

## ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PRINCIPALES VÍAS PROLIFERATIVAS REGULADAS POR JAK2 EN CÉLULAS PRIMARIAS DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS

S. Barrio<sup>1</sup>, M. Gallardo<sup>1</sup>, R. Ayala<sup>1</sup>, E. Albizua<sup>1</sup>, I. Rapado<sup>1</sup>, A. Jiménez<sup>1</sup>, M. Candelas<sup>1</sup>, J.C. González-Armas<sup>2</sup>, S. Redondo<sup>3</sup>, J.A. Hernández<sup>4</sup>, F. Gilsanz<sup>1</sup>, J. Martínez-López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. <sup>2</sup>Instituto de Investigación. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. <sup>3</sup>Servicio de Hematología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. <sup>4</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario Infanta Leonor. Madrid

**Objetivos:** Analizar los efectos del bloqueo de las vías proliferativas relacionadas con JAK2; MAPK, SRC y AKT. Comparar los efectos del nuevo inhibidor de JAK1/2 (INC424) con los inhibidores Dasatinib, Perifosine y Sorafenib, en diferentes modelos celulares y células primarias de Neoplasias Mieloproliferativas crónicas philadelphia negativas (NMP).

**Material y métodos:** Las líneas celulares JAK2V617F positivas HEL y HELR así como la línea HL60 se cultivaron en medio IMDM con SBF al 10%. La línea resistente a Hidroxiurea (HU) HELR, se obtuvo a partir de la línea HEL, bajo una presión selectiva de HU 1mM durante 4 meses. Para el cultivo de colonias eritroides, las células mononucleadas de 14 muestras de NMPc JAK2V617F positivas al diagnóstico; 8 PV y 6 TE, se sembraron en metilcelulosa complementada con EPO, IL3 y SCF (crecimiento facilitado) o con IL3, SCF (crecimiento endógeno). Los cultivos se incubaron por duplicado 14 días en presencia de INC424 (0-100nM), Dasatinib (0-100nM), Perifosine (0-100µM) y Sorafenib (0-100µM). Además se cultivaron células de 3 donantes control. Tras el conteo de colonias, el número de células viables se determinó con azul trypan o WST. La expresión de los marcadores de superficie CD71, CD41a, CD45, CD34 y las proteínas intracelulares SRC y Phospho-SRC fue analizada mediante citometría de flujo. La apoptosis fue cuantificada con Anexina V. Por último se determinó la concentración de las proteínas MEK, Phospho-MEK, AKT, Phospho-AKT, p38 y Phospho-P38 mediante el inmunoensayo Cytometric Bead Array (CBA, Becton Dickinson).

**Resultados:** La línea HELR, presentaba una resistencia a HU 10 veces superior que la línea HEL. Sin embargo, ambas respondían igual a todos los fármacos. Los cultivos de colonias eritroides mostraron un IC50 de 50-100 nM en el cultivo suplementado con EPO y de 10nM en crecimiento endógeno para el inhibidor de JAK1/2. Dasatinib presentó un IC50 entre 1-10nM. El inhibidor de AKT, Perifosine, mostró un IC50 de 10µM en Policitemia Vera (PV) y de 50µM en Trombocitemia Esencial (TE). Por último, el tratamiento con Sorafenib (inhibidor de RAF1) mostró un IC50 de 1 µM en PV y de 5 µM en TE. Los resultados de citometría de flujo indicaron una marcada disminución de la serie eritroide, y en contraposición un ligero incremento de las series megacariocítica, y pan-leucocitaria en el tratamiento con Sorafenib. El análisis por CBA reflejó una disminución del número de unidades de Phospho-P38 en presencia de este fármaco. No se observó un incremento significativo de la apoptosis bajo ninguno de los tratamientos.

**Conclusiones:** La inhibición de las vías SRC, AKT o MAPK por si sola es capaz de revertir el desarrollo de colonias eritroides en NMP. Dasatinib muestra una efectividad similar al inhibidor de JAK1/2. Sorafenib inhibe el crecimiento de colonias endógenas eritroides en enfermos con PV y TE. Además Sorafenib parece producir este efecto bloqueando la diferenciación eritroide vía p38, lo que subraya la importancia de la vía MAPK en la diferenciación eritroide.