

Desarrollo teórico de *high throughput screening* (HTS) para encontrar inhibidores de JAK2^{V617F} destinados a pacientes con policitemia vera

Patricia López-Barona¹, Yuliia Fatych², Yoel Garrosa-Miró, Jorge Recio-Aldavero, Cristina Zuazo³

1. Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 3. Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

VII Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2022.

14 a 18 de marzo, 2022. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España.

Palabras clave: policitemia vera; JAK2V617F; high throughput screening (HTS); inhibidores

Resumen

La policitemia vera (PV) es una neoplasia mieloproliferativa crónica para la que, actualmente, no existe cura. La sintomatología inespecífica de dicha enfermedad retrasa, además, el diagnóstico correcto y el establecimiento de un régimen terapéutico adecuado. El tratamiento de primera línea es meramente paliativo. No obstante, como segunda línea de tratamiento en los casos más graves, se ha empezado a utilizar el Ruxolitinib, un inhibidor inespecífico de JAK1/2 relacionado con efectos adversos (EA) severos.

La alteración molecular que causa mayoritariamente la PV es una mutación puntual que afecta a la proteína JAK2, donde tiene lugar la sustitución del aminoácido valina (V) por una fenilalanina (F) en la posición 617 (JAK2^{V617F}). Dicha modificación causa una activación constitutiva de la vía JAK-STAT con especial importancia en las células progenitoras hematopoyéticas de linaje mielóide, resultando en eritrocitosis, trombocitosis y leucocitosis. En consecuencia, se propone un proceso de *high throughput screening* (HTS) dirigido hacia la búsqueda de inhibidores específicos de JAK2^{V617F} que permitan una reducción de EA y una mejora en la eficacia. Para ello, el desarrollo teórico se basa en un método fluorescente, cuantitativo, robusto y fácilmente escalable, incluido en un ensayo celular para determinar la inhibición de JAK2^{V617F} por parte de los compuestos de la batería a evaluar. Adicionalmente, el estudio de la actividad de cada *hit* frente a otras quinasas permitiría descartar los no específicos. Tras la selección de cabezas de serie, su modificación y la reevaluación en los ensayos anteriores, se obtendrían los candidatos. Su efectividad se estimaría después en líneas celulares con JAK2^{V617F} y se externalizaría la evaluación del perfil de toxicidad y seguridad esperable en organismos completos. Por último, proponemos un modelo animal de PV que proporcione información adicional acerca de la seguridad y de la efectividad de los candidatos.

Cita: López-Barona, Patricia; Fatych, Yuliia; Garrosa-Miró, Yoel; Recio-Aldavero, Jorge; Zuazo, Cristina (2022) Desarrollo teórico de *high throughput screening* (HTS) para encontrar inhibidores de JAK2^{V617F} destinados a pacientes con policitemia vera. Actas del VII Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2022. 14 a 18 de marzo, 2022. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. *dianas* 11 (1): e202203fp01. ISSN 1886-8746 (electronic) *journal.dianas.e202203fp01* <http://www3.uah.es/dianas?e202203fp01>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © López-Barona P, Fatych Y, Garrosa-Miró Y, Recio-Aldavero J, Zuazo C. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

En este apartado se comentarán los aspectos epidemiológicos de la enfermedad y se tratarán los motivos de la selección de la diana terapéutica propuesta, así como su implicación en la patología a nivel celular y molecular.

Policitemia vera: epidemiología, tratamiento y bases celulares de la enfermedad

La policitemia vera (PV) es una neoplasia mieloproliferativa crónica que presenta una prevalencia de 1 por cada 3.300 habitantes y para la que, actualmente, no se dispone de cura [1,2]. La aproximación terapéutica empleada se basa en evitar eventos trombóticos y la progresión a mielofibrosis y a leucemia aguda [1]. La edad de diagnóstico media está en torno a los 60 años, y la esperanza de vida desde el diagnóstico es de 14 años [3].

A nivel celular, la PV cursa con un aumento de la proliferación de células madre hematopoyéticas del linaje mielóide por la activación de la vía JAK-STAT [1, 4]. En el 96% de los casos, se debe a la mutación de JAK2 (JAK2^{V617F}) en la que se produce la sustitución de una valina (V) por una fenilalanina

(F) en el residuo 617 que causa la activación constitutiva de JAK2 de modo que se produce un aumento de la proliferación de células madre hematopoyéticas desembocando en panmielosis, que es el conjunto de eritrocitosis, trombocitosis y leucocitosis [5, 6, 7].

La sintomatología es inespecífica y está relacionada con la hiperviscosidad de la sangre debida a la panmielosis. En sus inicios, cursa con dolores de cabeza, mareos, vértigos, alteraciones visuales y/o rubefacción. La inespecificidad de estos síntomas causa un infradiagnóstico y un retraso en la instauración de un tratamiento adecuado, resultando en consecuencias más severas. También se puede dar esplenomegalia y hepatomegalia debido a la hematopoyesis extramedular, en el 75% y 30% de los casos, respectivamente [8]. Como síntomas específicos podemos encontrar prurito acuagénico, eritromelalgia y eventos trombohemorrágicos. Las complicaciones que se pretende atajar mediante el tratamiento son: los eventos trombóticos (hasta el 30% de mortalidad), hemorrágicos (enfermedad de Von Willebrand adquirida) y la transformación hacia fenotipos más agresivos como leucemia aguda o mielofibrosis secundaria [8, 9, 10, 11].

Como tratamiento de base (Figura 1), se realizan flebotomías para mantener el hematocrito por debajo del 45% y aspirina a bajas dosis para evitar eventos trombóticos [1, 12, 13, 14]. En primera línea, se emplean los citorreductores hidroxiurea (HU) e interferón alfa (IFN- α), indicados en pacientes con alto riesgo de trombosis. Sin embargo, producen efectos adversos (EA) como depresión de la médula ósea y ulceraciones que pueden hacer necesaria la suspensión del tratamiento con HU. El IFN- α se usa en caso de resistencia o intolerancia a la HU. Debido a que carece de efectos teratogénicos, se utiliza preferentemente en embarazadas y mujeres jóvenes. Como consecuencia de los EA de tipo gripal, la tasa de abandonos de tratamiento con IFN- α es de un 20% [8, 13].

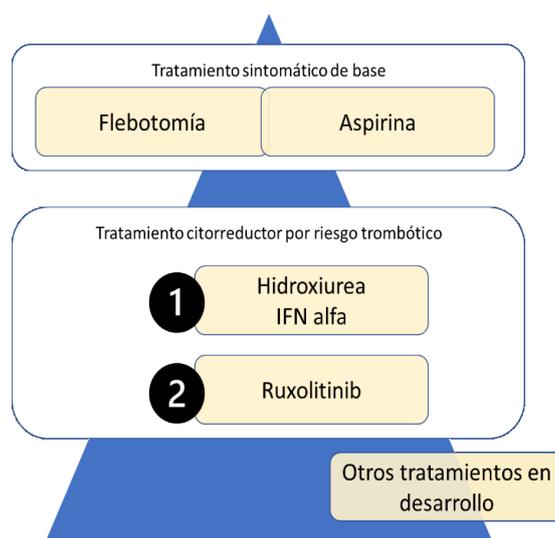


Figura 1.- Tratamientos actuales frente a la PV. Elaboración propia.

En segunda línea de tratamiento, contamos con un inhibidor selectivo de JAK1/JAK2: Ruxolitinib, que presenta EA muy frecuentes tales como infecciones, anemia, leucocitopenia y trombocitopenia, además de alterar los niveles de enzimas hepáticas [13] (Figura 1). Existen otros tratamientos que, por sus características de toxicidad, han quedado relegados a su uso como última alternativa. En cuanto a nuevas estrategias, se están evaluando fármacos inhibidores de histonas desacetilasas y de peptidomiméticos de heptidina [15].

Definición de la diana terapéutica: JAK2^{V647F} y su implicación molecular en la patología

Con el fin de encontrar un nuevo fármaco que sea selectivo a JAK2^{V647F}, se decidió estudiar cómo la mutación afecta a la estructura y ésta a su vez al desarrollo de la patología. JAK2 es una tirosina quinasa perteneciente a la familia de las quinasas tipo Jano que se compone de 4 dominios: FERM, SH2, JH2 y JH1 [16].

En una situación fisiológica, JAK2 se activa mediante la unión de eritropoyetina (EPO), factor estimulante eritropoyético, a su receptor de citoquinas (EPOR). Esto provoca, a nivel molecular, la dimerización del receptor, lo que permite la aproximación de las dos JAK2 unidas a cada monómero de EPOR. Consecuentemente, se produce el despliegue de JAK2 desde su forma autoinhibida, la transfosforilación en tirosinas en el *loop* de activación de JH1 y su dimerización. Una vez que JAK2 está activa, puede ser reconocida por proteínas con dominio SH2 (reconocimiento de tirosinas fosforiladas), principalmente STAT5, que será fosforilada por JAK2, dimerizará y se translocará al núcleo, donde actuará como factor de transcripción [17] (Figura 2).

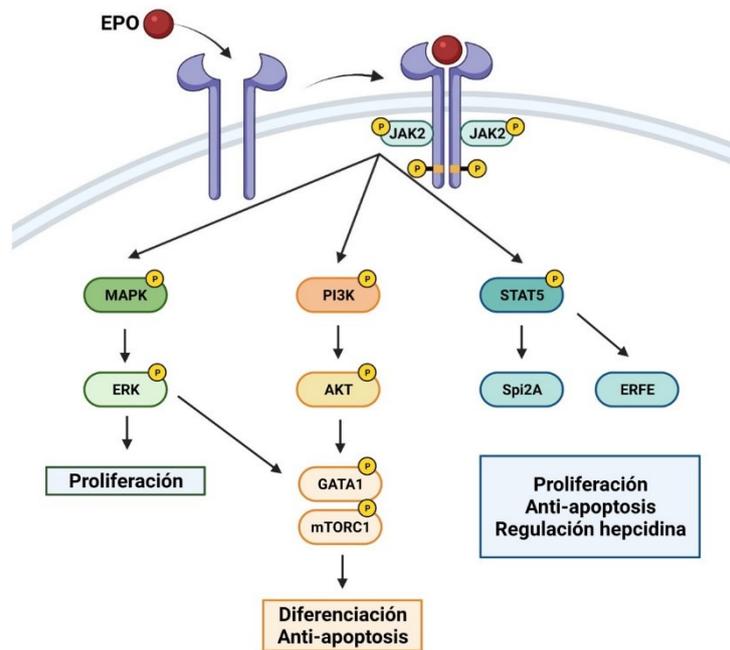


Figura 2.- Vías de mayor relevancia activadas por JAK2 y su efecto. Elaboración propia utilizando BioRender.

La forma mutada JAK2^{V617F}, constitutivamente activa, provoca la señalización aguas abajo de las vías dependientes de JAK2. Al ser dicha activación independiente de EPO, tiene lugar una diferenciación y proliferación descontrolada de las células madre hematopoyéticas. Por ello, la única diana válida en este caso sería la propia quinasa mutada, ya que es la efectora común de todas las vías implicadas de proliferación e inhibición de la apoptosis [18]. Aunque STAT es la proteína principal activada por JAK2, existen otras proteínas que también pueden ser fosforiladas por la misma y, en consecuencia, activadas. Entre ellas encontramos a RAS, que, siendo activada permanentemente, inicia la cascada de quinasas RAF - MEK - ERK, aumentando la proliferación celular [19] (Figura 2). Asimismo, estará activa la vía PI3K - AKT - mTORC1, inhibiéndose la apoptosis celular y promoviéndose la biogénesis de proteínas necesarias para la proliferación (Nagao, et al., 2014) (Figura 2). Además, AKT activará a GATA1, factor de transcripción de globina, importante para el desarrollo de eritrocitos y la regulación de los niveles de hemoglobina [18] (Figura 2).

Centrándonos en la vía JAK-STAT, la familia STAT presenta distintas proteínas, siendo de especial relevancia STAT1, STAT3 y STAT5. Se ha descrito que un aumento de pSTAT3 y de pSTAT5 está relacionado con problemas en la regulación del metabolismo del hierro, provocando STAT5 un aumento del factor de transcripción de eritroferona (ERFE) que genera un déficit de hierro por la hiperplasia de las células eritroides [17]. El aumento de concentración de STAT1 y STAT5 en el núcleo, provoca, además, un aumento de la proliferación celular [20].

Regulación de JAK2 e interacciones moleculares

En la regulación de JAK2 tiene gran relevancia el dominio pseudoquinasa JH2 con un papel dual que permite la activación de la actividad catalítica de la enzima residente en el dominio quinasa JH1 y el mantenimiento de la inhibición en ausencia de ligando [21]. Si bien actualmente el mecanismo de regulación no está del todo determinado, algunos modelos proponen que la inhibición se mantiene por una interacción en *cis* entre los dominios JH1 y JH2, que es eliminada cuando la unión del ligando induce la dimerización de JAK2 y permite, también, con la ayuda del dominio JH2, la interacción *trans* entre los dominios JH1 y su activación por transfosforilación [21].

La mutación V617F se encuentra dentro del dominio JH2 y mediante estudios cristalográficos se determinó que, si bien, en líneas generales, la estructura del dominio no se ve alterada respecto a la forma normal (Figura 3A), la sustitución de una V por una F promueve interacciones π -stacking con los anillos aromáticos de los residuos F594 y F595 (Figura 3B y 3C). Su cercanía en el espacio provoca una mayor rigidez en la hélice α en la que se encuentran, impidiendo la interacción *cis* inhibitoria entre los dominios JH2 y JH1, provocando la activación constitutiva de la enzima aún en ausencia de ligando [7]. El papel del π -stacking en esta patología se pudo corroborar mediante un estudio por mutagénesis dirigida del entorno hidrofóbico de la hélice α alterada, observándose que la sustitución de A598 por una fenilalanina inhibe las interacciones π entre F595 y F594 con V617F, bloqueando la activación constitutiva, pero manteniendo la capacidad de activación inducida por el ligando [22].

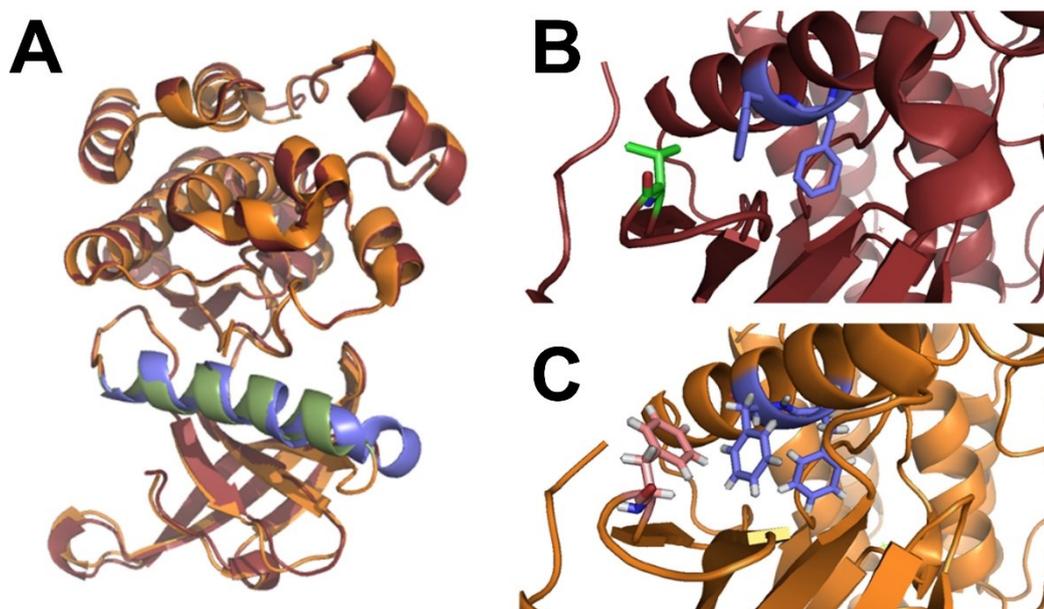


Figura 3.- Estructuras tridimensionales del dominio JH2 de JAK2 obtenidas por difracción de rayos X. A) Imágenes superpuestas de la estructura de la forma nativa (rojo) y la mutada (naranja). En verde y azul se resalta la α hélice afectada en la PV en sus formas nativa y mutada, respectivamente. B) Detalle de la disposición tridimensional de la V617 en verde y de F594 y F595 en azul de la forma nativa de JAK2. C) Detalle de la disposición tridimensional de la V617F en roja y de F594 y F595 en azul de la forma mutada. (Tomado de PDB: 4FVQ [23]).

Metodología: planteamiento del ensayo de *high throughput screening* (HTS)

En los siguientes apartados, se plantean las bases teóricas del HTS diseñado, así como los modelos *in vitro* e *in vivo* propuestos.

Elección de la diana terapéutica

Hasta el momento, los fármacos aprobados para el tratamiento de la PV abordan la sintomatología asociada con la enfermedad de forma general, sin tener efecto sobre la proteína mutada causal. Además, los tratamientos utilizados en los casos más graves implican incluso, el uso de agentes alquilantes [1]. El único inhibidor de quinasas aprobado frente a la PV es el Ruxolitinib (inhibidor competitivo de ATP), siendo aplicado solo cuando se registra una resistencia al resto de tratamientos [24]. Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores específicos de JAK2^{V617F} podría resultar una estrategia fructífera para obtener tratamientos más eficaces y con menos EA.

Conociendo el mecanismo molecular por el que la mutación V617F induce la activación constitutiva de JAK2 así como sus consecuencias patológicas, se propone la posibilidad de diseñar nuevos inhibidores de JAK2 específicos de la forma mutada ya sea porque sean capaces de distinguir entre un residuo de V o de F en la posición 617 de la cadena polipeptídica, o que sean capaces de inhibir las interacciones π -stacking al existir la posibilidad de poder revertir la enzima constitutivamente activa a sus condiciones basales de autoinhibición. El estudio de estos sitios de acción podría definir las características de los compuestos de la colección con más probabilidad de convertirse en hits con especificidad de inhibición frente a JAK2^{V617F}, estableciendo una selección previa al cribado.

Diseño de un ensayo para screening de compuestos activos sobre la diana

Ensayo *high throughput screening* (HTS) en células U2OS

La elección de esta línea celular se basa en la baja fosforilación de STAT5 en su estado salvaje. Por tanto, los efectos observables serán únicamente atribuibles a la inducción experimental de la ruta, al depender de forma directa la fosforilación de STAT5 de JAK2 y no de otras quinasas. Las células U2OS (ATCC) se dividirán en dos grupos: (i) grupo control al que se le induce la expresión de GFP-STAT5 mediante un vector previamente diseñado, (ii) grupo mutado al que se le induce la expresión de GFP-STAT5 del mismo modo además de la mutación JAK2^{V617F} mediante un vector con dicha secuencia modificada mediante mutagénesis dirigida. El resultado esperable es que en el grupo control haya fluorescencia en el

citoplasma y en el grupo con JAK2 mutado la fluorescencia se dé en el núcleo, ya que la ruta JAK-STAT está activada y pSTAT5 transloca al núcleo [25, 26] (Figura 4).

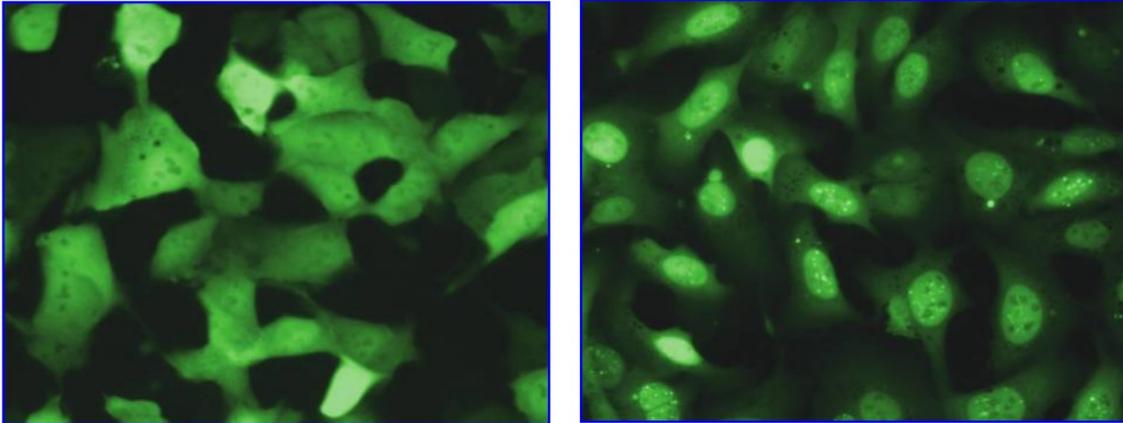


Figura 4.- Resultado esperable por microscopía de fluorescencia cuando STAT5 no se encuentre fosforilado (grupo control, izquierda) y cuando STAT5 esté fosforilado (grupo con JAK2 mutado, derecha) [26].

Una vez generadas estas líneas celulares de forma estable, se plantea el uso de un anticuerpo monoclonal específico para STAT5 fosforilado marcado con un lantánido (terbio). Al excitar las células con un intervalo de longitudes de onda de entre 300-350 nm, si STAT5 se encontrara fosforilado (es decir, la vía JAK-STAT estuviera activa), el terbio se excitaría y su energía de emisión sería absorbida por la GFP (TR-FRET). Como consecuencia, la señal de GFP registrada aumentaría [25, 26] (Figura 5).

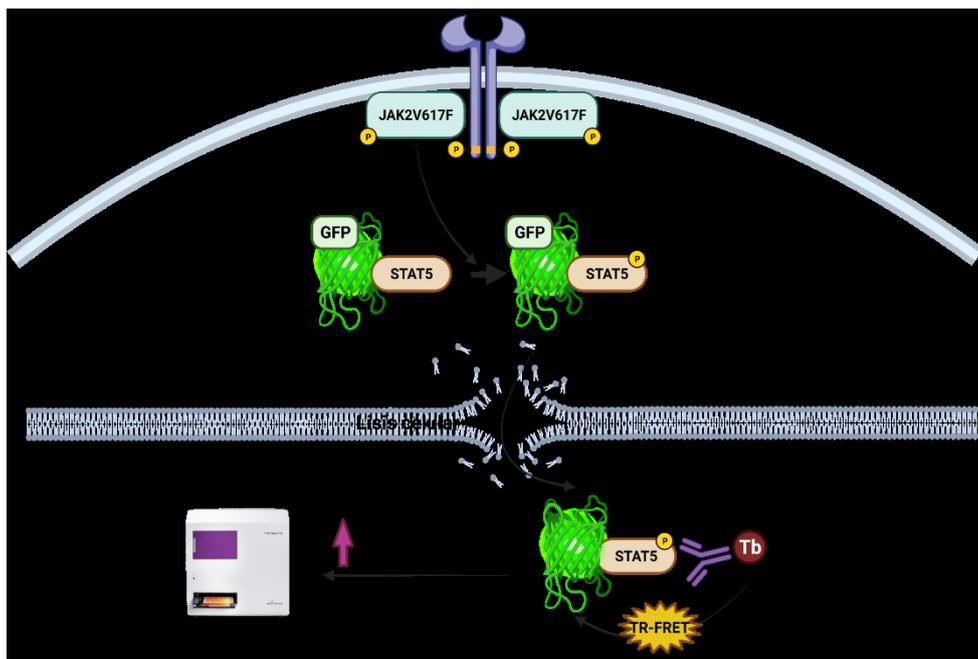


Figura 5.- Esquema de los resultados esperables del ensayo cuando STAT5 se encuentra fosforilado. Elaboración propia empleando BioRender.

Sin embargo, si STAT5 no estuviera fosforilado, el anticuerpo no sería capaz de unirse y la energía de emisión del terbio tras excitarse no sería absorbida por la GFP. Por lo tanto, se observaría un aumento de la señal de emisión del terbio junto con un descenso en la de GFP [25, 26] (Figura 6).

Como resultado, se detectaría la emisión de la GFP cuando la vía JAK-STAT no se esté inhibiendo y la emisión del terbio cuando sí se inhiba. Los grupos de tratamiento serían tres: (i) control negativo sin inhibidor, utilizando DMSO ($\leq 1\%$), vehículo para disolver los compuestos de estudio; (ii) Ruxolitinib, tomado como control positivo (dosis de 3 nM, su IC_{50}) (Selleck Chemicals); (iii) cada uno de los compuestos de estudio (dosis altas de 10 μ M).

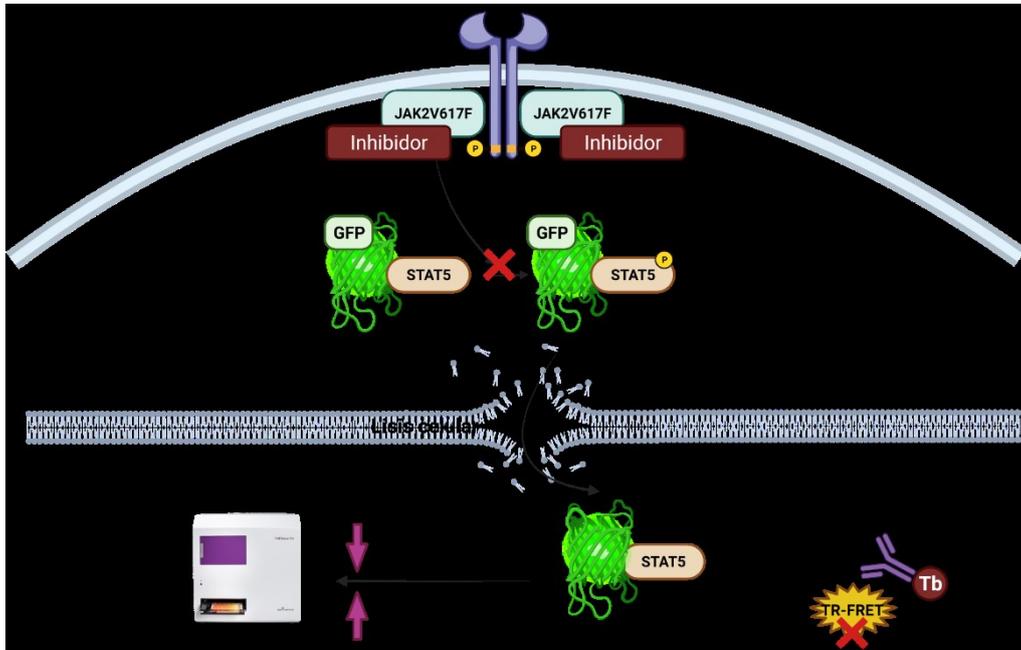


Figura 6.- Esquema de los resultados esperables del ensayo cuando STAT5 no se encuentra fosforilado. Elaboración propia empleando BioRender.

Diseño de plásmidos

Brevemente, los plásmidos propuestos se compondrían de un esqueleto comercial al que se le insertaría la secuencia de STAT5 o de JAK2^{V617F}. En el caso de STAT5, la secuencia provendría de un aislado de extracto celular, retrotranscrito y amplificado mediante PCR, así como una posterior amplificación en la que los cebadores contuvieran sitios de restricción para la correcta inserción de la secuencia en el plásmido. El plásmido utilizado sería pCMV6-AN-mGFP (OriGene Techonologies, Inc.), colocando la secuencia codificante para la GFP de tal forma que se localice en el extremo N-terminal de la proteína (Figura 7).

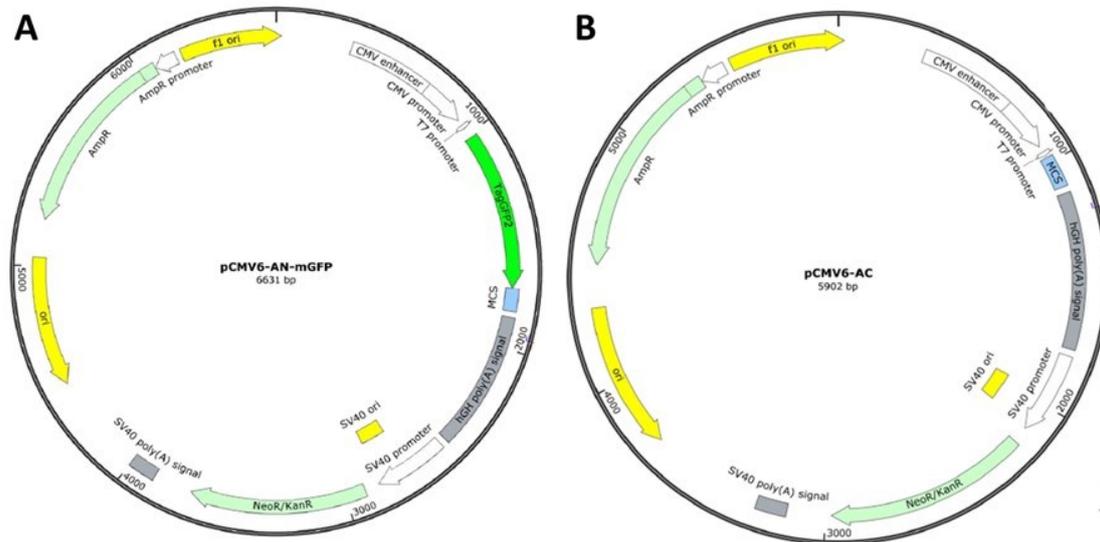


Figura 7.- Plásmidos empleados para la obtención de la línea celular de estudio. Elaboración propia mediante SnapGene.

De este modo, permitiríamos la fosforilación de STAT5 en el extremo C-terminal por JAK2 y evitaríamos impedimentos estéricos a causa de la GFP. Las células que incorporen el plásmido serán seleccionadas mediante crecimiento en medio con neomicina y visualizando el color verde aportado por la GFP mediante microscopía de fluorescencia.

Por lo que respecta al vector utilizado para introducir la mutación de JAK2^{V617F} en la línea celular, se utilizaría pCMV6-AC (OriGene Techonologies, Inc). Este vector no dispone de región codificante para GFP, sino que se introduce el gen de JAK2^{V617F} sin marcar. Se seleccionarán las células que hayan incorporado el vector mediante crecimiento en medio con neomicina.

Cribado de selección

Los compuestos de la biblioteca que resulten ser *hits* serán evaluados en un panel de quinasas (Eurofins Discovery), seleccionándose las moléculas de menor interacción inespecífica con otras quinasas. Estos se tomarán como cabezas de serie para la creación de series de compuestos nuevos mediante procesos de química médica, que pasarán de nuevo por el ensayo HTS. Además de su actividad inhibitoria frente a JAK2^{V617F}, se evaluará también su potencia. Para asegurar su especificidad, los nuevos compuestos serán sometidos al panel de quinasas para descartar nuevamente las moléculas con mayor inespecificidad de inhibición. Como resultado, se obtendrían los posibles candidatos.

Ensayos *in vitro* en líneas celulares

Los posibles candidatos de la fase anterior se evaluarán frente a tres líneas celulares humanas mutadas en JAK2^{V617F}: HEL, MUTZ-8 y SET-2 (DMSZ) [27, 28]. De este modo, se obtendrá información adicional sobre el comportamiento de los candidatos en líneas celulares no modificadas genéticamente que expresan JAK2^{V617F}. Se emplearán los mismos controles que en el caso anterior: Ruxolitinib como control positivo y el vehículo DMSO ($\leq 1\%$) como control negativo. La actividad de los compuestos sobre las células se evaluará cuantificando los elementos de la ruta JAK-STAT, pERK, pAKT y pSTAT5, mediante Western Blot [29]. Además, se llevará a cabo un panel de citotoxicidad (Eurofins Discovery) que aporte información extra a cerca de las propiedades ADME-Tox de los compuestos. Previamente al paso a modelo *in vivo*, se tendrá en cuenta la complejidad del proceso de escalado de las moléculas seleccionadas, descartando aquellas cuya producción pueda no resultar rentable.

Ensayos *in vivo*: modelos animales

Como modelo *in vivo*, se plantea el uso de ratones *knock-in* C57BL/6 con una mutación inducida JAK2^{V617F} [30]. Brevemente, la mutación de una guanina (G) por una timina (T) en la región del gen correspondiente a los exones 13-14 de JAK2, junto con una secuencia de resistencia a la neomicina, se introducen en blastocistos de C57BL/6 mediante recombinación homóloga [30] (Figura 8). Estos blastocistos serán seleccionados empleando neomicina e implantados en ratonas pseudogestantes. Al llegar a la edad adulta, se cruzarán con ratones FLP TG C57BL/6, que codifican para una flipasa capaz de eliminar la región de resistencia a neomicina [30] (Figura 8). Por último, la F1 resultante será homocigota para la mutación, por lo que se cruzará con individuos de fondo genético conocido, ratones 129sv, para alcanzar un modelo de mutación en heterocigosis [30] (Figura 8). La administración de: (i) vehículo en el grupo control negativo; (ii) Ruxolitinib en el grupo control positivo; (iii) candidatos; se llevaría a cabo por vía intravenosa a nivel de la cola. Semanalmente, se realizarían análisis de sangre para evaluar cambios en parámetros bioquímicos y hemáticos básicos. También se propone realizar un Western Blot del tejido del bazo y médula ósea *post-mortem*, en el que se medirían los niveles de pAKT, pSTAT5 y pERK.

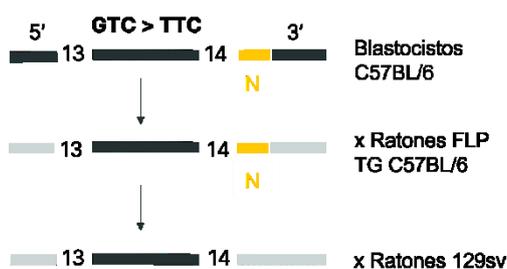


Figura 8.- Esquema de la obtención de ratones heterocigotos para JAK2^{V617F}. Elaboración propia.

Aunque JAK2 está muy presente en el aparato reproductor femenino, no se plantea realizar estudios de teratogenia con los posibles candidatos, ya que la población diana se encuentra mayoritariamente en edad no reproductiva y que nuestros candidatos presentarían una mayor afinidad por la forma mutada de JAK2 [31].

Discusión y conclusiones: resultados esperables, posibles problemas y alternativas.

La PV es una enfermedad causada, mayoritariamente, por una mutación puntual en el receptor JAK2 (V617F) en células mieloides [6]. Esta mutación causa una activación constitutiva de la vía que termina dando lugar a un síndrome inflamatorio y mieloproliferativo con graves consecuencias [1]. Además, su subestimada prevalencia dada la inespecificidad de los síntomas, así como la severidad de sus consecuencias y la falta de tratamientos eficaces, justifican la búsqueda de nuevos inhibidores específicos de JAK2^{V617F}.

Tras el *screening* farmacológico exhaustivo y dirigido, se espera obtener compuestos con la actividad y propiedades adecuadas para continuar con su desarrollo hacia compuestos válidos para su aprobación por las agencias reguladoras (fármacos). Asimismo, somos conscientes de las limitaciones de este tipo de inhibidores en cuanto a la especificidad, tema que ha intentado evitarse mediante el estudio de los *hits* en el panel de quinasas. El panel de quinasas también proporciona información adicional sobre la actividad inespecífica de nuestros inhibidores, lo que puede repercutir en la mejora de cada uno de los *hits* identificados. Además, el panel de citotoxicidad y la evaluación del proceso de escalado al completo suponen una estrategia de ahorro de costes y tiempo de forma temprana.

Por lo que respecta a las técnicas propuestas, consideramos que una técnica fluorimétrica aumenta la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados. Adicionalmente, ésta se basa en un solo anticuerpo, lo que ahorra costes y tiempo al evitar los lavados necesarios cuando se utiliza más de uno. Dicho anticuerpo lleva conjugado un lantánido (terbio) que tiene una vida media de emisión larga (del rango de microsegundos/ milisegundos) lo que permite la extinción de interferencias de fondo como la autofluorescencia [25]. Además, la medición de la señal basada en el cociente donador/aceptor compensa los cambios en los pequeños volúmenes que existen entre los ensayos. El diseño de los plásmidos que codifican para la proteína STAT5-GFP también ha sido cuidadosamente estudiado, evitándose la interferencia de la GFP en la dimerización de STAT5 al añadirla en el extremo N-terminal.

El modelo *in vivo* seleccionado puede aportar resultados asimilables a los de la patología real, presentando estos ratones todo el rango sintomatológico de los enfermos con PV [30]. Hemos seleccionado esta opción respecto al uso de otros modelos experimentales ya que es el único modelo que presenta la causa de base en la enfermedad humana. El resto de los modelos existentes simulan la sintomatología de los pacientes con PV, pudiendo inducir los resultados obtenidos con los mismos a conclusiones erróneas o no extrapolables.

En conclusión, los inhibidores de quinasas desarrollados podrían utilizarse como terapia previa a una ablación medular e introducción de progenitores modificados genéticamente con CRISPR-Cas9 (terapia definitiva para corregir la PV), así como terapia efectiva en pacientes de edad avanzada, mejorando la calidad y esperanza de vida.

Referencias

1. Tefferi, A., & Barbui, T. (2020). Polycythemia vera and essential thrombocytemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 95:1599-1613.
2. Orphanet. (2010). *Polycythemia vera*. Recuperado el 29 de Marzo de 2022, de Orphanet: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=729&lng=EN
3. Tefferi, A., Guglielmelli, P., Larson, D., Finke, C., Wassie, E., Pieri, L., Vannucchi, A. (2014). Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*, 124(16):2507-2513. doi:10.1182/blood-2014-05-579136
4. Marneth, A., & Mullally, A. (2019). The Molecular Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a034876. doi:10.1101/cshperspect.a034876
5. Tefferi, A., & Vainchenker, W. (2011). Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(5), 573–582. doi:10.1200/JCO.2010.29.8711
6. Levine, R., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B., Wernig, G., Huntly, B., Gilliland, D. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7(4): 387-397. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.023
7. Constantinescu, S., Vainchenker, W., Levy, G., & Papadopoulos, N. (2021). Functional Consequences of Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *Hemasphere*, 5(6):e578. doi:10.1097/HS9.0000000000000578
8. Nagalla, S. (2021). *Polycythemia Vera*. Recuperado Marzo de 2022, de E-medicine from Medscape: <https://emedicine.medscape.com/article/205114-clinical#b4>
9. Griesshammer, M., Gisslinger, H., & Mesa, R. (2015). Current and future treatment options for polycythemia vera. *Annals of hematology*, 94, 901–910. doi:https://doi.org/10.1007/s00277-015-2357-4
10. Spivak, J. (2018). Polycythemia Vera. *Current treatment options in oncology*, 19, 12. doi:https://doi.org/10.1007/s11864-018-0529-x
11. Fox, S., Griffin, L., & Robinson Harris, D. (2021). Polycythemia Vera: Rapid Evidence Review. *American family physician*, 103(11), 680–687.
12. Marchioli, R., Finazzi, G., Specchia, G., Cacciola, R., Cavazzina, R., Cilloni, D. CYTO-PV Collaborative Group. (2013). Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *The New England journal of medicine*, 368(1), 22–33. doi:10.1056/NEJMoa1208500
13. Solberg, L. J. (2002). Therapeutic options for essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Seminars in oncology*, 29(3 Suppl 10), 10–15. doi:10.1053/sonc.2002.33755

14. Landolfi, R., Marchioli, R., Kutti, J., Gisslinger, H., Tognoni, G., Patrono, C. European Collaboration on Low-Dose Aspirin, i. (2004). Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *The New England journal of medicine*, 350(2), 114–124. doi:10.1056/nejmoa035572
15. Chifotides, H., Bose, P., & Verstovsek, S. (2020). Givinostat: an emerging treatment for polycythemia vera. *Expert opinion on investigational drugs*, 29(6), 525–536. doi:https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1761323
16. Silvennoinen, O., Witthuhn, B., Quelle, F., Cleveland, J., Yi, T., & Ihle, J. (1993). Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 8429–8433. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8429
17. Teofili, L., Martini, M., Cenci, T., Petrucci, G., Torti, L., Storti, S., Larocca, L. (2007). Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood*, 110(1):354-9. doi:10.1182/blood-2007-01-069237
18. Ginzburg, Y., Feola, M., Zimran, E., Varkonyi, J., Ganz, T., & Hoffman, R. (2018). Dysregulated iron metabolism in polycythemia vera: etiology and consequences. *Leukemia*, 32(10), 2105–2116. doi:10.1038/s41375-018-0207-9
19. Laubach, J., Fu, P., Jiang, X., Salter, K., Potti, A., & Arcasoy, M. (2009). Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Experimental hematology*, 37(12), 1411–1422. doi:10.1016/j.exphem.2009.09.009
20. Wilkes, M., Shibuya, A., & Sakamoto, K. (2021). Signaling Pathways That Regulate Normal and Aberrant Red Blood Cell Development. *Genes (Basel)*, 12(10):1646. doi:10.3390/genes12101646
21. Silvennoinen, O., Ungureanu, D., Niranja, Y., Hammaren, H., Bandaranayake, R., & Hubbard, S. (2013). New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochemical Society transactions*, 41, 1002–1007. doi:https://doi.org/10.1042/BST20130005
22. Leroy, E., Balligand, T., Pecquet, C., Mouton, C., Colau, D., Shiau, A., Constantinescu, S. (2019). Differential effect of inhibitory strategies of the V617 mutant of JAK2 on cytokine receptor signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 144, 224–235. doi:https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.1023
23. Bandaranayake et al., 2012 Bandaranayake, R., Ungureanu, D., Shan, Y., Shaw, D., Silvennoinen, O., & Hubbard, S. (2012). Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nature structural & molecular biology*, Nature structural & molecular biology, 19(8), 754–759. doi:https://doi.org/10.1038/nsmb.2348
24. Davis, R., Li, B., Yun, S., Chan, A., Nareddy, P., Gunawan, S., Schönbrunn, E. (2021). Structural Insights into JAK2 Inhibition by Ruxolitinib, Fedratinib, and Derivatives Thereof. *Journal of medicinal chemistry*, 64, 2228–2241. doi:https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01952
25. Riddle, S., Vedvik, K., Hanson, G., & Vogel, K. (2006). Time-resolved fluorescence resonance energy transfer kinase assays using physiological protein substrates: applications of terbium-fluorescein and terbium-green fluorescent protein fluorescence resonance energy transfer pairs. *Analytical biochemistry*, 356(1), 108–116. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.017
26. Robers, M., Machleidt, T., Carlson, C., & Bi, K. (2008). Cellular LanthaScreen and beta-lactamase reporter assays for high-throughput screening of JAK2 inhibitors. *Assay and drug development technologies*, 6(4), 519–529. doi:https://doi.org/10.1089/adt.2008.144
27. Bartalucci, N., Guglielmelli, P., & Vannucchi, A. (2020). Polycythemia vera: the current status of preclinical models and therapeutic targets. *Expert opinion on therapeutic targets*, 24(7), 615–628. doi:https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1762176
28. Quentmeier, H., MacLeod, R., Zaborski, M., & Drexler, H. (2006). JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 20(3), 471–476. doi:https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404081
29. Greenfield, E. (2021). Hybridoma Screening by Antibody Capture: A High-Throughput Western Blot Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2021(11). doi:10.1101/pdb.prot103069
30. Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M.-C., Villeval, J.-L. (2010). Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood*, 116(5):783-7. doi:10.1182/blood-2009-12-257063
31. The Human Protein Atlas Project. (2022). *JAK2 protein expression tissue distribution*. Recuperado el 29 de Marzo de 2022, de The Human Protein Atlas: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000096968-JAK2>