

Facultad de Medicina Universidad de Antioquia

Residencia de Hematología

Proyecto

Perfil de mutaciones de JAK2, CALR y MPL y su relación con parámetros de laboratorio en pacientes con Policitemia Vera, Trombocitemia esencial o Mielofibrosis primaria.

Investigadores

Sara Naranjo Molina, médica internista, residente de hematología Universidad de Antioquia

Director

Gonzalo de Jesús Vásquez Palacio, profesor biología molecular, Facultad de medicina Universidad de Antioquia

Asesor metodológico

Sigifredo Ospina, Médico epidemiólogo, profesor Facultad de Medicina Universidad de Antioquia

Medellín, 2021

Perfil de mutaciones de JAK2, CALR y MPL y su relación con parámetros de laboratorio en pacientes con Policitemia Vera, Trombocitemia esencial o Mielofibrosis primaria.

Sara Naranjo Molina<sup>1</sup>, Ana Isabel Giraldo Rincón<sup>2</sup>, Natalia Gómez Lopera<sup>2</sup>, Katherine Palacio<sup>3</sup> Rua, Sigifredo Ospina<sup>4</sup>, Lina Gaviria<sup>5</sup>, Gonzalo Vásquez Palacio<sup>3</sup>.

1. Residente en Hematología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia
2. Investigadora del grupo de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.
3. Genética y biología molecular, LIME, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.
4. Médico epidemiólogo, profesor Facultad de Medicina Universidad de Antioquia
5. Médica especialista en hematología adultos, Hospital San Vicente Fundación.

## Resumen

### Introducción

La policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP), son neoplasias mieloproliferativas que se caracterizan por la proliferación mioide clonal sin características de mielodisplasia. La detección de mutaciones conductoras distintivas tales como JAK2V617F, exón 12 de JAK2, MPL y calrecticulina (CALR) son importantes para su diagnóstico. El objetivo de esta investigación fue establecer las frecuencias de las mutaciones de los genes JAK2, MPL y CALR en un grupo de pacientes colombianos con diagnóstico clínico de PV, TE y MFP

### Método

Se realizó un estudio descriptivo prospectivo transversal. Se incluyeron 52 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de PV, TE y MFP según criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios por biología molecular de los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* en la Unidad de Genética Médica - LIME de la Universidad de Antioquia, remitidos de diferentes hospitales de Medellín entre 2017 y 2021.

### Resultados

Se incluyeron 52 pacientes, de los cuales 28 (52.2%) fueron del sexo masculino. La edad promedio fue de 58 años (DE 15.8), con un mínimo de 16 y un máximo de 87 años. El diagnóstico más frecuente fue la trombocitemia esencial, en 19 (36,5%) pacientes; seguido por Mielofibrosis primaria en 14 (27%) y policitemia vera en 14 (27%). Entre los parámetros de laboratorio comparados se encontró que los pacientes con mutaciones en CALR presentaban

niveles de hemoglobina y leucocitos más bajos y un nivel de plaquetas más alto en comparación con los pacientes con mutaciones en JAK2.

## **Conclusión**

Los hallazgos de las frecuencias de mutaciones los genes JAK2, MPL y CALR de concuerdan con la información reportada en estudios previos en distintas poblaciones. Este el primer estudio centrado en las 3 características moleculares (JAK2, CALR Y MPL) en paciente con PV, TE y MFP publicado en Colombia, por lo cual se destaca la importancia de la genotipificación de estos genes en el diagnóstico de estas enfermedades.

**Palabras clave:** Trombocitemia esencial; Neoplasias mieloproliferativas; Policitemia vera; Mielofibrosis primaria; Mutaciones

## **Introducción**

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) no asociadas a mutaciones en BCR-ABL ó Filadelfia negativas son un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación clonal de células mieloides con madurez morfológica y eficiencia hematopoyética variables. Según la clasificación de la OMS del 2016 (1) en este grupo se encuentran policitemia Vera (PV), la mielofibrosis primaria (MFP), la trombocitemia esencial (TE), la leucemia neutrofílica crónica, la leucemia eosinofílica crónica, la mastocitosis y la neoplasia mieloproliferativa no clasificable. Las patologías más comunes entre las NMPC BCR-ABL negativas son la PV, la TE y la MFP (1,2), las cuales fueron el objeto de esta investigación. La incidencia anual de este grupo de enfermedades según reportes mundiales es de 0.44-5.87 casos por 100,000 habitantes, con tasas anuales de 0.84, 1.03 y 0.47 casos por 100,000 habitantes para PV, TE y MFP, respectivamente (2,4). Hasta el momento, la incidencia y prevalencia de las NMPC BCR-ABL negativas en Colombia es poco conocida; en el anuario estadístico del Instituto Nacional de Cancerología de 2011 se reportaron 8 NMPC de 251 neoplasias hematológicas diagnosticadas durante ese año (5). En el primer informe Primer informe del registro colombiano de NMPC realizado por la Asociación Colombiana de Hematología y Oncología (ACHO), se reportaron 179 pacientes recolectados en diferentes hospitales del país desde 2013 hasta 2017, en este grupo la TE fue la enfermedad más frecuente de las tres patologías, con 93 pacientes (51.9%), seguido de la PV con 55 pacientes (30,7%) y la MFP con 31 pacientes (17,3%). (6)

La PV, la TE y la MFP se originan por mutaciones en los genes que participan en la regulación de la vía de señalización JAK-STAT; entre estos se encuentran los genes JAK2, MPL y CALR. La mutación de la tirosina-kinasa JAK2 V617F conduce a una sustitución de valina por fenilalanina en la posición 617, lo que produce una fosforilación constitutiva del JAK2 y Ba/F3 o Ba/F3-EpoR, permitiendo que varias líneas celulares sobrevivan y proliferen independiente de las citocinas. Las mutaciones en el gen MPL, como el cambio W> L o W> K en el codón 515, causan la activación espontánea de la vía JAK-STAT. Se han encontrado mutaciones somáticas en el gen CALR, que implican cambios en el marco de lectura, causadas por deleciones o inserciones del exón 9. (2,8)

La PV se caracteriza por un aumento en la producción de glóbulos rojos independiente de los mecanismos que normalmente regulan la eritropoyesis. El 95% de los pacientes con PV presentan la mutación molecular en el gen JAK2 V617F exón 14, (9p24), el gen JAK2 también puede presentar pequeñas deleciones o inserciones en el exón 12 que originan la proliferación, no solo del linaje eritroide, sino a otras líneas mieloides (panmielosis) (2). Por otro lado, la TE compromete principalmente el linaje megacariocítico, que se caracteriza por una trombocitosis sostenida (recuento de plaquetas > 450 x 10<sup>9</sup>/L) en la sangre periférica y un aumento de megacariocitos maduros de gran tamaño, que forman clusters (1). Los pacientes con TE presentan una mutación en JAK2 en el 50-60% de los casos, mutaciones en CALR en el 30% y mutaciones en MPL en el 3%, aproximadamente el 12% son triple negativos. Ninguna de estas mutaciones es específica para TE, pero su presencia excluye la trombocitosis reactiva (principal diagnóstico diferencial de la TE) (4,5). Por último, la MFP se caracteriza por una proliferación en médula ósea de granulocitos y megacariocitos, que en etapas tardías de la enfermedad, se asocia con deposición de tejido fibroso conectivo y hematopoyesis extramedular (5). La mutación JAK2 V617F se encuentra en el 50-60% de los casos sin importar la etapa de la enfermedad, la mutación de CALR en el 24% de los casos y mutaciones en MPL en 8%. Alrededor del 12% de los casos son triple negativos (7).

El gen MPL (1p34) conformado por 12 exones y codifica el receptor de trombopoyetina (TPOR). Entre 5 y 10 % de los pacientes con TE o MPF sin alteraciones del JAK2 presentan mutaciones en el exón 10 del gen MPL. La presencia de alguna de estas mutaciones conduce a la activación del receptor en ausencia de trombopoyetina, induciendo una activación

constitutiva de la vía de señalización JAK-STAT. En este gen se han informado 5 mutaciones recurrentes que involucran a dos aminoácidos (W515L, W515K, W515A, W515R y S505N) siendo las más frecuentes W515L y W515. (13)

El gen de la calreticulina (CALR) (19p13.2) codifica una chaperona fundamental para el correcto plegado de proteínas y homeostasis del calcio. Las mutaciones de este gen están presentes en 50 a 75% de los pacientes con TE o MFP negativos para mutaciones de JAK2 y MPL, lo cual posibilita la unión anómala con el receptor MPL en el retículo endoplásmico, con la consecuente activación constitutiva del mismo (9)

Las mutaciones en los genes JAK2, MPL y CALR son fundamentales para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con PV, TE y MFP, las cuales han sido sugeridas y revisadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2008 y 2016 (2). En el

En el primer informe Primer informe del registro colombiano de NMPC de la ACHO se reportó que la prueba para la mutación JAK2V617F se realizó en 103 de 179 pacientes (57.5%) y fue positiva en el 53.5% de ellos, cuando se evalúa por enfermedad se reporta que la prueba fue positiva en 60% de los pacientes con PV, en el 45% de los pacientes con TE y en el 64% de los pacientes con MFP. (6)

Hasta la fecha de este estudio no se encontraron otros estudios prospectivos específicos para determinar la frecuencia de las 3 mutaciones en las enfermedades mencionadas, en Colombia. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue establecer las frecuencias de las mutaciones de los genes JAK2, MPL y CALR en un grupo de pacientes colombianos con diagnóstico clínico e histopatológico de la PV, la TE y la MFP, y su relación con parámetros de laboratorio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio descriptivo prospectivo transversal.

Para la selección de la población se tuvieron en cuenta los pacientes mayores de 15 años, de ambos sexos, de las diferentes instituciones participantes que tenían cualquiera de los diagnósticos incluidos en el estudio (PV, TE y MFP). Previa identificación del paciente por parte de los hematólogos de cada institución, se les solicitó informarlo al grupo de

investigación, quienes se desplazaron para la toma de datos de las variables y la toma de la muestra para el estudio de las mutaciones en la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

Se tomó una muestra por conveniencia de 52 pacientes obtenidos de manera consecutiva, a medida que se iba recibiendo información por parte de las instituciones participantes (Hospital San Vicente Fundación, Clínica León XIII, IPS Universitaria y Hospital Pablo Tobón Uribe), entre 2017 y 2021.

Posterior a la firma del consentimiento informado, se procedió a la toma de las muestras de sangre periférica para el estudio por biología molecular de los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR*, cuyo procedimiento se detalla en el anexo 1.

La información relacionada con las variables demográficas, clínicas, resultados de laboratorio, y hallazgos genéticos fueron consignadas en una base de datos en Excel (Microsoft) y luego exportadas al paquete estadístico JASP, para su posterior análisis.

Para el análisis de los datos se utilizaron, para las variables cuantitativas, medidas de tendencia central como la media con su desviación estándar o la mediana con su rango intercuartílico, según la distribución de los datos utilizando la prueba de Shapiro Wilk. Para las variables cualitativas se utilizaron las distribuciones de frecuencias absolutas y relativas de cada una de las categorías de las variables.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética para experimentación en humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

## **RESULTADOS**

Se incluyeron en el estudio 52 pacientes, de los cuales 27(51.9%) fueron del sexo masculino. La edad promedio fue de 58 años (DE 15.8), con un mínimo de 16 y un máximo de 87 años. En la tabla 1 se presenta la relación del sexo y la media de la edad con el diagnóstico.

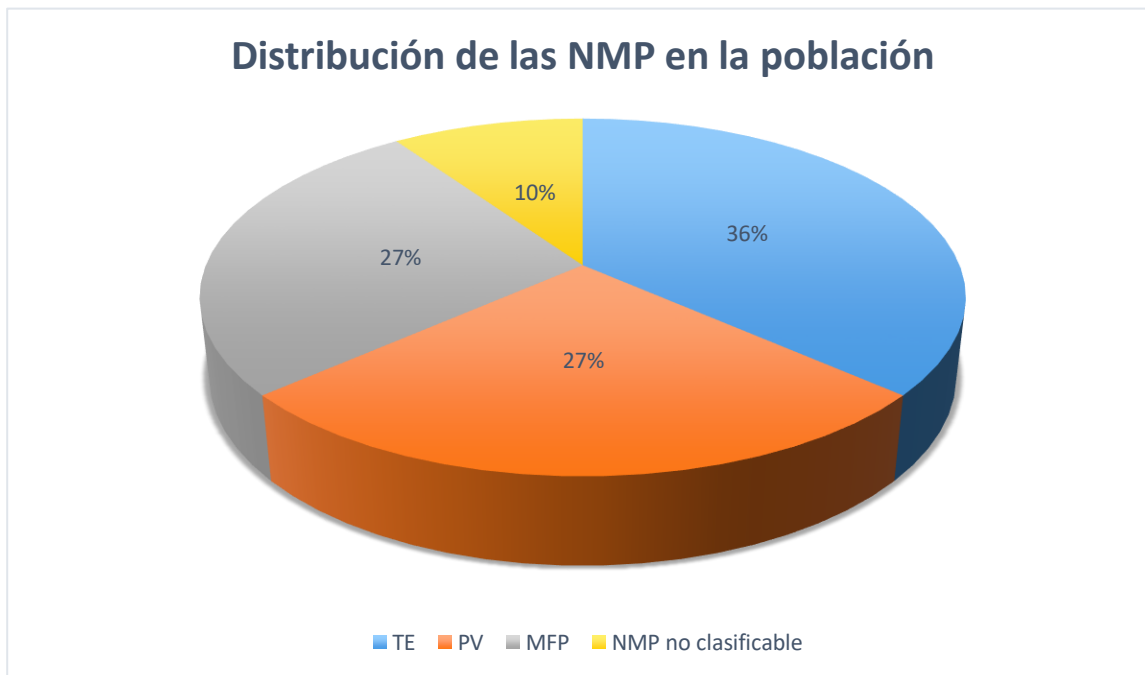
El diagnóstico más frecuente fue la trombocitemia esencial, en 19 (36.1%) pacientes; seguido por Mielofibrosis primaria y policitemia vera cada uno con 14 pacientes (26.9%). Por ultimo, 5 (9.6%) pacientes no fue posible clasificarlos en uno de los tres diagnósticos y quedaron como

NMPC BCR-ABL negativas no clasificables (Figura 1).

Tabla 1. Distribución de los pacientes con PV, TE y MFP según diagnóstico, sexo y edad.

Variable	TE, n=19	PV, n=14	MFP, n=14	No clasificable n=5	Total n=52
<b>Hombres, n(%)</b>	6 (31.5)	10 (71.4)	9 (64.3)	3 (60)	28 (52.2%)
<b>Edad (Media, DE)</b>	54 (15,7)	58 (15,7)	57(15,9)	59 (16,3)	58 (15,8)

Figura 1. Distribución de los pacientes con PV, TE y MFP según diagnóstico



De los 52 pacientes estudiados, 28 (52.2%) presentaron la mutación V617F en el gen JAK2, 12 (23%) tenían un cambio en el marco de lectura del exón 9 del gen CALR, 2 (3.8%) tienen

mutado el gen MPL y 11 (21.1%) resultaron ser triple negativos para las mutaciones en estos genes. La positividad de la mutación V617F del gen JAK2 fue de un 85% en PV, 31.6% en TE, 35.7% en MFP y 80% en NMPC BCR-ABL negativas no clasificables. Las mutaciones en el exón 9 de CALR se encontraron en un 26% en TE y 35% en MFP y, las mutaciones en el exón 10 de MPL fueron del 14.3% en MFP. Además, en el grupo de pacientes diagnosticados con TE, se encontró un doble positivo para JAK2 V617F y CALR, el cual tiene un aporte doble a las frecuencias de estos genes (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias de mutaciones conductoras en paciente con PV, TE y MFP

	JAK2	CALR	MPL	Triple Negativos
<b>Frecuencias totales</b> n=52 (%)	27 (51,9%)	12 (23%)	2 (3,8%)	12 (23%)
<b>Frecuencias por Neoplasia</b>				
<b>PV</b> n=14 (%)	12 (85,7%)	0	0	2 (14,3%)
<b>TE</b> n=19 (%)	6 (31,6%)	5 (26,3%)	0	8 (42,1%)
<b>MFP</b> n=14 (%)	5 (35,7%)	5 (35,7%)	2 (14,3%)	2 (14,3%)
<b>No clasificable</b> n=5 (%)	4 (80%)	0	0	1 (20%)

En la tabla 3 se describen los principales factores clínicos y hematológicos característicos de los pacientes con PV, TE y MFP, según su genotipo. El grupo MPL fue excluido del análisis estadístico debido a que tenía una muestra no representativa, solo con 2 pacientes. Se encuentra una tendencia de los resultados de los pacientes con la mutación de CALR a presentar recuentos más bajos de glóbulos blancos, hemoglobina más baja, niveles de plaquetas más altos y menores niveles de LDH en comparación con mutación en JAK2. Se dividen los pacientes con JAK2 según enfermedad pero no se dividen ni los de CALR o los triple negativos por el bajo número de pacientes que alteraría los parámetros de análisis.



Tabla 3. Distribución de los pacientes con PV, TE y MFP según la presencia de la mutación y las características de laboratorio.

Parámetro de laboratorio	JAK2 positivo (n:27)			CALR positivo (n:12)	Triple negativos (n:12)
	PV	TE	MFP		
<b>Hemoglobina, media (DE)</b>	17,3 (3,3)	12 (2,3)	13,1 (2,7)	12,1 (2,1)	13.2 (3.5)
<b>Hematocrito, media (DE)</b>	52,6 (2,5)	44 (23,5)	43,5 (15,9)	36,7 (7,3)	40.3 (10.9)
<b>Plaquetas x10<sup>3</sup>, mediana (RIC)</b>	376 (315-485)	551 (251-945)	222 (157-304)	491 (232-933)	865 (660-1790)
<b>Leucocitos x10<sup>3</sup>, mediana (RIC)</b>	8,9 (7,2-12)	12,3 (3,8-18,7)	6,4 (4,5-8,6)	6,7 (5,3-8,7)	11,1 (6,1-21)
<b>Neutrófilos x10<sup>3</sup>, mediana (RIC)</b>	6,1 (3,3-7,9)	4,6 (1,9-8,1)	3,9 (2,3-5,2)	4,6 (3,6-6,1)	7,7 (2,2-18,2)
<b>LDH, mediana (RIC)</b>	321 (238-497)			268 (256-328)	305 (177-541)
<b>Creatinina, media (DE)</b>	0,8 (0,5)			0.9 (0,4)	0.9(0,3)

## DISCUSIÓN

Entre los pacientes estudiados con diagnóstico de PV, TE y MFP, la edad promedio fue de 58 años, con un mínimo de 16 y un máximo de 87 años, con un leve predominio masculino (52.2%) de los pacientes. En la literatura se reporta una mediana de edad de diagnóstico de 60 años, sin predominio entre hombres y mujeres (2). No se pueden sacar conclusiones sobre la incidencia de cada una de estas enfermedades en la población pues en el estudio solo se tomaron datos de pacientes enfermos.

En esta investigación se encontraron mutaciones JAK2, MPL o CALR en el 51,9%, 23% y 3,8% respectivamente de los pacientes con PV, TE y MFP, adicionalmente se encuentra un 21.1% de pacientes triple negativos para mutaciones en estos genes.

Cuando se evalúa la proporción de JAK2 positivos para pacientes con diagnóstico de PV se encuentra un porcentaje más bajo que lo reportado en la literatura mundial (85% vs 95 a 100%)

(1). Esto se correlaciona con lo encontrado en el reporte realizado en 2017 por la ACHO, con un 60% de positividad de JAK2 en los pacientes con diagnóstico de PV estudiados. (6)

Estudios realizados en otras poblaciones mostraron frecuencias similares de mutaciones en MFP. Llama la atención en TE una mayor proporción de triples negativos que los reportados en la literatura. (2,8,15,17)

En este estudio se encontraron 6 tipos de mutaciones en el exón 9 de CALR, principalmente deleciones, siendo la más prevalente la del codón 385. Como hallazgo relevante, en el grupo de pacientes diagnosticados con TE, se encontró un doble positivo para JAK2 V617F y CALR, el cual tiene un aporte doble a las frecuencias de estos genes y es algo que no se ha reportado previamente. A la luz del conocimiento científico actual no hay una explicación clara para esta situación.

Cuando se realiza una comparación con estudios de mutaciones en pacientes con PV, TE y MFP publicados en diferentes poblaciones de América (tabla 4), se encuentra que la población de este estudio es muy similar a la informada en México, Brasil y en Argentina. En general, las diferencias más grandes son los pacientes con mutaciones y trombocitemia esencial reportados en Estados Unidos y Argentina (11,16). En nuestro estudio presentaron una menor proporción de mutaciones JAK2 y un mayor porcentaje de triple negativos, algo que también se evidenció en los estudios poblacionales de México y Brasil. (16,17)

Cuando se valoran los paraclínicos realizados a los pacientes en relación con las mutaciones se encuentra que los pacientes con mutación CALR tenían recuentos de plaquetas más altos y hemoglobina y leucocitos más bajos, en comparación con los pacientes con JAK2V617F. Se ha informado que las mutaciones CALR están correlacionadas, con edad más joven, mayor recuento de plaquetas, menor recuento de leucocitos y mayor nivel de hemoglobina (10-12). Se dividen los pacientes con JAK2 según enfermedad pero no se dividen ni los de CALR o los triple negativos por el bajo número de pacientes que alteraría los parámetros de análisis. Al analizar los parámetros de laboratorio por enfermedad y JAK2 positivo, las diferencias encontradas pueden ser explicadas por las características de cada enfermedad. Aunque los hallazgos de laboratorio reportados en otros estudios se correlacionan encontrado en nuestro estudio, no se pueden sacar conclusiones al respecto por el número bajo de pacientes.

En los pacientes triple negativos se encuentra una media de las plaquetas más alta que en los

otros grupos, esto se puede explicar porque la gran mayoría de estos pacientes (63%) tienen TE, en quienes la trombocitosis es parte de la enfermedad.

Tabla 4. Comparación de mutaciones en pacientes con PV, TE y MFP en diferentes países de América.

	Autor	JAK2			CALR			MPL		
		PV (%)	TE (%)	MFP (%)	PV (%)	TE (%)	MFP (%)	PV (%)	TE (%)	MFP (%)
1	OMS. 2017 (2)	>95%	50-60%	50-60%	0%	30%	24%	0%	3%	8%
2	Ojeta et al. 2018 (Argentina) (16)	94.9%	61.20%	62%	0%	21.50%	16.30%	0%	2.80%	6.10%
3	Mercado et al. 2015 (México) (17)	62%	36%	25%	0%	29%	25%	0%	7%	0%
4	Kim et al. 2015 (Corea del Sur)	91.4%	63.30%	57.40%	0%	17.70%	14.80%	0%	2.50%	9.30%
5	Szuber et al. 2019 (USA) (11)	100%	61%	67%	0%	15%	3%	0%	13.30%	6%
6	Machado-Neto. 2015 (Brasil) (18)	100%	37%	62%	0%	41%	33%	NA	NA	NA
7	Este proyecto (Colombia)	85%	32.0%	36%	0%	26%	35%	0%	0%	14%

El descubrimiento de características moleculares identificadas en los últimos años ha generado nuevas perspectivas con respecto a los marcadores de diagnóstico y pronóstico que aportan nuevos conocimientos para la comprensión de la patobiología de estos trastornos. Además, la mejor identificación de las características morfológicas que ayudan a diferenciar los grupos de enfermedades, incluyendo la PV, la TE y la MFP, ha aumentado la confiabilidad y reproducibilidad de los diagnósticos, lo que se ha podido validar en varios estudios clínico-patológicos postulado por la OMS con un enfoque integrado que incluye hallazgos hematológicos, morfológicos, citogenéticos y genéticos moleculares (2). El descubrimiento de nuevos hallazgos moleculares además de JAK2, las mutaciones MPL y, en particular, la mutación CALR, proporcionan una prueba de clonalidad, importancia diagnóstica e influencia en el pronóstico (14).

Con base en la fisiopatología de la PV, la TE y la MFP, se están desarrollando medicamentos para tratamiento dirigido de estas enfermedades. Hasta el momento, el único aprobado es el

Ruxolitinib que es un inhibidor de las kinasas JAK1 y JAK2. En nuestro país este medicamento está aprobado por el INVIMA para el tratamiento de MFP de riesgo intermedio o alto y en policitemia vera en adultos con respuesta inadecuada o intolerancia a la hidroxiurea. (4,12).

Como limitantes del estudio debemos mencionar que no es posible extrapolar los resultados del estudio a toda la población que tiene este tipo de enfermedades dado el tipo de muestreo realizado. Además, es importante mencionar que no se realizó la mutación JAK2 del exón 12, el tamaño de la muestra es relativamente bajo debido a las limitaciones presupuestales y al tiempo del estudio, lo que limita sacar conclusiones más amplias.

En conclusión, la proporción de mutaciones estudiadas en los pacientes con MFP concuerdan con la información reportada en estudios previos a nivel internacional; la mutación de JAK2 asociada a PV es menor que reportes internacionales (2,11-18), pero concuerda con lo reportado a nivel nacional (6); además, observamos diferencias en proporción de mutaciones encontradas en pacientes con TE e incluso un paciente con doble mutación que es algo que no se ha reportado anteriormente en estos dos genes.

Nuestros datos muestran similitudes con informes de diferentes estudios a nivel mundial con respecto características de laboratorio hematológico según las mutaciones descritas, pero por el tamaño de la muestra y la metodología del muestreo no se pueden sacar conclusiones más precisas al respecto.

Este es el primer estudio prospectivos específicos para determinar la frecuencia de las mutaciones de JAK2, MPL y CALR en la PV, MFP y TE publicado en Colombia, por lo cual se destaca la importancia de la genotipificación de estas mutaciones para un diagnóstico preciso y tratamiento de los pacientes con NMPC BCR-ABL (PV, TE y MFP). Se recomienda continuar con estos estudios con el uso de técnicas de secuenciación masiva, con el fin de tener una muestra más representativa de la población y así poder conocer mejor la etiopatología de estas enfermedades en la población colombiana con el fin de realizar una terapia dirigida, es decir medicina personalizada.

Este proyecto fue financiado por el centro de investigaciones de la facultad de medicina de la Universidad de Antioquia y la IPS universitaria y con la colaboración del hospital San Vicente

Fundación y el hospital Pablo Tobón Uribe.

## Referencias

1. Greer JP. Wintrobe ' s Clinical hematology. 14th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019. Myeloproliferative neoplasms. Chapters 83 and 84.
2. Leboit PE, Burg G, Weedon D. World Health Organization Classification of Tumours. 4th ed. Lyon; 2016. Chapter 2 Myeloproliferative neoplasms.
3. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, et.al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6760-8. doi: 10.1182/blood-2011-08-373902
4. A. M. Vannucchi, T. Barbui, F. Cervantes, C. Harrison, J.-J. Kiladjan, N. Kröger, J. Thiele and C. Buske. Clinical practice guidelines Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* (2015) 26 (suppl 5): v85-v99.
5. Pardo C. Anuario estadístico 2011. Instituto Nacional de Cancerología - Colombia; 2011. p. 27-8
6. Abello V, Quintero G, Espinosa D, Solano M, Casas C, Saavedra D, et al. Descripción de las características clínicas de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) Primer informe del registro colombiano de NMPC. *Acta Med Colomb* 2017; 42 (1): 35-41.
7. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014 Mar 6;123(10):1544-

51. doi: 10.1182/blood-2013-11-539098. Epub 2013 Dec 23.

8. Rumi E, Passamonti F, Porta MG Della, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, et al. Familial Chronic Myeloproliferative Disorders: Clinical Phenotype and Evidence of Disease Anticipation. *J Clin Oncol*. 2007;25(35):5630–5.

9. de Freitas RM, da Costa Maranduba CM. Myeloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: an overview. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015 Sep-Oct;37(5):348-53. doi: 10.1016/j.bjhh.2014.10.001.

10. Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, Milosevic JD, Casetti IC, Bellini M, et al. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;123(15):2416–9.

11. Szuber N, Mudireddy M, Nicolosi M, Penna D, Vallapureddy RR, Lasho TL, et al. 3023 Mayo Clinic Patients With Myeloproliferative Neoplasms: Risk-Stratified Comparison of Survival and Outcomes Data Among Disease Subgroups. *Mayo Clin Proc*. 2019 Apr;94(4):599-610. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.08.022.

12. 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 Aug 14;124(7):1062-9. doi: 10.1182/blood-2014-05-578435.

13. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1472-7. doi: 10.1038/leu.2014.3.

14. Bendek Georgina, Elhelou Ludmila, Ferrari Luciana, Heller Paula, Kornblihtt Laura, Larripa Irene. Neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas BCR-ABL negativas. *Sociedad Argentina de Hematología • Guías de Diagnóstico y Tratamiento • 2019*. Url: [http://www.sah.org.ar/guias\\_hematolo\\_2019.asp](http://www.sah.org.ar/guias_hematolo_2019.asp) Fecha de consulta:

12/01/2021

15. 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 Oct 16;124(16):2507-13; quiz 2615. doi: 10.1182/blood-2014-05-579136.
16. Ojeda MJ, Bragós IM, Calvo KL, Williams GM, Carbonell MM, Pratti AF et al. CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology*. 2018 May;23(4):208-211. doi: 10.1080/10245332.2017.1385891.
17. Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, Guzman-Olvera V, Reyes-Nuñez V, et al. The mutation profile of JAK2, MPL and CALR in Mexican patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015 Mar;8(1):16-21. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.12.002.
18. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, de Albuquerque DM, Costa FF, Lorand-Metze I, Olalla Saad ST, Traina F. Somatic mutations of calreticulin in a Brazilian cohort of patients with myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015 May-Jun;37(3):211-4. doi: 10.1016/j.bjhh.2015.03.012.
19. Furtado L, Weigelin H, Elenitoba-johnson K, Betz B. Detection of MPL Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy. *J Mol Diagnostics* 2013;15(6):810–820. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.07.006>

Anexo 1. Procedimiento para el estudio por biología molecular de los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR*

La extracción del ADN se realizó a partir de las muestras de sangre total, utilizando el kit

comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden Germany), según las recomendaciones del fabricante.

La detección de mutación p.V617F localizada en el exón 14 del gen JAK2 se realizó por medio de PCR en tiempo real (QPCR) utilizando el kit comercial “JAK2 Mutation Detection Kit” de la marca Amoydx. La detección de las mutaciones MPL W515L y MPL W515K se realizarán utilizando el kit comercial MPL W515L/K MutaScreen Kit de ipsogen, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las muestras con mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciamiento directo utilizando los primers MPL-F:TGGGCCGAAGTCTGACCCTTT, MPL-R:ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGT reportados anteriormente

Por otra parte, para el gen CALR se realizó un análisis de inserciones/deleciones (indel) en el exón 9 mediante un análisis del tamaño de fragmentos amplificados. La amplificación se realizó utilizando los primers diseñados por Park et al, las secuencias utilizadas fueron CALR-F: 5'GAGGTGTGTGCTCTGCCTG3' y CALR-R: 5'AGAGACATTATTTGGCGCGG3', el primer Forward se marcó con 6 fluoresceína (6-FAM), el alelo normal tendrá un tamaño de 298 pb. El análisis del tamaño de los fragmentos se realizó mediante el programa Gene Mapper. Las muestras positivas para indels fueron secuenciadas por el método de electroforesis capilar (ABI 3500) para confirmar los resultados obtenidos por el análisis de fragmentos. El secuenciamiento se realizó utilizando los siguientes primers: CALR.S-F: 5'ACAACCTTCCTCATCACCAACG3' y CALR.S-R: 5'GGCCTCAGTCCAGCCCTG3' siguiendo las condiciones de Klampfl y colaboradores (Klampfl et al. 2013). Para ello se realizó una amplificación, posterior purificación y secuenciamiento de los productos de PCR. Los Cromatogramas obtenidos fueron analizados mediante el programa Chromas Pro y las secuencias fueron alineadas con la secuencia de referencia reportada en el GenBank mediante el programa Clustal Omega.

La detección de las mutaciones MPL W515L y MPL W515K se realizarán utilizando el kit comercial MPL W515L/K MutaScreen Kit de ipsogen, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las muestras con mutaciones serán confirmadas mediante secuenciamiento directo utilizando los primers MPL-F: TGGGCCGAAGTCTGACCCTTT, MPL-R:ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGT reportados anteriormente, utilizando las condiciones del autor Furtado et al, 2013. (19)



