* mutation since the majority of *MPL*-mutated patients also carried mutations in one or more genes included in the chromatin/spliceosome group. Similarly, MF with other driver mutations and MF with no known mutation were uncommon representing less than 5% of the patients.

The main limitations of the present study include its retrospective design and a limited number of patients, which makes it difficult to convincingly interpret the meaning of the molecular classification taking into account the type of MF. Another limitation is that cytogenetic information was not available in a significant proportion of patients and that very unfrequently mutated genes included in the genomic category were not included in our targeted NGS.

This would require collaborative efforts in order to have a high number of patients in each of the 8 molecular groups for each type of MF. However, this work is a good representation of a reference center with a special dedication to the study and treatment of MF.

5. Conclusions

Genomic classification confirmed different molecular pathways for disease origin and progression between PMF and SMF. Genomic classification provides relevant information in relation to disease phenotype and outcomes, including progression to acute leukemia. This can be helpful for patient management and therapeutic decisions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15153904/s1>, Table S1: Risk factors and stratification of myelofibrosis according to IPSS and MYSEC-PM; Table S2: List of genes included in the Next-Generation Sequencing panels that were used; Table S3: Pathogenic and likely pathogenic variants found in the analysis, including allele frequency, manual categorization of the variants and the panel used; Table S4: Multivariate analysis of risk factors for survival according to type of myelofibrosis; Table S5: Multivariate analysis of risk factors for progression to acute leukemia according to type of myelofibrosis; Figure S1: Distribution of patients in each molecular category according to risk stratification.

Author Contributions: M.G.: designed the study, collected the data, performed the molecular analysis and the statistical analysis, analyzed, and interpreted the results and wrote the paper. M.L.-G. and D.C. performed the molecular studies, interpreted the results, and approved the final version. E.A.-R. collected the clinical data, interpreted the results, and wrote the paper. M.R. performed the histological studies, interpreted the results, and approved the final version. S.C., F.G., M.S., A.T. collected the data, interpreted the results, and approved the final version. F.C. collected the data, interpreted the results, and wrote the paper. A.Á.-L. designed the study, collected the data, performed the statistical analysis, analyzed, and interpreted the results and wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by FIS PI18/00205 and PI21/00231 from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), through the Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación (FEDER). We also received a grant from the Spanish MPN group (GEMFIN) for NGS.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Hospital Clínic Barcelona (HCB/2017/0789, 16 October 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data that has been generated during this research project is available from the corresponding author upon reasonable requests. Additional information can be found in Supplemental data files.

Acknowledgments: We are indebted to the Genomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS) for NGS sequencing support. We are indebted to GEMFIN (Spanish MPN group) for their financial support and technical assistance in database management.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cervantes, F. How I treat myelofibrosis. *Blood* **2014**, *124*, 2635–2642. [CrossRef]
2. Pastor-Galán, I.; Hernández-Boluda, J.C.; Correa, J.G.; Alvarez-Larrán, A.; Ferrer-Marín, F.; Raya, J.M.; Ayala, R.; Velez, P.; Pérez-Encinas, M.; Estrada, N.; et al. Clinico-biological characteristics of patients with myelofibrosis: An analysis of 1000 cases from the Spanish Registry of Myelofibrosis. *Med. Clin.* **2020**, *155*, 152–158. [CrossRef]
3. Barbui, T.; Tefferi, A.; Vannucchi, A.M.; Passamonti, F.; Silver, R.T.; Hoffman, R.; Verstovsek, S.; Mesa, R.; Kiladjian, J.J.; Hehlmann, R.; et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: Revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia* **2018**, *32*, 1057–1069. [CrossRef]
4. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.P.; Borowitz, M.; Calvo, K.R.; Kvasnicka, H.M.; Wang, S.A.; Bagg, A.; Barbui, T.; Branford, S.; et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: Integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* **2022**, *140*, 1200–1228. [CrossRef] [PubMed]
5. Rumi, E.; Pietra, D.; Pascutto, C.; Guglielmelli, P.; Martínez-Trillos, A.; Casetti, I.; Colomer, D.; Pieri, L.; Pratcorona, M.; Rotunno, G.; et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* **2014**, *124*, 1062–1069. [CrossRef] [PubMed]
6. Passamonti, F.; Mora, B.; Giorgino, T.; Guglielmelli, P.; Cazzola, M.; Maffioli, M.; Rambaldi, A.; Caramella, M.; Komrokji, R.; Gotlib, J.; et al. Driver mutations' effect in secondary myelofibrosis: An international multicenter study based on 781 patients. *Leukemia* **2017**, *31*, 970–973. [CrossRef]
7. Finazzi, M.C.; Carobbio, A.; Cervantes, F.; Isola, I.M.; Vannucchi, A.M.; Guglielmelli, P.; Rambaldi, A.; Finazzi, G.; Barosi, G.; Barbui, T. CALR mutation, MPL mutation and triple negativity identify patients with the lowest vascular risk in primary myelofibrosis. *Leukemia* **2015**, *29*, 1209–1210. [CrossRef]

8. Chowdhury, O.; O'Sullivan, J.; Barkas, N.; Wang, G.; Buck, G.; Hamblin, A.; Tefferi, A.; Al-Ali, H.K.; Barosi, G.; Devos, T.; et al. Spliceosome mutations are common in persons with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis with RBC-transfusion-dependence and correlate with response to pomalidomide. *Leukemia* **2021**, *35*, 1197–1202. [\[CrossRef\]](#)
9. Vannucchi, A.M.; Lasho, T.L.; Guglielmelli, P.; Biamonte, F.; Pardanani, A.; Pereira, A.; Finke, C.; Score, J.; Gangat, N.; Mannarelli, C.; et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* **2013**, *27*, 1861–1869. [\[CrossRef\]](#)
10. Grinfeld, J.; Nangalia, J.; Baxter, E.J.; Wedge, D.C.; Angelopoulos, N.; Cantrill, R.; Godfrey, A.L.; Papaemmanuil, E.; Gundle, G.; MacLean, C.; et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1416–1430. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Courtier, F.; Garnier, S.; Carbuccia, N.; Guille, A.; Adélaide, J.; Chaffanet, M.; Hirsch, P.; Paz, D.L.; Slama, B.; Vey, N.; et al. Targeted molecular characterization shows differences between primary and secondary myelofibrosis. *Genes Chromosomes Cancer* **2020**, *59*, 30–39. [\[CrossRef\]](#)
12. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.J.; Le Beau, M.M.; Bloomfield, C.D.; Cazzola, M.; Vardiman, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2391–2405. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. 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. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* **2009**, *113*, 2895–2901. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Passamonti, F.; Giorgino, T.; Mora, B.; Guglielmelli, P.; Rumi, E.; Maffioli, M.; Rambaldi, A.; Caramella, M.; Komrokji, R.; Gotlib, J.; et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia* **2017**, *31*, 2726–2731. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Papaemmanuil, E.; Gerstung, M.; Bullinger, L.; Gaidzik, V.I.; Paschka, P.; Roberts, N.D.; Potter, N.E.; Heuser, M.; Thol, F.; Bolli, N.; et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 2209–2221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Papaemmanuil, E.; Gerstung, M.; Malcovati, L.; Tauro, S.; Gundle, G.; Van Loo, P.; Yoon, C.J.; Ellis, P.; Wedge, D.C.; Pellagatti, A.; et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2013**, *122*, 3616–3627. [\[CrossRef\]](#)
17. Chen, C.; Li, F.; Ma, M.M.; Zhang, S.; Liu, Y.; Yan, Z.L.; Chen, W.; Cao, J.; Zeng, L.Y.; Wang, X.Y.; et al. Roles of T875N somatic mutation in the activity, structural stability of JAK2 and the transformation of OCI-AML3 cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *137*, 1030–1040. [\[CrossRef\]](#)
18. Yoshimitsu, M.; Hachiman, M.; Uchida, Y.; Arima, N.; Arai, A.; Kamada, Y.; Shide, K.; Ito, M.; Shimoda, K.; Ishitsuka, K. Essential thrombocytosis attributed to JAK2-T875N germline mutation. *Int. J. Hematol.* **2019**, *110*, 584–590. [\[CrossRef\]](#)
19. Guglielmelli, P.; Coltro, G.; Mannelli, F.; Rotunno, G.; Loscocco, G.G.; Mannarelli, C.; Maccari, C.; Paoli, C.; Romagnoli, S.; Bartalucci, N.; et al. ASXL1 mutations are prognostically significant in PMF, but not MF following essential thrombocythemia or polycythemia vera. *Blood Adv.* **2022**, *6*, 2927–2931. [\[CrossRef\]](#)
20. Guglielmelli, P.; Lasho, T.L.; Rotunno, G.; Mudireddy, M.; Mannarelli, C.; Nicolosi, M.; Pacilli, A.; Pardanani, A.; Rumi, E.; Rosti, V.; et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients with Primary Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 310–318. [\[CrossRef\]](#)
21. Tefferi, A.; Guglielmelli, P.; Lasho, T.L.; Gangat, N.; Ketterling, R.P.; Pardanani, A.; Vannucchi, A.M. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 1769–1770. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Tefferi, A.; Guglielmelli, P.; Nicolosi, M.; Mannelli, F.; Mudireddy, M.; Bartalucci, N.; Finke, C.M.; Lasho, T.L.; Hanson, C.A.; Ketterling, R.P.; et al. GIPSS: Genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia* **2018**, *32*, 1631–1642. [\[CrossRef\]](#)
23. Luque Paz, D.; Riou, J.; Verger, E.; Cassinat, B.; Chauveau, A.; Ianotto, J.C.; Dupriez, B.; Boyer, F.; Renard, M.; Mansier, O.; et al. Genomic analysis of primary and secondary myelofibrosis redefines the prognostic impact of ASXL1 mutations: A FIM study. *Blood Adv.* **2021**, *5*, 1442–1451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Coltro, G.; Rotunno, G.; Mannelli, L.; Mannarelli, C.; Fiaccabrino, S.; Romagnoli, S.; Bartalucci, N.; Ravenda, E.; Gelli, E.; Sant'Antonio, E.; et al. RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are associated with poor prognostic features. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 3677–3687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Loscocco, G.G.; Guglielmelli, P.; Mannelli, F.; Mora, B.; Mannarelli, C.; Rotunno, G.; Pancani, F.; Maccari, C.; Bartalucci, N.; Romagnoli, S.; et al. SF3B1 mutations in primary and secondary myelofibrosis: Clinical, molecular and prognostic correlates. *Am. J. Hematol.* **2022**, *97*, 347–349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Tefferi, A.; Nicolosi, M.; Mudireddy, M.; Szuber, N.; Finke, C.M.; Lasho, T.L.; Hanson, C.A.; Ketterling, R.P.; Pardanani, A.; Gangat, N.; et al. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. *Am. J. Hematol.* **2018**, *93*, 348–355. [\[CrossRef\]](#)

27. Tefferi, A.; Lasho, T.L.; Tischer, A.; Wassie, E.A.; Finke, C.M.; Belachew, A.A.; Ketterling, R.P.; Hanson, C.A.; Pardanani, A.D. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood* **2014**, *124*, 2465–2466. [[CrossRef](#)]
28. Guglielmelli, P.; Maccari, C.; Sordi, B.; Balliu, M.; Atanasio, A.; Mannarelli, C.; Capecchi, G.; Sestini, I.; Coltro, G.; Loscocco, G.G.; et al. Phenotypic correlations of CALR mutation variant allele frequency in patients with myelofibrosis. *Blood Cancer J.* **2023**, *13*, 21. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5. Discussió

Els treballs que constitueixen aquesta tesi s'han centrat en l'estudi de situacions clíniques específiques dins de les NMP – el primer treball en la PV i la TE que debuten amb trombosi esplàcnica i el segon treball en la comparació de la MFP, la MF post-PV i la MF post-TE. Per tal de poder correlacionar les dades clíniques i pronòstiques amb la informació genòmica, es van caracteritzar els casos mitjançant l'aplicació de panells de NGS, que analitzen gens recurrentment mutats en neoplàsies mieloides. S'han volgut tenir en compte les dades genòmiques d'una manera integral i no avaluar l'impacte pronòstic individual de cada un dels gens mutats, pel que s'ha implementat en cada un dels estudis la classificació genòmica proposada per Grinfeld et al. l'any 2018 (14). Com s'ha comentat amb anterioritat, es tracta d'una classificació jeràrquica de 8 categories, en la qual es tenen en compte no tan sols les alteracions genòmiques, sinó també les citogenètiques. En aquesta classificació, aquelles alteracions que confereixen un pitjor pronòstic, com les disrupcions de *TP53* i les mutacions de gens de *splicing*/cromatina, prevalen a la classificació per sobre de les mutacions *driver*. Una altra característica a ressaltar és que, en absència d'alteracions de mal pronòstic, les NMP amb mutació de *JAK2* es divideixen en dos grups, en funció de si la mutació es troba en situació d'homozigosi o d'heterozigosi. En el nostre cas, en tractar-se d'informació genòmica mitjançant NGS s'han dividit els casos en funció de la VAF de *JAK2* ($\geq 50\%$ i $< 50\%$).

S'ha pogut constatar que la classificació de Grinfeld permet identificar aquells pacients amb pitjor pronòstic en aquests subgrups de NMP, que sovint es troben poc representats en estudis pronòstics més generals. Un altre aspecte rellevant que s'ha pogut valorar és que aquesta caracterització i classificació genòmica no és útil únicament en la predicció de la progressió de la malaltia, sinó que també és un bon predictor pel que fa a fenòmens trombòtics. En els següents apartats s'exposa una discussió detallada de cada un dels articles que componen la tesi i, per últim, una discussió conjunta sobre la classificació molecular en les NMP.

5.1. Classificació genòmica en pacients joves amb PV i TE en funció de la presència de TVE i la seva cronologia

La TVE és un fenomen extremadament poc freqüent fora del context de la cirrosi hepàtica, el càncer hepàtic o les NMP. Dins de les NMP, en canvi, pot afectar al voltant d'un 5% dels pacients, en diferents moments de la malaltia. Cada cop és més clar que les NMP que debuten amb una TVE tenen un perfil demogràfic i clínic específic, essent pacients més joves, amb una NMP menys expressiva a nivell clínic i amb un risc trombòtic elevat. En tractar-se sobretot de pacients joves, en una situació clínica complexa, sobretot pel fet d'haver desenvolupat la TVE, sembla fonamental tenir una comprensió global de la malaltia, que inclogui el perfil i la classificació genòmica. Cal ressaltar que les característiques demogràfiques i clíniques diferenciades dels pacients amb NMP i TVE semblen restringir-se a aquells pacients que desenvolupen la TVE a l'inici de la NMP. Així i tot, molts dels treballs en aquest camp no fan aquesta distinció cronològica, cosa que pot haver portat a biaixos en les troballes. El motiu principal pel qual això ocórrer és que, degut a que es tracta d'una situació clínica poc habitual, hi ha tendència a formar grups de pacients heterogenis.

En aquesta direcció, en el nostre treball hem portat a terme una descripció clínica, pronòstica i genòmica d'una sèrie àmplia de pacients amb NMP i trombosi esplàcnica, separant els casos en funció de si la TVE es produeix prèviament, en el moment del diagnòstic de la NMP o bé durant la seva evolució. La publicació s'ha centrat en els casos amb mutació de *JAK2* amb diagnòstic de PV, TE i NMP-U, ja que el nombre de casos amb diagnòstic de MFP o amb altres mutacions *driver* era molt baix.

Fins on arriba el nostre coneixement, es tracta d'una de les sèries més grans publicades de pacients amb NMP i TVE que inclou el perfil genòmic. A més, hem portat a terme una caracterització genòmica d'un grup control de pacients amb NMP amb edat similar, mateix sexe, mateix tipus de NMP i mutació *driver*, per tal de poder fer una comparativa. Hem decidit fer una selecció demogràfica i clínica del grup control per tal d'evitar biaixos a l'hora de veure diferències i controlar aquelles variables que se sap que influeixen en el risc de trombosi, en la supervivència o el perfil genòmic, com són l'edat, el tipus de NMP o el tipus de mutació *driver*.

Els nostres resultats indiquen que la PV i la TE que debuten amb TVE tenen una VAF de *JAK2* més baixa i una menor proporció de mutacions patogèniques/probablement patogèniques addicionals, que aquells pacients que no debuten amb una TVE, amb el mateix diagnòstic i les mateixes característiques demogràfiques. Aquesta complexitat molecular menor pot ésser, almenys de manera parcial, el motiu pel qual els pacients que debuten amb TVE presenten una menor expressió analítica al diagnòstic (102,105,108). Aquestes troballes van en congruència amb treballs ja publicats, ens els quals s'ha descrit que alguns pacients amb NMP que debuten amb TVE presenten valors d'hemograma normals al moment del diagnòstic (96,102,106). Això pot explicar per què en aquest grup de pacients hi ha una proporció elevada de NMP-U, que, en general, es troben en aquesta categoria per trobar-se en estadis precoços de la malaltia, en els quals els valors analítics o les troballes a la biòpsia de moll d'os encara no són prou expressives per encaixar en una categoria diagnòstica concreta (7).

En el nostre treball, el 19% dels pacients que debuten amb TVE van ésser classificats com a NMP-U, principalment degut a l'absència d'eritrocitosi i/o trombocitosi. En publicacions prèvies, s'ha generat la hipòtesi que això pot ser degut a la hipervolemia, l'hemodilució o l'hiperesplenisme, els quals es desenvolupen arrel de la malaltia hepàtica causada per la TVE (109). Tot i que això pot ser parcialment cert, els nostres

resultats genòmics recolzen la hipòtesi que les NMP que debuten amb TVE es troben en estadis molt inicials, en els quals un petit clon de *JAK2* V617F sense adquisició successiva d'altres mutacions encara no s'ha pogut desenvolupar prou per causar un quadre de NMP establerta. Aquesta hipòtesi també es recolza en el fet que els pacients tinguin edats mitjanes substancialment més baixes que la majoria de pacients amb NMP i en que hi ha molt pocs pacients amb MF establerta amb TVE al debut, una malaltia més avançada i més complexa a nivell genòmic. Recentment, s'ha publicat un treball que demostra que l'adquisició de la mutació de *JAK2* pot precedir el desenvolupament de la NMP en dècades (17). Addicionalment, és conegut que els individus amb hematopoesi clonal tipus *CHIP* amb la mutació de *JAK2* V617F com a marcador clonal tenen un risc més elevat de trombosi, tot i tenir un hemograma dins de la normalitat (60). La informació aportada per aquests treballs recolza la nostra hipòtesi.

En general, el pronòstic en les NMP ve determinat pel tipus de NMP, sobretot la MF, en la qual la mortalitat està directament relacionada amb la progressió de la malaltia (100,104,107). El perfil genòmic té un paper fonamental en aquesta progressió i en el pronòstic de la malaltia, però sembla tenir un significat particular en aquells pacients que debuten amb TVE. Amb l'aplicació de l'algoritme de Grinfeld, el 87% de les NMP que debuten amb TVE en el nostre treball entren dins la categoria diagnòstica de NMP amb mutació de *JAK2* en heterozigosi, una categoria associada a baix risc de progressió i a pronòstic favorable (14). Així i tot, en la PV/TE que debuten amb una TVE, tot i que el risc de progressió de la malaltia és baix, això no mostra una correlació directa amb el pronòstic dels pacients, ja que aquests mostren 3 vegades més risc de mort i una supervivència lliure de qualsevol tipus d'esdeveniment més curta, si ho comparem amb el grup de NMP control i ho ajustem per edat, sexe i risc molecular. En aquest projecte, es posa de manifest que el pronòstic dels pacients que debuten amb TVE ve determinat fonamentalment per complicacions diferents a la progressió de la malaltia, com són la

trombosi venosa, el sagnat major o la malaltia hepàtica. Com a resultat d'aquestes complicacions, aquest grup de pacients presenta una supervivència menor que el grup control de NMP, amb edat, sexe i tipus de NMP comparables.

És conegut que els pacients amb NMP i TVE tenen un risc molt elevat de presentar un nou fenomen trombòtic, tot i el tractament citoreductor i anticoagulant (100,102,103). La nostra publicació evidencia que les NMP que debuten amb TVE tenen un risc 8 vegades superior de presentar un nou fenomen trombòtic de qualsevol tipus, tot i no haver-hi diferències significatives en la proporció de pacients amb teràpia citoreductora i que la gran majoria de pacients amb TVE del treball estaven sota tractament anticoagulant. En aquest punt, cal destacar que en els pacients amb TVE de debut, la classificació genòmica és una bona eina per identificar aquells casos amb major risc trombòtic, ja que es va veure que els casos classificats en categories d'alt risc molecular (NMP amb disrupció de *TP53*, mutacions de cromatina o *splicing* o mutació de *JAK2* en homozigosi) tenien una probabilitat gairebé 6 vegades més alta de desenvolupar un nou fenomen trombòtic comparat amb aquells que debutaven amb TVE dins la categoria de *JAK2* en heterozigosi.

En l'anàlisi de la cohort global, incloent els casos sense TVE, hem pogut determinar que la presència de mutacions DTA és un factor de risc independent pel desenvolupament de trombosis arterials, tal i com ja s'havia postulat en treballs anteriors portats a terme en pacients diagnosticats de NMP de qualsevol edat (60,93). Aquesta informació té rellevància, ja que el nostre treball inclou un grup prou ampli de pacients joves amb NMP, en els quals el desenvolupament de fenòmens trombòtics arterials no és habitual. Això posa de manifest la utilitat de la NGS en la predicció de la trombosi arterial en pacients que per les estratificacions clàssiques s'ubicarien en categories de baix risc trombòtic. Finalment, tal i com ja s'havia vist en treballs publicats, el perfil i classificació

genòmica ha permès globalment predir amb precisió la progressió i transformació de la malaltia (14,106).

La informació exposada en els paràgrafs previs reforça la rellevància de portar a terme la caracterització genòmica en la PV i la TE en situacions específiques, com és el cas de pacients joves que, a més, es troben en un context complex, com és el debut amb TVE. En aquests casos, el perfil genòmic pot permetre fer prediccions acurades en relació a la trombosi arterial, la re-trombosi i la progressió de la malaltia. És possible que la informació genòmica relacionada amb la VAF de la mutació *driver* i les mutacions addicionals s'incorpori en les decisions terapèutiques en el futur, sobretot en aquells casos on el balanç entre el risc hemorràgic i el trombòtic sigui un repte o aquells pacients en els quals hi hagi un elevat risc de progressió de la malaltia. De cara a investigacions futures, seria d'interès veure quina influència tenen, a més de la informació genòmica, les dades citogenètiques en aquest subgrup de pacients.

Pel que fa a la PV o la TE amb TVE durant l'evolució de la malaltia, hem vist que tenen unes característiques clíniques molt similars a aquells pacients amb PV/TE sense TVE, excepte en la prevalença d'esplenomegàlia al diagnòstic, que és superior en els casos amb TVE evolutiva. A nivell genòmic, cal destacar que les PV/TE i TVE evolutiva és el grup amb una complexitat més alta, amb una càrrega de *JAK2* més elevada i un nombre més alt de mutacions addicionals, pel que una proporció major de pacients han estat categoritzats d'alt risc molecular, cosa que podria explicar, almenys parcialment, per què aquests pacients han desenvolupat una TVE durant l'evolució de la malaltia. Aquestes troballes fan palesa la importància de separar els pacients amb TVE per la seva cronologia, ja que es tracta de situacions clíniques amb *backgrounds* genètics diferenciats. Aquesta situació pot explicar les diferències pronòstiques amb altres estudis, en els quals no han fet aquesta separació cronològica.

Un treball del grup francès (106) va documentar que un 29% de pacients presentaven alt risc molecular (*JAK2* V617F amb una VAF $\geq 50\%$ o mutacions a *TP53* o a gens de cromatina/*splicing*) en una sèrie de 80 pacients amb NMP i TVE, i que incloïa 5 pacients amb MFP, 4 pacients amb mutació de *CALR* i 7 pacients en els quals la TVE era evolutiva. En la nostra sèrie, en la qual no hem inclòs aquells pacients amb mutació de *CALR* ni amb diagnòstic de MFP, el % de pacients amb alt risc molecular és del 13% en aquells amb TVE al debut de la NMP i del 52% en aquells que van presentar TVE evolutiva. Tot i que els dos treballs mostren diferències en el disseny, ambdues publicacions recolzen el fet que l'avaluació del risc mitjançant la classificació molecular dels casos és útil per fer prediccions en relació a la progressió de la malaltia i al risc trombòtic en pacients joves amb PV i TE.

Les principals limitacions del nostre treball són que es tracta d'un disseny retrospectiu, que falta informació citogenètica que permet afinar la classificació genòmica en una gran part dels pacients i que alguns gens (*CUX1*, *PHF6*, *GNAS*, *STAG2*) amb implicacions pronòstiques no estaven inclosos en el panell de NGS utilitzat.

Tot i les limitacions esmentades, creiem que el nostre treball aporta informació rellevant en quant a pronòstic i informació genòmica en aquest subgrup de NMP, constituït majoritàriament per pacients joves en una situació complexa a nivell clínic, en els quals un abordatge personalitzat sembla clau.

5.2. Classificació genòmica de pacients amb MFP i MFS

La mielofibrosi és una malaltia que s'ha estudiat àmpliament, tant a nivell pronòstic com molecular. Així i tot, es tracta d'una entitat poc freqüent i heterogènia, pel que hi

segueixen havent moltes preguntes sense respondre. En aquest sentit, tot i que hi ha publicacions que engloben un nombre elevat de casos i que inclouen informació molecular, els treballs tenen dissenys heterogenis i mostren, en algunes ocasions, resultats contradictoris. A més, molts treballs engloben la MFP i la MFS dins un mateix grup, cosa que impedeix dilucidar si es tracta d'entitats que cal que s'estudiïn juntes o és millor separar-les. El que creiem innovador de la nostra publicació és aquesta separació cronològica de la mielofibrosi, amb l'afegit que apliquem la classificació molecular de Grinfeld (14), la qual s'ha implementat poc en els estudis que hi ha publicats fins al moment.

Aquest treball l'hem portat a terme amb un disseny unicèntric, que engloba 175 pacients diagnosticats de mielofibrosi, 81 amb MFP i 92 amb MFS, dels quals 53 es corresponen a MF post-TE i 41, a MF post-PV. El que hem vist és que la majoria de pacients diagnosticats de MF, sigui primària o secundària, es poden classificar de MF amb mutació de cromatina/*splicing*, representant en la nostra sèrie el 41% dels casos. Això significa que una proporció molt important dels pacients presenten mutacions addicionals a la *driver*, que marquen el pronòstic de la malaltia. També hem vist que el segon grup molecular més freqüent és la MF amb mutació de *JAK2* en homozigosi, representant el 21% dels casos, seguit de les categories MF amb mutació de *JAK2* en heterozigosi i MF amb mutació de *CALR*, que representen el 13% i l'11% dels casos de la nostra sèrie. Cal ressaltar que les categories MF amb mutació de *MPL*, MF amb una altra mutació *driver* o MF sense mutació coneguda són categories poc freqüents i que cada una d'elles representa <5% dels casos. Les proporcions globals que hem trobat de cada una de les categories és similar a les que es van descriure a l'article que proposa aquesta classificació (14), excepte que hem trobat una freqüència de MF amb mutació de *JAK2* en heterozigosi més baixa.

En fer l'estudi de les proporcions de cada una de les categories genòmiques en funció del tipus de MF, s'observen diferències importants, cosa que suggereix que la patogènia i els mecanismes de progressió són diferents segons la cronologia de la malaltia. En aquest sentit, una de les troballes més il·lustratives del nostre treball és la situació de la MF post-PV, en la qual la presència de *JAK2* en homozigosi sense altres mutacions d'alt risc és la base genòmica en la majoria dels casos i, en canvi, és poc freqüent en els altres tipus de MF. També cal destacar la freqüència diferenciada de la categoria disrupció de *TP53*/aneuploidia, que és més prevalent en els grups amb MFS i això és rellevant, ja que tracta d'una categoria amb un risc de progressió a leucèmia aguda molt elevat. Tot i que el nombre de pacients en aquesta categoria genòmica és baix, cosa que no permet treure'n conclusions en ferm, les nostres troballes són congruents amb els resultats publicats per altres grups (14,68,69) i són d'especial interès, ja que les mutacions a *TP53* estan associades a un pronòstic molt advers i no estan incloses a les alteracions moleculars d'alt risc dels sistemes de puntuació pronòstics utilitzats habitualment (71,72). De cara a treballs futurs, seria interessant valorar la prevalença de la disrupció de *TP53*/aneuploidia separant la MFP i la MFS i, a més de dades genòmiques, tenir en compte dades citogenètiques més enllà del cariotipus convencional, no disponible en una proporció important de pacients amb MF. Dins d'aquest context, pot ser d'interès l'aplicació del mapeig òptic del genoma (OGM, de l'anglès, *Optical Genome Mapping*), el qual s'està començant a implementar de manera experimental en altres neoplàsies mieloides (110).

La categoria de MF amb mutacions en gens de la cromatina/*splicing* troba la seva major representació en la MFP (53% dels casos), seguida de la MF post-TE (36% dels casos) i la MF post-PV (24%). El tret clínic característic dels pacients en aquesta categoria diagnòstica és l'anèmia amb dependència transfusional i, com es detalla a l'estudi, es tracta d'una categoria d'alt risc, amb una probabilitat de progressió a leucèmia aguda i

una mortalitat elevades. Cal remarcar que aquesta categoria de la classificació de Grinfeld inclou les alteracions moleculars ja considerades d'alt risc en models pronòstics de MF basats en la seqüenciació per NGS (*ASXL1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1* i *IDH2*) (71,72,111), juntament amb mutacions a la via de RAS (*KRAS*, *NRAS* i *CBL*). Tant l'estudi de Grinfeld (14) com un estudi publicat recentment pel grup francès (68) recolzen la importància d'incloure les mutacions de la via de RAS en grups genòmics d'alt risc. També cal fer menció d'una publicació de Coltro et al. (73), que va evidenciar alteracions genòmiques a la via de RAS en un 13% dels pacients amb MF. En aquest treball, les mutacions a la via de RAS es van associar a pronòstic advers, sobretot en la MFP, amb una malaltia de característiques clíniques més agressives, baixa resposta a inhibidors de JAK i menor supervivència.

Tot i tractar-se d'un gen relacionat amb el *splicing*, les mutacions a *SF3B1* no es troben incloses dins l'algoritme de Grinfeld. Així i tot, hi ha un treball de Loscocco et al. (112), que reporta aquestes mutacions en 7% de les MFP i 5% de les MFS, i les associa a un pronòstic desfavorable en la MFS. Per aquest motiu, en vam voler fer una anàlisi específica en el nostre treball, i vam detectar la presència de mutacions a *SF3B1* en 10 pacients (6% dels casos), amb proporcions similars en MFP i MFS. Els pacients amb aquesta mutació mostraven freqüentment dependència transfusional i una supervivència similar al grup de MF amb mutacions de cromatina/*splicing*. Cal tenir en compte que 3 d'aquests 10 casos presentaven altres mutacions en gens de cromatina/*splicing*. En aquesta direcció, seria d'interès validar aquestes troballes en nous treballs per tal de poder comprendre amb més precisió el pronòstic independent de la mutació de *SF3B1* en la MF i valorar incloure-la dins de la categoria de mutacions de cromatina/*splicing*.

Diverses investigacions han valorat les diferències pronòstiques en els pacients amb MF que presenten mutació de *CALR*. S'ha documentat que els pacients amb MF amb una

mutació de *CALR* tipus 1 poden tenir un pronòstic favorable si es comparen amb aquells amb mutació de *CALR* tipus 2 (113,114). Per una altra banda, una publicació recent centrada en la mutació de *CALR* en la MF, que inclou 121 casos, ha evidenciat que els pacients amb una VAF de *CALR* més elevada poden tenir major prevalença d'anèmia i una supervivència escurçada, suggerint una malaltia més avançada (115). Així i tot, cal tenir en compte que una proporció important dels pacients amb una VAF de *CALR* elevada presentaven mutacions addicionals a *ASXL1*, cosa que podria haver influenciat el pronòstic. A la nostra sèrie, 39 casos presenten com a mutació *driver* *CALR*. S'observa una VAF de *CALR* elevada ($\geq 50\%$) més freqüentment entre aquells amb mutació de *CALR* tipus 2, sense que això comporti una major prevalença de mutacions de cromatina/*splicing*. Addicionalment, hem trobat que una VAF de *CALR* elevada es troba associada a major mortalitat, independentment de la presència de mutacions de cromatina/*splicing*. Aquestes dades recolzen que la presència de VAF de *CALR* $\geq 50\%$ pot tenir rellevància pronòstica i pot explicar el pitjor pronòstic evidenciat dels pacients amb mutació de *CALR* tipus 2 (113,114). Tot i això, el nombre de pacients a la nostra sèrie amb mutació de *CALR* és baix i caldrien estudis amb un major nombre de casos amb MF i mutació de *CALR* per arribar a conclusions fermes en aquest sentit.

És conegut que una major càrrega de *JAK2* s'associa a una major expressió fenotípica de la malaltia i a pitjor pronòstic en les NMP (90,116). Amb la classificació de Grinfeld, es defineixen les entitats de NMP amb mutació de *JAK2* en homozigosi i NMP amb mutació de *JAK2* en heterozigosi que, a nivell genòmic, hem definit en els nostres treballs com la presència de la mutació de *JAK2* amb una VAF $\geq 50\%$ o amb una VAF $< 50\%$, respectivament. En tractar-se d'una classificació jeràrquica, tots aquells casos amb mutacions addicionals que confereixen un pronòstic advers (mutació a *TP53* o a gens de cromatina/*splicing*) cauen en altres categories, pel que el pronòstic de la càrrega de *JAK2* es pot avaluar sense interferència pronòstica de les altres aberracions, si es comparen

aquestes dues categories. En la nostra publicació, s'evidencien diferències rellevants entre els pacients amb mutació de *JAK2* sense altres mutacions de mal pronòstic, en funció de la VAF. Els casos classificats com a MF amb mutació de *JAK2* en homozigosi mostren un risc de progressió a LMA i una supervivència molt similar al grup de MF amb mutació de cromatina/*splicing*, pel que sembla que aquests casos s'haurien considerar també d'alt risc, tot i l'absència de les mutacions típicament associades a pronòstic advers. En canvi, la MF amb *JAK2* en heterozigosi és un dels grups genòmics amb una supervivència més llarga i no s'ha documentat cap cas de progressió a LMA durant el seguiment, suggerint que es tracta d'una categoria de baix risc.

Tot i que el nombre de casos amb *MPL* com a mutació *driver* va ser de 10, el nombre de pacients classificats a la categoria de MF amb mutació de *MPL* va ser finalment de 4, ja que la resta de pacients presentaven una o més mutacions en els gens de la categoria de cromatina/*splicing*. En tractar-se de la mutació *driver* coneguda menys habitual, gairebé no hi ha literatura que avaluï de manera específica el pronòstic de la mutació de *MPL* ni la prevalença de mutacions addicionals en la MF amb *MPL* mutat, pel que pot ser una direcció en la qual poder enfocar futurs treballs.

Tot i l'àmplia literatura publicada, la MF segueix essent una malaltia amb buits de coneixement importants, sobretot en aquells casos que tenen perfils genòmics menys habituals, com la mutació de *MPL* o sense les mutacions *driver* típiques de les NMP. Una de les limitacions més importants del nostre estudi és, precisament, que degut al nombre relativament baix de pacients que inclou, aquests grups es troben únicament representats per un nombre petit de casos, cosa que limita treure'n conclusions. Una de les altres limitacions, i que també afecta a molts dels treballs publicats, és la falta parcial de dades citogenètiques. La dificultat per obtenir material per fer un cultiu convencional en la MF, tant de sang perifèrica com de moll d'os, fa que no hi hagi informació sobre el cariotipus en un percentatge rellevant dels pacients. Tal com ja s'ha

mentonat prèviament, la introducció de noves tècniques citogenètiques, com l'OGM, segurament serà fonamental per la millor comprensió de la MF des d'aquest punt de vista. Per últim, també cal tenir en compte que la informació genòmica obtinguda prové d'un panell de NGS amb un nombre limitat de gens que, si bé inclou els gens més freqüentment mutats, no inclou alguns gens molt poc freqüents amb implicació pronòstica, com *CUX1* o *GNAS*, pel que algun dels casos podria haver estat classificat de manera errònia.

Tot i les limitacions esmentades, el nostre treball és una bona mostra d'un nombre significatiu de pacients amb MF i que permet distingir bé les característiques genòmiques diferencials de la MFP i la MFS. Seria d'interès poder fer un estudi més ampli, mitjançant la col·laboració de diversos centres per tal de poder clarificar les qüestions que han quedat sense resoldre en el present treball.

5.3. L'aplicació de les classificacions genòmiques en les NMP

En els últims 15 anys, la classificació de les neoplàsies mieloides ha canviat radicalment, sobretot en el camp de la LMA, on les alteracions genòmiques han anat agafant cada cop més pes, fins al punt de ser definitòries en la majoria d'entitats, ja que han pogut demostrar implicacions pronòstiques i, cada cop més, implicacions terapèutiques (1,5,6). Això ha estat gràcies a l'esforç cooperatiu de la comunitat científica, amb publicacions que inclouen un gran nombre de pacients, una quantitat molt elevada d'estudis genòmics i amb un treball de bioinformàtica innovador i complex (58). Aquesta línia s'ha anat aplicant progressivament a altres grups de neoplàsies mieloides, com és el cas

de la SMD (59), tot i que amb traduccions més modestes pel que fa a la classificació de les entitats que la componen (5,6).

En els cas de les NMP, tot i la revolució en el seu coneixement que hi va haver de 2005 a 2013 amb el descobriment de les mutacions *driver* (19,30,31), la definició del tipus de NMP actualment depèn de manera fonamental del fenotip clínic de la malaltia i de les troballes morfològiques en la biòpsia de moll d'os (5,6). Un dels principals motius pel qual això és així és que es tracta de neoplàsies mieloides amb un curs crònic, en les quals el pacient pot romandre estable durant un llarg període de temps, sobretot en el cas de la PV i la TE. En aquestes dues malalties, una proporció molt important dels pacients només presenten la mutació *driver* com a única alteració genòmica al diagnòstic (14,62) i, durant l'evolució, alguns adquiriran mutacions addicionals, les quals poden tenir capacitat de modificar el curs natural de la malaltia, incrementant, per exemple, el risc de transformació a MF o a LMA. Des d'una altra perspectiva, s'ha vist que algunes mutacions addicionals a la *driver* poden adquirir-se de manera molt precoç en el curs de la malaltia i influenciar el fenotipus inicial (62,117). Tot i aquest curs crònic, la informació genòmica més enllà de les mutacions *driver* té un valor predictiu, tant a nivell de progressió de la malaltia com pel que fa al risc trombòtic, pel que té un rol important en escenaris clínics específics. Aquest pot ser el cas dels pacients joves, que hauran de conviure molts anys amb la malaltia, o dels pacients en situacions complexes, com ho són els que desenvolupen complicacions trombòtiques en localitzacions inhabituals o amb un risc trombòtic/hemorràgic elevat per concomitància, per exemple, de trastorns de la coagulació. En aquests casos, l'avantatge de l'ús d'una classificació genòmica jeràrquica és que permet integrar tota la informació genòmica en un únic model, cosa que simplifica la comprensió d'unes dades que no són senzilles d'interpretar i, per tant, col·labora en facilitar el maneig del pacient.

Pel que fa a la mielofibrosi, en tractar-se d'una NMP amb un curs més agressiu, en la qual els pacients mostren una supervivència clarament retallada, la informació genòmica passa a tenir un rol primordial, ja que aquesta mostra una elevada capacitat de predicció de la progressió de la malaltia i la supervivència. Tot i que la informació genòmica ja es troba incorporada en els sistemes de puntuació pronòstics utilitzats a l'actualitat, hi ha informació genòmica que ha demostrat un impacte pronòstic rellevant que no s'hi troba inclosa, com ho són les mutacions a *TP53*, les que afecten a la via de RAS o la càrrega al·lèlica de *JAK2*. En aquest sentit, la classificació genòmica dels casos aporta, de nou, una visió global del cas, que permet interpretar la informació genètica d'una manera integrada. Cal destacar que l'any passat es va publicar a *Hemasphere* un treball cooperatiu de GEMFIN (*Grupo Español de Enfermedades Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas*) (118), que va proposar un nou sistema de puntuació pronòstic sobre variables clíniques basat en *machine learning* – el AIPSS-MF (*Artificial Intelligence Prognostic Scoring System for Myelofibrosis*) – el qual va demostrar una elevada capacitat predictiva. Recentment, aquest sistema s'ha millorat mitjançant la incorporació de dades genòmiques (119), incloent alteracions a 20 gens diferents, entre els quals *TP53*, i també la VAF de les mutacions. El nostre centre hi ha contribuït amb un nombre significatiu de casos, provinents del segon treball de la tesi. Aparentment, aquest sistema que també té en compte les alteracions d'una manera integral ha mostrat una capacitat predictiva lleugerament superior al model utilitzat per Grinfeld et al (14).

Per concloure, la classificació molecular és una bona eina per complementar les categories diagnòstiques en les NMP. Tot i que no és una informació substitutòria del diagnòstic de PV, TE i MF, sí que aporta informació pronòstica rellevant, com es va veure de manera global en l'article de Grinfeld et al. A més, sembla que té una aplicació transversal en les NMP, ja que hem vist que té un valor significatiu si s'aplica en situacions clíniques específiques, que no sempre es troben ben representades en els

estudis globals en NMP. En el camp de les NMP, on els estudis tenen dissenys heterogenis que, de vegades, donen lloc a resultats contradictoris, és important trobar eines globals, que es puguin ajustar al màxim nombre de pacients i que permetin disposar de la informació de manera entenedora i simplificada. Tot i que segueixen havent-hi qüestions sense resoldre, com la dificultat d'obtenir informació citogenètica, sobretot en la mielofibrosi, o dubtes en el significat d'alteracions molecular concretes, l'ús d'una classificació genètica jeràrquica permet assolir aquest objectiu, que sembla rellevant davant la quantitat d'informació creixent que tenim actualment.

6. Conclusions

Les conclusions de la tesi s'enumeren a continuació:

1. Els pacients amb policitèmia vera o trombocitèmia essencial i mutació de *JAK2* que debuten amb trombosi venosa esplàcnica mostren una complexitat genòmica menor, que implica una càrrega de *JAK2* més baixa i un menor nombre de mutacions addicionals, que els pacients de la mateixa edat, amb el mateix diagnòstic i la mateixa mutació *driver* que no debuten amb trombosi venosa esplàcnica.
2. Els pacients amb policitèmia vera o trombocitèmia essencial i mutació de *JAK2* que presenten una trombosi venosa esplàcnica durant l'evolució de la malaltia mostren unes característiques clíniques i genòmiques diferents d'aquells que presenten la trombosi esplàcnica al diagnòstic, amb major complexitat molecular, que implica una càrrega de *JAK2* més elevada i un nombre de mutacions addicionals més alt.
3. Tot i que una complexitat genòmica menor s'associa a millor pronòstic en les neoplàsies mieloproliferatives, els pacients amb policitèmia vera o trombocitèmia essencial que debuten amb trombosi esplàcnica mostren una menor supervivència que aquells pacients amb les mateixes característiques demogràfiques, el mateix tipus de malaltia i la mateixa mutació *driver* i que no debuten amb trombosi esplàcnica.
4. Els pacients amb policitèmia vera o trombocitèmia essencial que debuten amb trombosi venosa esplàcnica mostren un risc elevat de presentar un nou fenomen trombòtic venós, especialment aquells que mostren característiques d'alt risc

molecular: una càrrega de la mutació *driver* $\geq 50\%$ o presència de mutacions addicionals (*TP53* o a gens de cromatina/*splicing*).

5. La classificació molecular mitjançant l'algoritme de Grinfeld permet una identificació adequada dels pacients joves amb policitèmia vera o trombocitèmia essencial que tenen major risc de progressió a mielofibrosi o leucèmia aguda, tant si debuten amb trombosi venosa esplàcnica com si no.
6. La presència de mutacions a *TET2*, *DNMT3A* i *ASXL1* addicionals a la mutació *driver* permet la identificació d'aquells pacients joves amb policitèmia vera i trombocitèmia essencial amb major risc de desenvolupar una trombosi arterial.
7. La meitat dels pacients amb mielofibrosi, sigui primària o secundària, presenten mutacions d'alt risc addicionals a la *driver*, que tenen implicacions en la supervivència i el risc de progressió a leucèmia aguda, com són les mutacions a gens relacionats amb la cromatina o *splicing* o disrupcions a *TP53*.
8. El perfil genòmic de la mielofibrosi és diferent en funció de la cronologia del seu desenvolupament, és a dir, en funció de si es tracta de mielofibrosi primària, mielofibrosi post-policitèmia vera o mielofibrosi post-trombocitèmia essencial. Aquesta troballa afavoreix la hipòtesi que es tracta d'entitats biològicament diferents.
9. La mielofibrosi secundària post-policitèmia vera es troba enriquida amb casos de neoplàsia mieloproliferativa amb mutació de *JAK2* en homozigosi, cosa que fa palès que l'increment de la càrrega de *JAK2* durant l'evolució de la policitèmia

vera és el segell distintiu per a la seva transformació a mielofibrosi en una proporció important de casos.

10. En la mielofibrosi, la disrupció de *TP53* o l'aneuploidia és una categoria genòmica associada a un pronòstic molt advers, amb una probabilitat elevada de desenvolupar una leucèmia aguda en un període curt de temps. Aquesta categoria es més freqüent en els casos de mielofibrosi secundària que en els de mielofibrosi primària.
11. La mielofibrosi amb mutació *driver* de *CALR* o *MPL* presenta de manera habitual mutacions addicionals a gens de cromatina/*splicing*, que defineixen la seva categoria genòmica i marquen el pronòstic de la malaltia. En aquest sentit, les categories de neoplàsia mieloproliferativa amb mutació de *CALR* o *MPL* mostren una representació baixa en tots els tipus de mielofibrosi.

7. Bibliografia

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4a edició, revisada. Lyon: IARC Publications; 2017. ISBN 978-92-832-4494-3.
2. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2168–81.
3. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*. 2018;8(2):15.
4. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. *JAMA Oncol*. 2015;1(1):97–105.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200–28.
6. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703–19.
7. Gianelli U, Thiele J, Orazi A, Gangat N, Vannucchi AM, Tefferi A, et al. International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: myeloproliferative neoplasms. *Virchows Arch*. 2023;482(1):53–68.
8. Minciacchi VR, Kumar R, Krause DS. Chronic myeloid leukemia: A model disease of the past, present and future. *Cells*. 2021;10(1):1–23.
9. Cortes J, Pavlovsky C, Sauße S. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2021;398(10314):1914–26.

10. Bharadwaj U, Kasembeli MM, Robinson P, Tweardy DJ. Targeting Janus Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Treat Inflammation, Fibrosis, and Cancer: Rationale, Progress, and Caution. *Pharmacol Rev.* 2020;72(2):486–526.
11. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):402.
12. Greenfield G, McMullin MF, Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):103.
13. Lee J, Godfrey AL, Nangalia J. Genomic heterogeneity in myeloproliferative neoplasms and applications to clinical practice. *Blood Rev.* 2020;42(100708):1–13.
14. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2018;379(15):1416–30.
15. 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(14):2220–8.
16. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Podoltsev NA, Zeidan AM. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. *Blood Rev.* 2020;42:100706.
17. Williams N, Lee J, Mitchell E, Moore L, Baxter EJ, Hewinson J, et al. Life histories of myeloproliferative neoplasms inferred from phylogenies. *Nature.* 2022;602(7895):162–8.
18. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434(7037):1144–8.

19. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779–90.
20. Prakash S, Arber DA, Bueso-Ramos C, Hasserjian RP, Orazi A. Advances in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Virchows Arch*. 2023;482(1):69–83.
21. Nielsen C, Birgens HS, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Diagnostic value of JAK2 V617F somatic mutation for myeloproliferative cancer in 49 488 individuals from the general population. *Br J Haematol*. 2013;160(1):70–9.
22. Suknuntha K, Geyer JT, Patel KP, Weinberg OK, Rogers HJ, Lake JJ, et al. Clinicopathologic characteristics of myeloproliferative neoplasms with JAK2 exon 12 mutation. *Leuk Res*. 2023;127(107033):1–6.
23. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis . *N Engl J Med*. 2007;356(5):459–68.
24. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(3):325–32.
25. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*. 2017;130(23):2475–83.
26. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011;117(10):2813–6.
27. Guglielmelli P, Calabresi L. The MPL mutation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2021;365:163–78.

28. Palumbo GA, Stella S, Pennisi MS, Piroso C, Fermo E, Fabris S, et al. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Front Oncol.* 2019;9(321):1–10.
29. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med.* 2006;3(7):1140–51.
30. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood.* 2006;108(10):3472–6.
31. Nangalia J, Massie CEE, Baxter EJJ, Nice FLL, Gundem G, Wedge DCC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2391–405.
32. 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;369(25):2379–90.
33. Fucikova J, Spisek R, Kroemer G, Galluzzi L. Calreticulin and cancer. *Cell Res.* 2021;31(1):5–16.
34. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. *Leukemia.* 2015;29(1):249–52.
35. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol.* 2014;92(4):289–97.
36. Hultcrantz M, Ravn Landtblom A, Andréasson B, Samuelsson J, Dickman PW,

- Kristinsson SY, et al. Incidence of myeloproliferative neoplasms – trends by subgroup and age in a population-based study in Sweden. *J Intern Med*. 2020;287(4):448–54.
37. 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):1874–81.
38. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507–13.
39. Hultcrantz M, Wilkes SR, Kristinsson SY, Andersson TML, Derolf AR, Eloranta S, et al. Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed with Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study. *J Clin Oncol*. 2015;33(20):2288–95.
40. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. *J Clin Oncol*. 2011;29(23):3179–84.
41. Cervantes F, Dupriez B, Passamonti F, Vannucchi AM, Morra E, Reilly JT, et al. Improving Survival Trends in Primary Myelofibrosis: An International Study. *J Clin Oncol*. 2012;30(24):2981–7.
42. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J*. 2015;5(11):e366.
43. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and

- management. *Am J Hematol*. 2021 Jan 1;96(1):145–62.
44. Alvarez-Larrán A, Senín A, Fernández-Rodríguez C, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Gómez M, et al. Impact of genotype on leukaemic transformation in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2017;178(5):764–71.
 45. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM, et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): International prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood*. 2011;118(2):401–8.
 46. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Polycythemia vera: historical oversights, diagnostic details, and therapeutic views. *Leukemia*. 2021;35(12):3339–51.
 47. Awada H, Voso MT, Guglielmelli P, Gurnari C. Essential thrombocythemia and Acquired von Willebrand Syndrome: The Shadowlands between Thrombosis and Bleeding. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1746):1–19.
 48. Kvasnicka HM, Orazi A, Thiele J, Barosi G, Bueso-Ramos CE, Vannucchi AM, et al. European LeukemiaNet study on the reproducibility of bone marrow features in masked polycythemia vera and differentiation from essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 2017;92(10):1062–7.
 49. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: Why does it matter. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(2):129–40.
 50. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*. 2011;117(21):5710–8.
 51. Barbui T, Thiele J, Ferrari A, Vannucchi AM, Tefferi A. The new WHO classification for essential thrombocythemia calls for revision of available

- evidences. *Blood Cancer J.* 2020;10(22):20–5.
52. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood.* 2017;129(24):3227–36.
 53. Cervantes F. How I Treat Myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(17):2635–42.
 54. Prakash S, Orazi A. How I Diagnose Primary Myelofibrosis. *Am J Clin Pathol.* 2022;157(4):518–30.
 55. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. *Am J Hematol.* 2016;91(9):918–22.
 56. Luque Paz D, Kralovics R, Skoda RC. Genetic basis and molecular profiling in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2023;141(16):1909–21.
 57. Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S, et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med.* 2014;211(11):2213–30.
 58. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016 Jun 9;374(23):2209–21.
 59. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Loo P Van, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616–27.
 60. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2017;377(2):111–21.

61. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia*. 2017;31(9):1869–71.
62. Hinze A, Rinke J, Crodel CC, Möbius S, Schäfer V, Heidel FH, et al. Molecular-defined clonal evolution in patients with classical myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2023;202(2):308–17.
63. Luque Paz D, Bader MS, Nienhold R, Rai S, Almeida Fonseca T, Stetka J, et al. Impact of Clonal Architecture on Clinical Course and Prognosis in Patients With Myeloproliferative Neoplasms. *HemaSphere*. 2023;7(5):e885.
64. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016;1(1):21–30.
65. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*. 2016;1(2):105–11.
66. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, Kerguelen A, Carlos Hernández-Boluda J, Martínez-Avilés L, et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am J Hematol*. 2014;89(5):517–23.
67. Courtier F, Garnier S, Carbuccia N, Guille A, Adélaïde J, Chaffanet M, et al. Targeted molecular characterization shows differences between primary and secondary myelofibrosis. *Genes Chromosom Cancer*. 2020;59(1):30–9.
68. Luque Paz D, Riou J, Verger E, Cassinat B, Chauveau A, Ianotto JC, et al. Genomic analysis of primary and secondary myelofibrosis redefines the prognostic impact of ASXL1 mutations: A FIM study. *Blood Adv*. 2021;5(5):1442–51.
69. Guglielmelli P, Coltro G, Mannelli F, Rotunno G, Loscocco GG, Mannarelli C, et al. ASXL1 mutations are prognostically significant in PMF, but not MF following

- essential thrombocythemia or polycythemia vera. *Blood Adv.* 2022;6(9):2927–31.
70. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2013;27(9):1861–9.
71. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol.* 2018;36(4):310–8.
72. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Gangat N, Ketterling RP, Pardanani A, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol.* 2018;36(17):1769–70.
73. Coltro G, Rotunno G, Mannelli L, Mannarelli C, Fiaccabrino S, Romagnoli S, et al. RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are associated with poor prognostic features. *Blood Adv.* 2020;4(15):3677–87.
74. Loscocco GG, Rotunno G, Mannelli F, Coltro G, Gesullo F, Pancani F, et al. The prognostic contribution of CBL, NRAS, KRAS, RUNX1, and TP53 mutations to mutation-enhanced international prognostic score systems (MIPSS70/plus/plus v2.0) for primary myelofibrosis. *Am J Hematol.* 2024;99(1):68–78.
75. Hernández-Sánchez A, Villaverde-Ramiro Á, Arellano-Rodrigo E, Garrote M, Martín I, Mosquera-Orgueira A, et al. The prognostic impact of non-driver gene mutations and variant allele frequency in primary myelofibrosis. *Am J Hematol.* 2024;99(4):755–8.
76. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patients With Polycythemia Vera. *J Clin*

- Oncol. 2005;23(10):2224–32.
77. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*. 2013;122(13):2176–84.
 78. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: An international study of 891 patients. *Blood*. 2011;117(22):5857–9.
 79. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood*. 2010;115(4):778–82.
 80. Alvarez-Larrán A, Cuevas B, Velez P, Noya S, Caballero-Navarro G, Ferrer-Marín F, et al. Application of IPSET-Thrombosis in 1366 Patients Prospectively Followed from the Spanish Registry of Essential Thrombocythemia. *HemaSphere*. 2023;7(8):e936.
 81. Moliterno AR, Ginzburg YZ, Hoffman R. Clinical insights into the origins of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2021;137(9):1145–53.
 82. Rungjirajittranon T, Owattanapanich W, Ungprasert P, Siritanaratkul N, Ruchutrakool T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of thrombosis and bleeding at diagnosis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *BMC Cancer*. 2019;19(1):184.
 83. Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A. Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2009;94(11):1484–8.
 84. Gerds AT, Mesa R, Burke JM, Grunwald MR, Stein BL, Squier P, et al. Association between elevated white blood cell counts and thrombotic events in polycythemia vera: analysis from REVEAL [Internet]. *Blood*. 2023 [consultat el dia 28 de març

- de 2024]. Disponibile a: <https://ashpublications.org/blood/article/doi/10.1182/blood.2023020232/506717/Association-between-elevated-white-blood-cell>
85. Lussana F, Carobbio A, Salmoiraghi S, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Bottazzi B, et al. Driver mutations (JAK2V617F, MPLW515L/K or CALR), pentraxin-3 and C-reactive protein in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):54.
 86. Carobbio A, Vannucchi AM, De Stefano V, Masciulli A, Guglielmelli P, Loscocco GG, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is a novel predictor of venous thrombosis in polycythemia vera. *Blood Cancer J.* 2022;12(2):28.
 87. Enblom A, Lindskog E, Hasselbalch H, Hersby D, Bak M, Tetu J, et al. High rate of abnormal blood values and vascular complications before diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Intern Med.* 2015;26(5):344–7.
 88. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(7):1062–9.
 89. 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(26):5128–33.
 90. Moliterno AR, Kaizer H, Reeves BN. JAK2V617F allele burden in polycythemia vera: burden of proof. *Blood.* 2023;141(16):1934–42.
 91. Guglielmelli P, Loscocco GG, Mannarelli C, Rossi E, Mannelli F, Ramundo F, et al. JAK2V617F variant allele frequency >50% identifies patients with polycythemia vera at high risk for venous thrombosis. *Blood Cancer J.* 2021;11(12):199.
 92. Cordua S, Kjaer L, Skov V, Pallisgaard N, Hasselbalch HC, Ellervik C. Prevalence

- and phenotypes of JAK2 V617F and calreticulin mutations in a Danish general population. *Blood*. 2019;134(5):469–79.
93. Segura-Díaz A, Stuckey R, Florido Y, González-Martín JM, López-Rodríguez JF, Sánchez-Sosa S, et al. Thrombotic Risk Detection in Patients with Polycythemia Vera : The Predictive Role of DNMT3A/TET2/ASXL1 Mutations. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):934.
 94. Pasquer H, Daltro de Oliveira R, Vasseur L, Soret-Dulphy J, Maslah N, Zhao LP, et al. Distinct clinico-molecular arterial and venous thrombosis scores for myeloproliferative neoplasms risk stratification. *Leukemia*. 2024;38(2):326–39.
 95. Tremblay D, Winters A, Beckman JD, Naymagon L, Patel R, Mascarenhas J, et al. Splanchnic vein thrombosis associated with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res*. 2022;218:8–16.
 96. Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, Kiladjian J, Janssen HLA, Leebeek FWG, et al. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood*. 2012;120(25):4921–8.
 97. Gangat N, Wolanskyj AP, Tefferi A. Abdominal vein thrombosis in essential thrombocythemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic implications. *Eur J Haematol*. 2006;77(4):327–33.
 98. Liu A, Naymagon L, Tremblay D. Splanchnic Vein Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms: Treatment Considerations and Unmet Needs. *Cancers (Basel)*. 2023;15(1):11.
 99. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008;93(3):372–80.
 100. Sant'Antonio E, Guglielmelli P, Pieri L, Primignani M, Randi ML, Santarossa C, et

- al. Splanchnic vein thromboses associated with myeloproliferative neoplasms: An international, retrospective study on 518 cases. *Am J Hematol.* 2020;95(2):156–66.
101. How J, Trankaus KM, Oh ST. Distinct clinical, laboratory and molecular features of myeloproliferative neoplasm patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol.* 2018;183(2):310–3.
 102. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Magaz M, Hernández-Boluda JC, Garrote M, Cuevas B, et al. Natural history of polycythemia vera and essential thrombocythemia presenting with splanchnic vein thrombosis. *Ann Hematol.* 2020;99(4):791–8.
 103. De Stefano V, Vannucchi AM, Ruggeri M, Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Iurlo A, et al. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: risk factors for recurrences in a cohort of 181 patients. *Blood Cancer J.* 2016;6(11):e493.
 104. Hoekstra J, Bresser EL, Smalberg JH, Spaander MCW, Leebeek FWG. Long-term follow-up of patients with portal vein thrombosis and myeloproliferative neoplasms. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2208–14.
 105. Greenfield G, McMullin MF. Splanchnic venous thrombosis in JAK2 V617F mutation positive myeloproliferative neoplasms – long term follow-up of a regional case series. *Thromb J.* 2018;16(33):1–7.
 106. Debureaux PE, Cassinat B, Soret-Dulphy J, Mora B, Verger E, Maslah N, et al. Molecular profiling and risk classification of patients with myeloproliferative neoplasms and splanchnic vein thromboses. *Blood Adv.* 2020;4(15):3708–15.
 107. Tremblay D, Vogel AS, Moshier E, Hoffman R, Kremyanskaya M, Zhou S, et al. Outcomes of splanchnic vein thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms in a single center experience. *Eur J Haematol.* 2020;104(1):72–3.
 108. How J, Zhou A, Oh ST. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative

- neoplasms: pathophysiology and molecular mechanisms of disease. *Ther Adv Hematol*. 2017;8(3):107–18.
109. Gianelli U, Iurlo A, Cattaneo D, Bossi A, Cortinovis I, Augello C, et al. Discrepancies between bone marrow histopathology and clinical phenotype in BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms associated with splanchnic vein thrombosis. *Leuk Res*. 2015;39(5):525–9.
 110. Levy B, Baughn LB, Akkari Y, Chartrand S, LaBarge B, Claxton D, et al. Optical genome mapping in acute myeloid leukemia: a multicenter evaluation. *Blood Adv*. 2023;7(7):1297–307.
 111. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018;32(7):1631–42.
 112. Loscocco GG, Guglielmelli P, Mannelli F, Mora B, Mannarelli C, Rotunno G, et al. SF3B1 mutations in primary and secondary myelofibrosis: Clinical, molecular and prognostic correlates. *Am J Hematol*. 2022;97(9):E347–9.
 113. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Szuber N, Finke CM, Lasho TL, et al. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. *Am J Hematol*. 2018;93(3):348–55.
 114. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, Wassie EA, Finke CM, Belachew AA, et al. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 of type 2-like CALR variants. *Blood*. 2014;124(15):2465–6.
 115. Guglielmelli P, Maccari C, Sordi B, Balliu M, Atanasio A, Mannarelli C, et al. Phenotypic correlations of CALR mutation variant allele frequency in patients with myelofibrosis. *Blood Cancer J*. 2023;13(1):21.
 116. Larsen TS, Pallisgaard N, Møller MB, Hasselbalch HC. The JAK2 V617F allele

- burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis - Impact on disease phenotype. *Eur J Haematol*. 2007;79(6):508–15.
117. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Griffin J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2015;372(7):601–12.
118. Mosquera Orgueira A, Perez Encinas MM, Diaz Varela NA, Mora E, Díaz-Beyá M, Montoro MJ, et al. Machine Learning Improves Risk Stratification in Myelodysplastic Neoplasms: An Analysis of the Spanish Group of Myelodysplastic Syndromes. *HemaSphere*. 2023;7(1):e818.
119. Mosquera-Orgueira A, Arellano-Rodrigo E, Garrote M, Martín I, Pérez-Encinas M, Gómez-Casares M-T, et al. Integrating AIPSS-MF and molecular predictors: A comparative analysis of prognostic models for myelofibrosis. *HemaSphere*. 2024;8(3):e60.

