



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

1 8 0 3

**FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES *JAK2*, *MPL* Y *CALR* EN
LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS *BCR::ABL1*
NEGATIVAS EN PACIENTES PROVENIENTES DE DOS INSTITUCIONES
HOSPITALARIAS DE LA CIUDAD DE MEDELLIN DURANTE EL PERIODO
2020-2021.**

ERIKA YULEZA PINO PALACIOS

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MEDELLIN, COLOMBIA**

2022

Frecuencia de las mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* en las neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas en pacientes provenientes de dos instituciones hospitalarias de la ciudad de Medellín durante el periodo 2020-2021.

ERIKA YULEZA PINO PALACIOS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Microbiología y Bioanálisis

Línea de Investigación: **Patología hemática**

Grupo de Investigación: **Hematopatología Molecular**

Tutora

Paola Andrea Acevedo Toro

Comité tutorial

Kenny Mauricio Gálvez Cárdenas

Angélica María Jiménez Mejía

Universidad de Antioquia

Escuela de Microbiología

Medellín, Colombia

2022

Resumen

Antecedentes: En la clasificación de la OMS del año 2016, el subgrupo de neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) *BCR::ABL1* negativas está constituido por 3 entidades: policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), las cuales se caracterizan por presentar mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* con un valor diagnóstico y pronóstico importante.

Objetivo: Determinar la frecuencia de las mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* en las neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas y explorar la asociación entre los tipos de neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas, el estado mutacional y los parámetros del hemograma en pacientes provenientes de dos instituciones hospitalarias de la ciudad de Medellín durante el periodo 2020-2021. **Métodos:** Estudio observacional descriptivo transversal, donde se incluyeron pacientes con diagnóstico de NMPC *BCR::ABL1* negativa. Se evaluaron los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* mediante secuenciación de próxima generación utilizando el panel TruSight One de illumina®. Se realizó un análisis descriptivo a través de la estimación de frecuencias relativas y absolutas o medidas de resumen (tendencia central, dispersión o posición) según la naturaleza de las variables. **Resultados:** Un total de 24 pacientes fueron incluidos en el estudio, el 37,5% de los casos correspondieron a pacientes con TE. La distribución de acuerdo con el estado mutacional fue: No mutados o triple negativos 13 casos (54,2%) y mutados 11 casos (45,8%). Las mutaciones patogénicas encontradas en orden de frecuencia fueron *JAK2* 82%, *MPL* 9% y *CALR* 9%. **Conclusión:** Nuestro estudio es consistente con lo reportado en la literatura mundial, siendo *JAK2* V617F la mutación más frecuentemente encontrada en NMPC *BCR::ABL1* negativa. Las frecuencias menores para *CALR* y *MPL* pueden estar influenciadas por el tamaño de la muestra.

Abstract

Background: Under the 2016 WHO classification, the subgroup of *BCR::ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) is made up of 3 entities: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF), which are characterized by present mutations in the *JAK2*, *MPL* and *CALR* genes with an important diagnostic and prognostic value. **Objective:** To determine the frequency of mutations in the *JAK2*, *MPL*, and *CALR* genes in *BCR::ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms and to explore the association between *BCR::ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasm types, mutational status, and blood count parameters in patients from two hospital institutions in the city of Medellin during the 2020-2021 period. **Methods:** Cross-sectional descriptive observational study, which included patients with a diagnosis of MPNs *BCR::ABL1* negative. *JAK2*, *MPL*, and *CALR* genes were evaluated by next generation sequencing using the illumina® TruSight One panel. A descriptive analysis was performed by estimating relative and absolute frequencies or summary measures (central tendency, dispersion or position) depending on the nature of the variables. **Results:** A total of 24 patients were included in the study, 37.5% of the cases corresponded to patients with ET. The distribution according to mutational status was: Non-mutated or triple negative 13 cases (54.2%) and mutated 11 cases (45.8%). The pathogenic mutations found in order of frequency were *JAK2* 82%, *MPL* 9% and *CALR* 9%. **Conclusion:** Our study is consistent with that reported in the world literature, with *JAK2* V617F being the most frequently found mutation in MPNs *BCR::ABL1* negative. The lower frequencies for *CALR* and *MPL* may be influenced by the sample size.

Planteamiento del problema y justificación.

Las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas (NMPC) son trastornos clonales de las células madres hematopoyéticas, caracterizados por la proliferación excesiva, expansión y acúmulo de una o más de las líneas mieloides en médula ósea, con efectiva maduración hematopoyética e incremento en el número de granulocitos, eritrocitos y/o plaquetas en la sangre periférica. (1-2). Con el descubrimiento del gen de fusión *BCR::ABL1* o cromosoma filadelfia t(9;22) estas entidades se subdividieron en dos grupos principalmente: *BCR::ABL1* positiva que comprende la leucemia mieloide crónica (LMC) y *BCR::ABL1* negativa que incluye 3 tipos de enfermedades, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP) (3-4).

Las NMPC *BCR::ABL1* negativa ocurren generalmente en adultos de edad media o avanzada con una mediana de 65 años para PV, 68 años para TE y 70 años para MFP (5). Las características clínicas incluyen síntomas inespecíficos, como diaforesis, dolores óseos y prurito (1). La esplenomegalia y la hepatomegalia son características comunes en este tipo de enfermedades, debido al secuestro de las células sanguíneas o proliferación de células hematopoyéticas anormales (3) y las complicaciones más frecuentes son la trombosis y la hemorragia (1,3). Los pacientes con PV y TE tienen posibilidad de evolucionar hacia mielofibrosis, mientras que las tres entidades pueden transformarse en leucemia mieloide aguda (LMA) y en casos muy raros en síndrome mielodisplásicos (SMD) (6). A nivel mundial la incidencia varía entre 0.47-1.03 por cada 100.000 habitantes (7-8). En Colombia se desconoce esta información, los datos más actualizados corresponden a los reportes del anuario estadístico del Instituto Nacional de Cancerología (INC), que para el año 2019 reportaron un total de 789 casos nuevos de tumores de los tejidos hematopoyético y linfóide, en donde sólo 7 casos correspondieron a estas entidades (seis casos de TE y uno de PV) (9).

Hasta el año 2006, el diagnóstico de estas neoplasias se centró principalmente en signos clínicos y características morfológicas e inmunofenotípicas en sangre

periférica y en medula ósea; gracias al advenimiento de la biología molecular, en los últimos años, ha sido posible la identificación de diferentes marcadores genéticos de gran utilidad para determinar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Estas mutaciones se conocen como conductoras “drivers”, porque están directamente implicadas en el desarrollo del fenotipo mieloproliferativo; además se utilizan como criterios diagnósticos mayores de acuerdo a la clasificación actual establecida por la organización mundial de la salud (OMS) en el año 2016. Las principales mutaciones que han sido reportadas, se encuentran en los genes: Janus quinasa 2 (*JAK2*), calreticulina (*CALR*) y el receptor de la trombopoyetina, también conocido como proteína de leucemia mieloproliferativa o CD110 (*MPL*), con rango de presentación y variabilidad importante. *Wu et al.* (2014), encontraron una frecuencia de *JAK2* (V617F) entre el 56-82%, *CALR* 25-32% y *MPL* 5-6% (10), por su parte, *Labastida et al.* (2015), encontraron las mismas mutaciones con una frecuencia similar del 62%, 25% y 7% respectivamente (2). La frecuencia alta de estas mutaciones ha puesto en evidencia que su detección debería constituir una práctica fundamental en los laboratorios clínicos para el diagnóstico de estas entidades.

En nuestro país se han realizado algunos estudios que han descrito, en cierta forma, la frecuencia de dichas mutaciones. Por ejemplo, *Solano et al.* (2012) y *Abello et al.* (2017) encontraron que la frecuencia mutacional para *JAK2* V617F fue del 0% y 53.5% respectivamente (6, 11). A la fecha del desarrollo de esta investigación no se encontraron artículos publicados en donde se investigará la presencia de las otras mutaciones. La escasez de estudios en nuestro medio y la limitación marcada en la detección de potenciales mutaciones, que tienen valor clínico en la era actual, plantea varias preguntas que se deberían resolver: ¿Cuál es el perfil mutacional para aquellos pacientes que son negativos para *JAK2* V617F?, ¿Cuál es la proporción de pacientes triple negativos en nuestro medio?. Los argumentos anteriores reflejan la importancia de estudiar estas mutaciones con el propósito de realizar un perfilamiento más completo de estas entidades, esto permitirá explorar

asociaciones clínicas con el fin de evitar o disminuir la presentación de las complicaciones y así instaurar conductas terapéuticas adecuadas.

Introducción

En la clasificación de la OMS del año 2016, se incluye el subgrupo de neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativa, el cual está constituido por policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria (12). La policitemia vera se caracteriza por mutaciones de ganancia de función en el gen del receptor de eritropoyetina, llevando a proliferación de esta línea celular con cantidad mínima o nula de eritropoyetina (EPO) (13). Se reconocen dos fases de PV: una fase policitémica, asociada con un nivel elevado de hemoglobina, hematocrito y aumento de la masa de glóbulos rojos, y una fase gastada o mielofibrosis pospolicitémica (mielofibrosis post-PV), en la que las citopenias, incluida la anemia, se asocian con hematopoyesis ineficaz, fibrosis de la médula ósea, hematopoyesis extramedular e hiperesplenismo (3). La trombocitemia esencial se manifiesta con una trombocitosis sostenida (recuento de plaquetas $>450 \times 10^9/L$) en sangre periférica, aumento del número de megacariocitos en la médula ósea (hiperplasia megacariocítica) y clínicamente, por la aparición de trombosis y/o hemorragia (3). Por último, la mielofibrosis primaria se caracteriza por una producción descontrolada de megacariocitos y granulocitos anormales en medula ósea, asociada con la presencia de fibrosis por fibras de reticulina y/o colágeno y hematopoyesis extramedular, cursa con 2 etapas: MFP-prefibrótica y MFP-fibrótica, esta última se caracteriza clínicamente por leucoeritroblastosis en la sangre, hepatomegalia y esplenomegalia (3, 13). Este tipo de neoplasias clásicamente se han considerado como cánceres raros ya que la incidencia global de las 3 entidades es de aproximadamente 6 personas por cada 100.000 habitantes/año (13).

El análisis genético y molecular de las NMPC *BCR::ABL1* negativa ha sido de gran importancia en los últimos años, dado que evidenció la heterogeneidad en las bases genéticas de estas entidades. La primera alteración directamente relacionada con

estas neoplasias fue la mutación V617F en el gen *JAK2*, que tiene un efecto directo en la activación de la vía del JAK-STAT (la cual regula diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis); esta mutación se detecta en 95% de pacientes con PV, 60% con TE y 65% con MFP (14).

A partir del descubrimiento de *JAK2* V617F en el año 2005, varios estudios estuvieron dirigidos en la búsqueda de otros genes responsables del desarrollo de NMPC *BCR::ABL1* negativa en pacientes *JAK2* negativos; fue así como en el año 2006 se encontró que una mutación somática en el receptor de trombopoyetina (*MPL*) también era responsable del inicio de TE y MFP en un 4-5% de los casos (13). Por su parte, en el año 2013, dos estudios simultáneos de *Klampfl et al.* y *Nangalia et al.* quienes por medio de secuenciación total del exoma y secuenciación dirigida de genes en un grupo de pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas negativos para *JAK2* y *MPL*; reportaron una alta frecuencia de mutaciones en el gen de calreticulina (*CALR*) de aproximadamente 20-25% en pacientes con TE y 25-30% con MFP respectivamente (15-16). Dada la relación directa que existe entre las mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* con el desarrollo de NMPC *BCR::ABL1* negativa, estos genes, se han considerado como los principales marcadores moleculares para el diagnóstico de estas entidades. Por lo anterior, se hace importante el conocimiento y aplicación de diferentes técnicas moleculares que permitan la detección de estos marcadores, así como la estimación de su frecuencia en la población de pacientes con NMPC *BCR::ABL1* negativas en nuestro país.

Aspectos estructurales y moleculares de *JAK2*

La patogénesis y las bases genéticas de las NMPC *BCR::ABL1* negativas, se empezaron a conocer sólo a partir del año 2005 cuando se descubrió que mutaciones en el gen *JAK2* eran responsables de la aparición de PV, TE y MFP en un alto porcentaje de pacientes. Este gen se encuentra codificado en el cromosoma

9 posición 9p24.1 y está formado por un total de 25 exones, el cual codifica para una proteína de tipo tirosina quinasa, que cumple su función en diferentes vías de señalización intracelular de receptores de citoquinas y factores de crecimiento, especialmente en la vía de la eritropoyetina (17).

La sustitución del aminoácido valina por fenilalanina en el codón 617 de la proteína es generada por una mutación somática en el nucleótido 1849 del gen en la cual hay un cambio de G a T, esta mutación se denomina como V617F y es la más frecuente de las alteraciones del gen *JAK2*. Afecta el dominio pseudoquinasa JH2 autoinhibidor de la proteína *JAK2*, lo que lleva a la activación constitutiva de la vía de señalización JAK/STAT en ausencia de ligandos (18). La mutación *JAK2* V617F es muy específica para las NMPC *BCR::ABL1* negativa, sin embargo, se puede encontrar en otras neoplasias hematológicas, pero su ocurrencia es poco frecuente, así mismo, puede estar presente en menos del 1% de la población normal (17,19).

En el pequeño porcentaje de pacientes con PV que son negativos para la mutación *JAK2* V617F, se ha descrito la presencia de diferentes tipos de inserciones y deleciones en el exón 12, por ejemplo: La mutación K539L (que lleva al reemplazo de la lisina en la posición 539 con una leucina), la mutación N542-E543del (que causa la eliminación de la asparagina en la posición 542 y el ácido glutámico en la posición 543), la mutación F537-K539delinsL (que conduce a la sustitución de fenilalanina en la posición 537 a través de lisina en la posición 539 por una sola leucina), o la mutación H538QK539L (que provoca una sustitución de glutamina por histidina en la posición 538 y leucina por lisina en la posición 539), estas mutaciones se relacionan directamente con la aparición de la enfermedad, debido a que inducen una proliferación independiente de citoquinas en líneas celulares que expresan el receptor EPO (13, 17, 20).

Es importante destacar que en *JAK2*, es frecuente la transición de la mutación *JAK2* V617F desde la heterocigosidad a la homocigosidad debido a la recombinación mitótica del cromosoma 9; por lo tanto la carga alélica o proporción entre el alelo

mutado y el total influye fuertemente en las características clínicas de la enfermedad, explicando por qué una misma mutación puede asociarse con diferentes características fenotípicas; es así que una carga alélica menor se ha asociado con mejor pronóstico mientras que mayor porcentaje del gen mutado implica una mayor frecuencia de trombosis y evolución a mielofibrosis en pacientes con PV y TE (19, 21)

Aspectos estructurales y moleculares de *CALR*

El gen que codifica la calreticulina se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 19, región 19p13.13, tiene una longitud de 5881 pb y está formado por 9 exones, el ARN mensajero transcrito a partir del gen tiene una longitud de 1254 pares de bases y traduce una proteína de 417KDa (22).

La calreticulina es una proteína chaperona altamente conservada que reside principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y está involucrada en una variedad de procesos celulares, entre ellos: la adhesión celular, control de calidad del plegamiento de proteínas y la homeostasis del calcio. La calreticulina también se encuentra en el núcleo, lo que sugiere que puede tener un papel en la regulación de la transcripción (15-16). Otras funciones reportadas para calreticulina son la apoptosis y muerte celular inmunogénica.

Estructural y funcionalmente, la proteína calreticulina está formada por 3 dominios principales: dominio N terminal, dominio P central y dominio C. Adicional existe una cuarta región en el extremo C terminal denominada KDEL, ésta es formada por una pequeña secuencia de aminoácidos de lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y leucina; KDEL constituye un dominio de retención en el RE para *CALR* el cual permite que después de su procesamiento en el aparato de Golgi, la proteína sea devuelta al RE y no sea transportada fuera del citoplasma; en todas las proteínas *CALR* mutadas, se encuentra ausente este dominio (23-24)

Actualmente se conocen más de 50 mutaciones para *CALR*, de todas estas, se ha identificado dos variantes principales, que se clasifican como mutación tipo I y II. La mutación tipo I (c.1092_1143del) se genera por una delección de 52 pares de bases flanqueada por 7 pares de bases de secuencia idéntica y la mutación tipo II (c.1154_1155insTTGTC) resulta de una inserción de 5 pares de bases y representa una duplicación inversa de los 5 nucleótidos que preceden la inserción. Estas dos mutaciones se encontraron en frecuencias muy similares en los estudios de *Klampfl* y *Nangalia* con distribuciones de 53,0% y 45% para la mutación tipo I y 31,7% y 41% para la mutación tipo II respectivamente, demostrando de este modo que la mutación tipo I es la de mayor frecuencia (15,16).

Aspectos estructurales y moleculares de *MPL*

El gen *MPL* está localizado en el brazo corto del cromosoma 1, región (1p34.2), codifica para el receptor de la trombopoyetina, está conformado por 12 exones y por un dominio transmembrana de 635 aminoácidos, que a su vez se divide en dos dominios extracelulares y dos intracelulares. En condiciones normales, la trombopoyetina (TPO) actúa como un ligando de unión, ocasionando la dimerización del receptor, con la posterior fosforilación de *JAK2* y la activación de vías corriente abajo como *STAT*, *RAS*, *MAPK* y *PI3K/AKT*, importantes en el control de la proliferación (25).

En el 2002, un grupo japonés describió la mutación W515S en el dominio intracelular del receptor, que ocasionó un crecimiento independiente de factores estimulantes en células Baf3 (26); posteriormente, en el 2004, se reportó en ocho miembros de una familia japonesa con trombocitosis el cambio S505N en el dominio transmembrana (27); y el mismo año se describió el polimorfismo K39N (Baltimore) producto del cambio nucleotídico G1238T en el 7% de individuos afroamericanos, el cual ocasiona una expresión alterada del receptor y se asocia con fenotipo de trombocitosis (28).

En general, la frecuencia de estas mutaciones es de un 4% para TE y 11% para MFP (29); de todas ellas, la de mayor relevancia es la W515L, ubicada en el dominio transmembrana y descrita por primera vez en el año 2006 en un 9% de pacientes con MFP negativos para *JAK2* V617F. Dicha mutación involucra el cambio nucleotídico de G a T en la posición 1544 del exón 10, generando una sustitución de triptófano por leucina en el codón 515 (30). El residuo W515 hace parte del dominio anfipático y cumple una función esencial en el mantenimiento del estado inactivo del receptor en la ausencia de ligando (25), por lo tanto esta mutación, al igual que otras reportadas en este importante dominio (W515K, W515A, W515R, W515G), causan una activación constitutiva de las vías de señalización JAK-STAT, favoreciendo la proliferación clonal y la posterior aparición de trombocitosis, complicaciones tromboticas, niveles altos de EPO sérica y anemia severa; aún no está muy claro su asociación con el desarrollo de esplenomegalia, fibrosis medular y transformación a leucemia aguda (31).

Es de resaltar que además de las mutaciones previamente descritas, en los dos últimos años se identificó un grupo denominado “mutaciones no canónicas” (aquellas presentes por fuera de los exones analizados con fines diagnósticos) en individuos con TE y MFP triple negativos (ausencia de las mutaciones *JAK2* V617F, *CALR*, y *MPL* W515L/K / *MPL* S505N); estas alteraciones son poco frecuentes, y se asocian con cambios en los dominios extracelular (somáticas: S204F/P, E230G, T119I; germinales: V285E, R321W) e intracelular (Y591D somática) en el gen *MPL*; la presencia de algunas de éstas en línea germinal sugiere que, de hecho, ciertos casos diagnosticados inicialmente como TE corresponden realmente a trombocitosis hereditaria (32).

Objetivo General

Determinar la frecuencia de las mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* en las neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas y explorar la asociación entre los tipos de neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas, el estado mutacional y los parámetros del hemograma en pacientes provenientes de dos instituciones hospitalarias de la ciudad de Medellín durante el periodo 2020-2021.

Objetivos específicos

- ✓ Describir las características demográficas y clínicas de la población con neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas.
- ✓ Caracterizar las diferentes mutaciones en *JAK2*, *MPL* y *CALR* por técnica de secuenciación de próxima generación en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas.
- ✓ Explorar la asociación entre los tipos de neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas, el estado mutacional y los parámetros del hemograma en la población de estudio.

Metodología

Se realizó un estudio observacional descriptivo transversal, en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas desde enero de 2020 hasta mayo de 2021, atendidos en dos instituciones hospitalarias (Hospital Pablo Tobón Uribe y Clínica el Rosario) de la ciudad de Medellín.

Captación de pacientes

Realizada por médicos y profesionales con especialidad en el área de hematología que conforman el equipo de investigación. El control de sesgo se realizó a través de la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión:

- **Criterios de inclusión:** En este estudio se incluyeron pacientes voluntarios diagnosticados de acuerdo a los criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud del año 2008 o 2016 con PV, TE o MFP y que se encontraban en cualquier fase clínica de la enfermedad.
- **Criterios de exclusión:** Se excluyeron de este estudio pacientes que además de tener diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas, estuvieran diagnosticados con otro tipo de neoplasia hematológica.

Antes de la toma de sangre, se contó con la aprobación del paciente para su inclusión en el estudio, lo cual consta en la firma del consentimiento informado (Anexo 1). La información sociodemográfica y clínica de los participantes fue consignada en el formato de recolección de datos (Anexo 2).

Muestras y extracción de ADN

Para la detección de las mutaciones en *JAK2*, *MPL* y *CALR*, se extrajo un volumen de 10 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA por cada paciente. Para la extracción del ADN se empleó el kit QIAmp® DNA blood mini kit (Qiagen,

Hilden, Germany) y se siguieron las recomendaciones del fabricante. La pureza y la cantidad de ADN extraído se midieron mediante espectrofotometría. El ADN no empleado se conservará en el biobanco durante un periodo de 24 meses a -20°C.

Detección de mutación *JAK2*, *MPL* y *CALR*

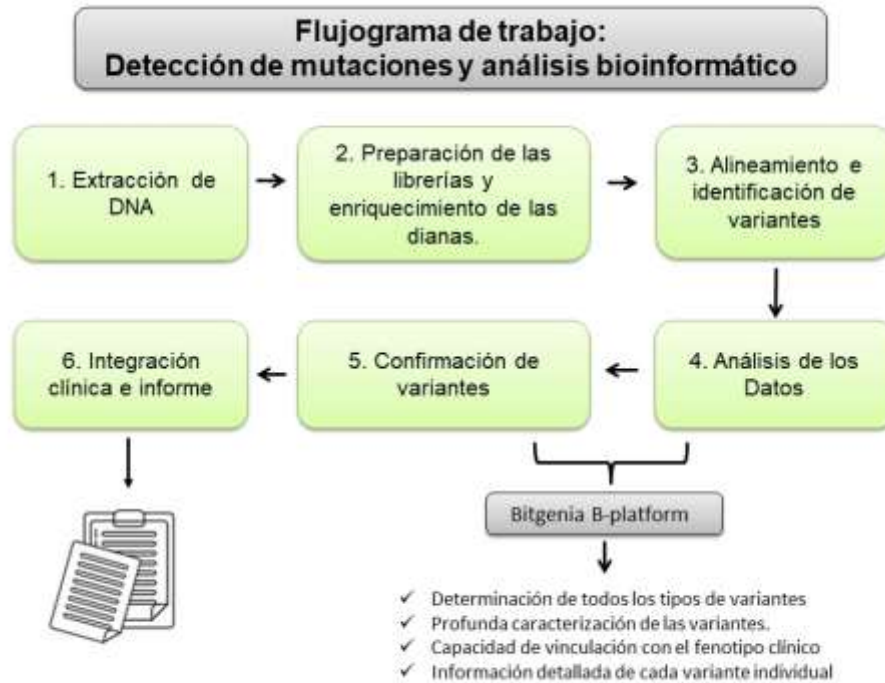
Las mutaciones fueron detectadas a partir de secuenciación de próxima generación (Next Generation Sequencing), empleando el panel TruSight One de illumina®, que cubre 12 Mb de contenido genómico, incluye 4813 genes asociados con fenotipos clínicos específicos, 62000 exones blanco aproximadamente, profundidad de cobertura mínima >20x (el 95% de las regiones objetivo generalmente cubren >20x) y cobertura promedio >100x.

Análisis bioinformático

Fue dirigido específicamente a los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR*. Las lecturas pareadas obtenidas fueron alineadas contra el genoma de referencia de “The Genome Reference Consortium” en su versión 37 (GRCh37), por medio del software Barrow Wheelers Aligner (BWA). El procesamiento de las lecturas alineadas se llevó a cabo según las recomendaciones del Genome Analysis Toolkit (GATK). Primero, se procedió a excluir las duplicaciones de PCR por medio del software PICARD, se detectaron regiones con varias lecturas de baja calidad y se realizó un realineado local con el fin de detectar posibles deleciones o inserciones pequeñas. Luego, se detectó si habían diferencias entre las lecturas obtenidas y el genoma de referencia, en un proceso denominado “llamado de variantes” (del inglés “variant calling”) mediante la herramienta “Haplotype Caller” de GATK. A partir de la información de calidad de las variantes se realizó un filtro para detectar y excluir variantes de baja calidad usando el protocolo “Hard Filtering”, según las recomendaciones detalladas por GATK. Finalmente, se procedió a anotar el VCF (vincular las variantes con datos biológicos) con información externa de bases de datos utilizando el paquete de software SnpEff/SnpSift. Para ello se utilizaron las siguientes fuentes: dbSNP, ExAC, 1000 Genomas para frecuencia poblacional, Clinvar para la relevancia clínica y Polyphen, SIFT y MutationTaster para las predicciones de patogenicidad. El

análisis del archivo de variantes (VCF) se realizó con el software “Bitgenia B-platform”

Bitgenia B-platform: Comprende el procesamiento de los datos crudos (FASTQ), a través del uso de filtros interactivos que permite analizar, priorizar y clasificar las variantes, a fin de la confección de un reporte del caso de estudio.



Plan de análisis

Se realizó un análisis descriptivo a través de la estimación de frecuencias relativas y absolutas o medidas de resumen (tendencia central, dispersión o posición) según la naturaleza de las variables. Se exploró la asociación entre el tipo de condición clínica y los parámetros del hemograma a través de las pruebas H de Kruskal Wallis o Anova de un factor, en el caso de significación estadística, se realizaron análisis de comparaciones múltiples mediante las pruebas HSD de Tukey o U de Mann Whitney con corrección de Bonferroni. La asociación entre el estado mutacional con los parámetros del hemograma y el tipo de NMPC *BCR::ABL1* negativa se exploró a través de las pruebas t Student para muestras independientes, U de Mann

Whitney o Chi cuadrado de Pearson. En los casos en que aplicó, se realizó la verificación previa del cumplimiento de los supuestos de distribución normal y homogeneidad de las varianzas con los estadísticos de Shapiro Wilk y Levene respectivamente.

Todos los análisis se realizaron en el software IBM® SPSS 26 y se tomó un valor P de significación estadística menor a 0,05 como criterio de aceptación o rechazo de

Consideraciones éticas

Según las categorías dictadas en la Resolución 8430 de 1993 establecidas por el Ministerio de la Protección Social, los riesgos para la realización de la investigación son mínimos, no se generaron incapacidades temporales o permanentes a los individuos y en la realización de este estudio no se incurrió en ningún otro tipo de riesgo (psicológico, legal, social, entre otros). El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética de la Sede Investigación Universitaria -SIU- (acta 19-90-830) y de las diferentes instituciones hospitalarias participantes del proyecto (Hospital Pablo Tobón Uribe acta 05/2019 y Clínica el Rosario acta 2019-03-28-02). Todos los sujetos dieron su consentimiento informado y los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a las pautas establecidas en la resolución 2378 de 2008 sobre buenas prácticas clínicas (BCP), con el objetivo de garantizar que los datos y los resultados reportados son verídicos, precisos, y están protegidos los derechos, integridad y confidencialidad de los sujetos del estudio.

Resultados

Se estudiaron un total de 24 pacientes con diagnóstico de neoplasia mieloproliferativa crónica clásica *BCR::ABL1* negativa captados desde febrero del 2020 hasta marzo del 2021. Para la muestra poblacional la media de edad al momento de diagnóstico fue de 55,6 años (DE 18,5) con un rango de 23 a 89 años. El 54,2% de los casos correspondieron al sexo masculino, la patología más frecuente fue TE con el 37,5 % de los casos y el 54,2% de los casos no presentaron ninguna de las mutaciones patogénicas rastreadas por este estudio denominados "triple negativos". Es importante mencionar que en dos pacientes se realizó una reclasificación diagnóstica, incluyéndose finalmente en la categoría de poliglobulia (exceso de glóbulos rojos) (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las características demográficas y clínicas de la población con NMPC *BCR::ABL1* negativas (n=24).

Variables		n	%
Sexo	Masculino	13	54,2
	Femenino	11	45,8
Tipo de NMPC	TE	9	37,5
	PV	8	33,5
	MFP	5	20,8
	Poliglobulia	2	8,3
Estado Mutacional	No mutado	13	54,2
	Mutado	11	45,8

TE: Trombocitemia esencial; PV: Policitemia vera; MFP: Mielofibrosis primaria

Se detectaron un total de 174 variantes en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* (agrupadas en 43 variantes diferentes) de las cuales 3 son consideradas mutaciones patogénicas. Las mutaciones presentes en *JAK2* fueron las más frecuentes con el 53,5% de los casos, seguida de *MPL* y *CALR* con el 32,5% y 14,0% respectivamente. De acuerdo con el tipo de mutación, las clasificadas como intrónicas correspondieron a un 55,8%, seguido de las de cambio de sentido con 16,3%, mientras que las menos frecuentes fueron aquellas clasificadas como sin

sentido y cambio en marco de lectura, ambas con el 2,3% de los casos. El 72,1% de las mutaciones presentaron un genotipo heterocigoto y el 67,4% de las variantes fueron categorizadas como benignas (Tabla 2). En la tabla 3 se describe la distribución absoluta y relativa de las 43 variantes diferentes encontradas de acuerdo al gen, tipo de mutación e interpretación clínica.

Tabla 2. Distribución de las mutaciones de acuerdo al gen, tipo de mutación, genotipo e interpretación clínica (n=43)

Característica	n	%	<i>JAK2</i> n (%)	<i>MPL</i> n (%)	<i>CALR</i> n (%)
			23 (53,5)	14 (32,5)	6 (14,0)
Tipo de mutación					
Función de secuencia	3	7,0	0 (0)	0 (0)	3 (50,0)
Cambio de sentido	7	16,3	2 (8,7)	5 (35,7)	0 (0)
Sin sentido	1	2,3	0 (0)	1 (7,1)	0 (0)
Sinónima	5	11,6	4 (17,5)	0 (0)	1 (16,7)
Cambio en marco de lectura	1	2,3	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)
Región de empalme	2	4,7	0 (0)	2 (14,3)	0 (0)
Intrónica	24	55,8	17 (73,9)	6 (42,9)	1 (16,7)
Genotipo					
Heterocigoto	31	72,1	13 (56,5)	12 (85,7)	6 (100)
Homocigoto	2	4,7	2 (8,7)	0 (0)	0 (0)
Heterocigoto/Homocigoto	10	23,3	8 (34,8)	2 (14,3)	0 (0)
Interpretación clínica					
Patogénica	3	7,0	1 (4,3)	1 (7,1)	1 (16,7)
Benigna	29	67,4	19 (82,6)	7 (50,0)	3 (50,0)
De significado incierto	10	23,3	3 (13,0)	6 (42,9)	1 (16,7)
Probablemente Benigna	1	2,3	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)

Tabla 3. Distribución de mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* en pacientes con NMPC *BCR::ABL1* negativas (n=174).

Gen	Mutación	Interpretación Clínica	n	%
JAK2	p.Val617Phe c.1849G>T	Patogénica	9	5,2
	c.1514-88G>A	Benigna	17	9,8
	c.1993-20T>C	De significado incierto	1	0,6
	c.2571+107_2571+108delGA	Benigna	2	1,1
	c.2572-113_2572-109delAAAAA	Benigna	1	0,6
	c.2572-110_2572-109delAA	De significado incierto	1	0,6
	c.2572-112_2572-109delAAAA	Benigna	1	0,6
	c.2886+71G>A	Benigna	6	3,4
	c.3059+23A>T	Benigna	14	8,0
	c.3059+61_3059+63delGTT	Benigna	13	7,5
	c.3060-72A>G	Benigna	8	4,6
	c.3060-8231C>T	Benigna	4	2,3
	c.3060-8262T>C	De significado incierto	1	0,6
	c.3060-8481A>C	Benigna	4	2,3
	c.3060-8482G>A	Benigna	4	2,3
	c.3291+96T>G	Benigna	1	0,6
	c.614+79C>T	Benigna	3	1,7
	c.936+131C>T	Benigna	5	2,9
	p.Arg1063His c.3188G>A	Benigna	1	0,6
	p.Asn643Asn c.1929T>C	Benigna	1	0,6
p.His163His c.489C>T	Benigna	15	8,6	
p.Leu830Leu c.2490G>A	Benigna	19	10,9	
p.Ser428Ser c.1284T>C	Benigna	1	0,6	
MPL	p.Trp515* c.1544G>A	Patogénica	1	0,6
	c.1308+168C>T	Benigna	1	0,6
	c.1309-69G>T	De significado incierto	1	0,6
	c.1468+43G>T	De significado incierto	1	0,6
	c.1469-70T>C	Benigna	12	6,9
	c.1565+5C>T	Benigna	1	0,6
	c.391+47C>T	Benigna	1	0,6
	c.981-41G>A	Benigna	12	6,9
	p.Ala622Asp c.1865C>A	De significado incierto	1	0,6
	p.Asp128Tyr c.382G>T	De significado incierto	1	0,6
	p.Gln208Leu c.623A>T	De significado incierto	1	0,6
	p.Glu230Glu c.690A>G	Benigna	1	0,6
	p.Ser226Tyr c.677C>A	Benigna	1	0,6
	p.Trp515Arg c.1543T>A	De significado incierto	1	0,6
	CALR	p.Leu367fs c.1099_1150delCTTAAGGAGGAGGAAGAAGACAAGA AACGCAAAGAGGAGGAGGAGGCAGAGG	Patogénica	1
c.193+41delC		Benigna	1	0,6
c.193+45G>C		Benigna	1	0,6
c.193+47_193+48insG		Benigna	1	0,6
c.91+45G>T		De significado incierto	1	0,6
p.Pro250Pro c.750C>G		Probablemente benigna	1	0,6

Para la asociación entre el tipo de condición clínica y los parámetros del hemograma, encontramos que los promedios de concentración de hemoglobina y porcentaje de hematocrito evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, quienes padecían policitemia vera, presentaron mayor promedio de hemoglobina y porcentaje de hematocrito comparado con aquellos que padecían MFP (diferencia de medias >6,4 g/dL; $p < 0,01$) y (diferencia de medias >17,99%; $p < 0,01$) respectivamente. (Tabla 4 y Gráfico 1). En relación al recuento de plaquetas, se encontró diferencias significativas entre pacientes con MFP y TE, observándose recuentos más altos en este último grupo ($p = 0,012$) (Tabla 4 y Gráfico 2). El recuento de glóbulos blancos no se encontró asociado al tipo de NMPC *BCR::ABL1* de los pacientes incluidos.

Tabla 4. Parámetros del hemograma versus tipo de NMPC *BCR::ABL1* negativas.

		Hemoglobina (g/dL)		Hematocrito (%)	
		Media	DE	Media	DE
Tipo de NMPC	PV	17,3	1,3	52,0	4,5
	TE	13,6	2,2	41,2	5,5
	MFP	10,8	3,0	34,0	8,7
	Poliglobulia	17,7	0,8	52,3	4,5
Valor p*		<0,001		<0,001	
		Rcto de glóbulos blancos ($10^3/\mu\text{L}$)		Rcto de plaquetas ($10^9/\text{L}$)	
		Mediana	Mínimo-Máximo	Mediana	Mínimo-Máximo
Tipo de NMPC	PV	8,9	6,3- 96,0	379	66 - 795
	TE	8,6	5,1- 104,0	746	322 - 1259
	MFP	21,9	4,6- 169,6	302	80 - 402
	Poliglobulia	9,1	7,3 - 10,8	269	247 - 291
Valor p**		0,843		0,012	

*Anova de 1 factor; ** H de Kruskal Wallis.

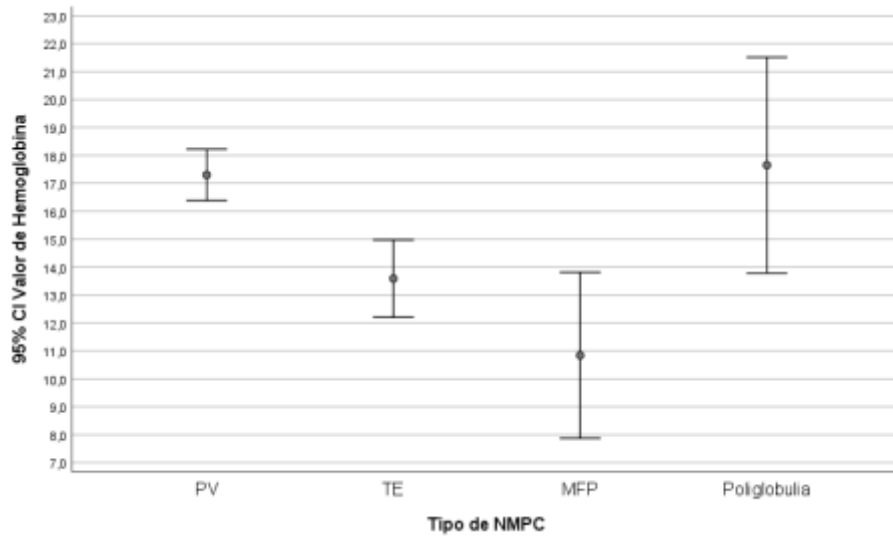


Gráfico 1. Promedio de hemoglobina según tipo de NMPC. Se realizó Anova de 1 factor y comparaciones múltiples con la HSD de Tukey, IC del 95% (para el promedio de hemoglobina según la condición clínica).

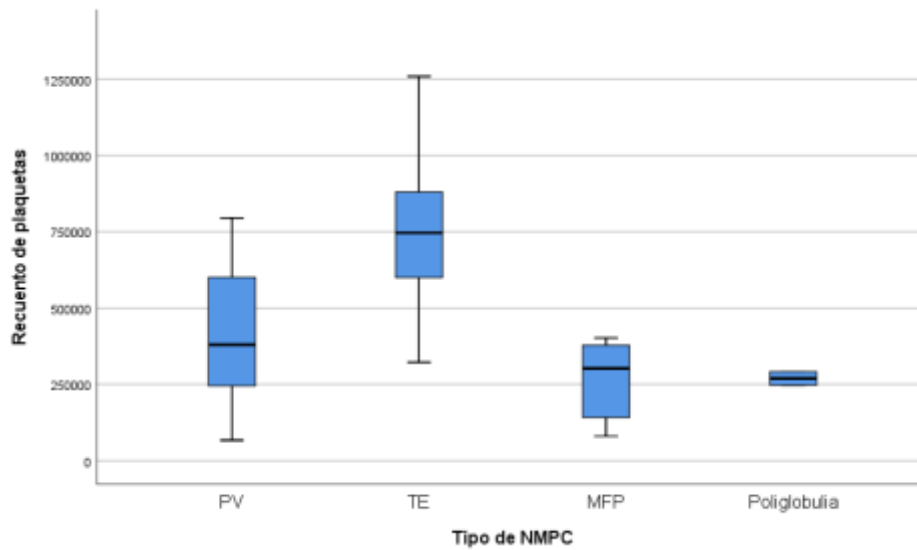


Gráfico 2. Recuentos de plaquetas según tipo de NMPC. Se realizó prueba H de Kruskal Wallis con comparaciones múltiples a través de U de Mann Whitney con corrección de Bonferroni.

La distribución de acuerdo con el estado mutacional fue: No mutados o triple negativos 13 casos (54,2%) y mutados 11 casos (45,8%). Las mutaciones encontradas en orden de frecuencia para los casos mutados fueron: *JAK2* 82%, *MPL* 9% y *CALR* 9%, mientras que para la población de NMPC *BCR::ABL1* negativas fue: *JAK2* 37,5%, *MPL* 4,2% y *CALR* 4,2%. Las mutaciones patogénicas en *JAK2* correspondieron en su totalidad a p.Val617Phe c.1849G>T, que se caracteriza por ser de tipo cambio de sentido o contrasentido, en *CALR* una mutación tipo I (p.Leu367fsc.1099_1150del) y en *MPL* a una mutación sin sentido en el codón 515 (p.Trp515* c.1544G>A). De las características demográficas (sexo) descritas en la población de estudio, no se encontró asociación entre los casos mutados versus no mutados (Vp $\chi^2 = 0,973$), de forma similar, tampoco se evidenciaron diferencias significativas en los recuentos de plaquetas (Vp t student = 0,073) y glóbulos blancos (Vp U de MannWhitney = 0,173), ni en los valores de hemoglobina y hematocrito (Vp t student > 0,820) (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros del hemograma versus estado mutacional.

	Estado Mutacional	Media	DE	Valor p
Hemoglobina (g/dL)	Mutado	14,6	3,8	0,970*
	No Mutado	14,6	2,8	
Hematocrito (%)	Mutado	44,7	11,2	0,826*
	No Mutado	43,8	7,4	
Rcto de plaquetas (mm3 de sangre)	Mutado	375963,6	226122,8	0,073*
	No Mutado	597076,9	328362,5	
Rcto de Blancos (mm3 de sangre)		Mediana	Min-Max	0,173**
	Mutado	8770	7480 - 169600	
	No Mutado	8600	4600 - 104000	

*t Student; ** U de Mann Whitney

De las mutaciones patogénicas identificadas, se observó una mayor frecuencia de éstas en el grupo de pacientes con PV (45,5%), en personas con MFP la frecuencia fue 36,4%, la menor frecuencia se encontró en el grupo con TE (18,2%) y ninguna mutación patogénica fue identificada en los pacientes que presentaron poliglobulia, las diferencias entre las frecuencias comparadas no fueron estadísticamente significativas (Vp $\chi^2 = 0,073$) (Gráfico 3). Por último, en el Grafico 4 se ilustra la

frecuencia de las mutaciones *JAK2*, *MPL* y *CALR* en pacientes con PV, TE y MFP obtenida mediante secuenciación próxima generación.

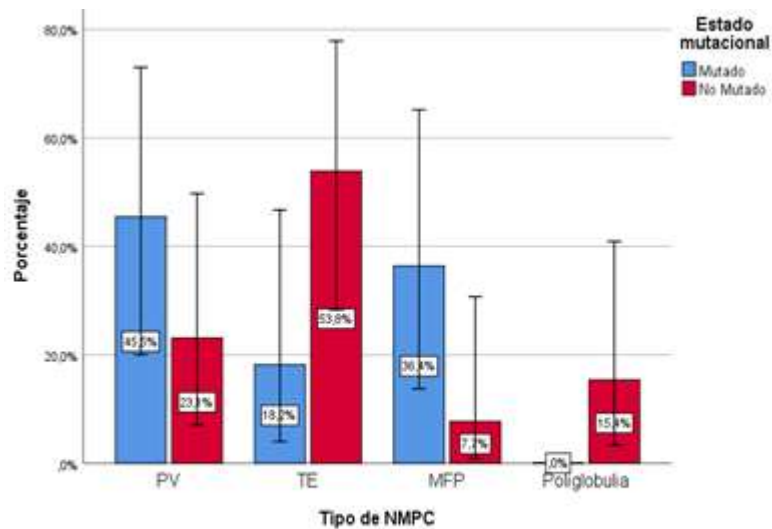


Gráfico 3. Estado mutacional según tipo de NMPC. Mutado: Se refiere a la presencia de alteraciones genómicas patológicas en cualquiera de los 3 genes evaluados.

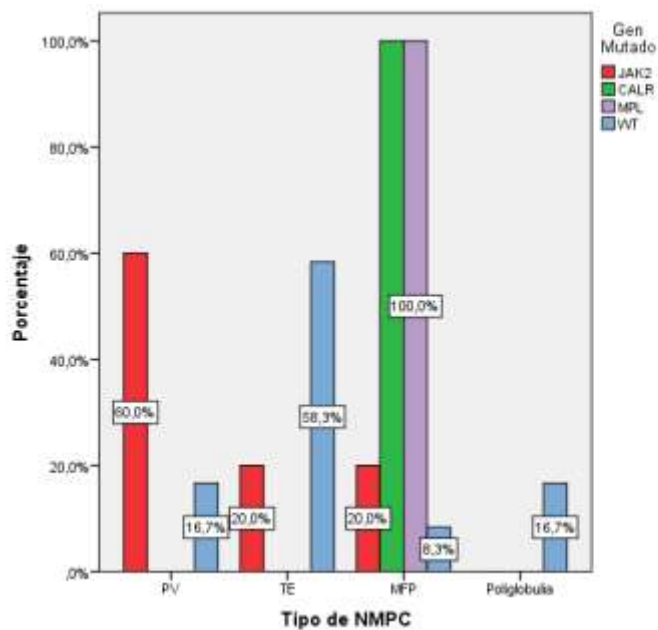


Gráfico 4. Gen Mutado según Tipo de NMPC. El 100% de las mutaciones en los genes *MPL* y *CALR* se presentaron en pacientes con MFP.

Discusión

En Colombia la información reportada acerca de las NMPC *BCR::ABL1* negativas y del comportamiento de las mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* es escasa. En nuestro medio, hasta la realización de este manuscrito, solo se cuentan con 3 estudios publicados, en los cuales se ha realizado únicamente la búsqueda de la mutación V617F en el gen *JAK2* con resultados de frecuencias que oscilan alrededor del 52% (6, 11, 33), mientras que para el caso de las mutaciones en los genes *CALR* y *MPL* no se cuenta con ningún estudio publicado que reflejen la frecuencia de las mismas. Pese a las limitaciones de nuestro estudio, debido principalmente al tamaño muestral (n=24), este trabajo aporta información valiosa acerca del estado mutacional de los pacientes con NMPC *BCR::ABL1* negativas, toda vez que incorpora el análisis completo de los tres genes y por consiguiente de las mutaciones conductoras “drivers”, gracias a la aplicación de la técnica de secuenciación de próxima generación.

Las NMPC *BCR::ABL1* negativas son un grupo heterogéneo de enfermedades con incidencias que varían entre 0.47-1.03/100000 habitantes (7), con una distribución heterogénea alrededor del mundo. En nuestro estudio la TE fue la entidad más frecuente, seguida de PV y MFP, resultados similares fueron reportados por estudios locales (6, 11) y latinoamericanos (2, 34), por el contrario, países como Estados Unidos (35), Jordania (36), han observado una frecuencia mayor de MFP y PV respectivamente, mientras que en China se han reportado frecuencias similares para los casos de PV y TE (10). La distribución de los casos de PV, TE y MFP por sexo, dependerá del tipo de población estudiada, mientras que en nuestra investigación observamos que los casos de PV eran más frecuentes en hombres y de TE en las mujeres, países como Suiza reportan un mayor número de casos de PV en mujeres (37). La media de edad de los pacientes en este estudio y los hallazgos del hemograma, de acuerdo al tipo de NMPC, fueron similares a los publicados por otros investigadores (35, 37-38). Se encontraron niveles de hemoglobina y hematocrito más altos en pacientes con PV comparado con MFP, recuentos de plaquetas elevados en TE comparado con MFP y recuento de glóbulos

blancos sin diferencias estadísticamente significativas en las tres entidades, resultados consistentes a lo reportado por otras investigaciones, (35, 37-38). Es importante mencionar que los hallazgos encontrados anteriormente demuestran que desde la clínica (signos y síntomas, resultados del hemograma, estudio de médula ósea y exámenes complementarios) se ha realizado un adecuado diagnóstico clínico.

El objetivo principal del estudio fue determinar la frecuencia de las mutaciones conductoras “drivers” en las NMPC *BCR::ABL1* negativas. Las mutaciones patogénicas en *JAK2* exón 14, *MPL* exón 10 y *CALR* exón 9 se presentaron de manera excluyente en cada individuo. *JAK2* V617F, fue la mutación más frecuente en 5 casos de PV y 2 casos para TE y MFP, con frecuencias de presentación inferiores a la reportadas por otros países como Marruecos (39) Estados Unidos (35) y Argentina (40), pero mucho más alta comparada con el estudio local realizado en la ciudad de Bogotá (Hospital San José) por *Solano et al.* (2012), en donde incluyeron 34 pacientes con NMPC *BCR::ABL1* negativa, sólo a 8 (cinco con TE, dos con MFP y uno con PV) se les realizó análisis mutacional para *JAK2* V617F, con un 100% de negatividad, resultados que llaman la atención teniendo en cuenta que esta mutación es la más frecuente en estas entidades, ante estos resultados, ellos concluyen que “No es posible analizar la presencia de las mutaciones tirosina-kinasas, ya que son herramientas de reciente ingreso al panel diagnóstico y cuyo impacto como factor pronóstico o terapéutico se encuentra en estudio” (6). Sin embargo, consideramos que estos resultados tal vez pudieron estar influenciados por la pequeña cantidad de pacientes analizados mutacionalmente (8/34) y por el tipo de NMPC elegida para dicho análisis (teniendo en cuenta que la mutación *JAK2* V617F se presenta en el 95% de los pacientes con PV, creemos que el número de pacientes analizados mutacionalmente con PV debió ser mucho mayor. La afirmación anterior la sustentamos teniendo en cuenta los resultados de otro estudio realizado en la misma ciudad y hospital por *Leon et al.* (2019), el estudio incluía 64 pacientes con NMPC *BCR::ABL1* negativa, todos los pacientes fueron analizados mutacionalmente para *JAK2* V617F, encontrando una frecuencia general de

mutación del 52%, siendo los pacientes con PV aquellos que presentaron la positividad más alta con un 75%. Referente al estudio de las otras mutaciones los autores manifiestan “No se realizaron estudios para mutación del exón 12, *CALR* ni *MPL*, en nuestro país existen dificultades en el acceso a la realización estandarizada de estudios moleculares confirmatorios de las mutaciones relacionadas que también puede modificar la prevalencia descrita en nuestra cohorte” (33).

La mutación *JAK2* V617F se presenta principalmente en forma heterocigótica, pero también se puede encontrar en un estado homocigoto, especialmente en PV (aproximadamente en un tercio de los pacientes) debido a la recombinación mitótica del cromosoma 9; por lo tanto la carga alélica o proporción entre el alelo mutado y el total influye fuertemente en las características clínicas de la enfermedad (19). En nuestro caso todas las mutaciones detectadas fueron heterocigóticas, lo que confiere un pronóstico más favorable a los pacientes, a diferencia de pacientes con PV y TE homocigóticos para *JAK2* V617F que desarrollan un trastorno mieloproliferativo más sintomático y se asocia con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con TE (41). Además, no se detectaron mutaciones tipo inserción/delección en el exón 12 de *JAK2* para los pacientes PV negativos para *JAK2* V617F, por lo que se asume poseen un genotipo homocigoto normal (2, 4)

Similar a lo ocurrido en *JAK2* V617F la presentación de mutaciones en los genes *CALR* y *MPL* en general, fue mucho menor a la reportada en la literatura (40); los casos se presentaron en pacientes con MFP (con un caso para cada gen). No se hallaron mutaciones en los genes *CALR* y *MPL* para TE, a pesar de ser la entidad más incidente en nuestro medio según reportes del INC (9), incluso fue la neoplasia que obtuvo el porcentaje más alto de casos triple negativos (53,8%). Estos hallazgos pueden estar influenciados por el tamaño muestral y por la reclasificación de estas entidades con alteraciones tipo eritrocitosis y trombocitosis reactiva; en nuestro caso, se reclasificaron dos pacientes con diagnóstico presuntivo previo de PV a poliglobulia, quienes se caracterizan por ser *JAK2* negativo (acorde con nuestros resultados). Otro posible hallazgo relacionado al menor porcentaje de detección de

las mutaciones conductoras “drivers”, puede deberse a que nuestra población posee características diferentes a las otras poblaciones estudiadas, encontramos que la única mutación patogénica detectada en *MPL* consiste en un cambio sin sentido, mientras que otros estudios y la literatura reportan que en este gen la mutación W515L, es la más frecuente, que se caracteriza por ser de tipo cambio de sentido (19, 30, 34), esta situación puede estar influenciada posiblemente por factores ambientales y genéticos, este último derivado de la heterogeneidad poblacional que tenemos en el país debido a la mezcla de diferentes etnias, por consiguiente, realizar nuevos trabajos donde se explore todo el panorama molecular en estos pacientes son necesarios.

Más de la mitad de los pacientes (54,2%) no presentaron ninguna variante patogénica rastreada por este estudio en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR*, estos resultados no descartan el diagnóstico de PV, TE y MFP, debido a que en ausencia de estas mutaciones y en cumplimiento de los otros criterios establecidos por la OMS puede establecerse un diagnóstico de estas entidades. De los 24 pacientes, cinco pacientes (20,8%) presentaron progresión de la enfermedad; uno con TE y uno con PV evolucionaron a MF, dos pacientes con MFP y uno con TE se transformaron a LMA (Dos de ellos fallecieron, uno presentaba mutación en *JAK2* V617F y el otro era triple negativo). Estudios publicados reportan que las causas más frecuentes de muerte son las complicaciones trombóticas, hemorrágicas y la transformación a leucemia (42). De acuerdo con lo anterior, el alto porcentaje de pacientes triple negativos pone en manifiesto el origen poligénico de estas enfermedades, por consiguiente investigaciones futuras podrían encaminarse a la búsqueda de otro tipo de mutaciones, como es el caso de aquellas denominadas cooperadoras y dilucidar si además de desempeñar un papel importante en el proceso de transformación neoplásica y progresión de la enfermedad, están involucradas en el desarrollo del fenotipo mieloproliferativo.

Conclusión

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, este estudio sería el primero en nuestro país en donde se evalúan las 3 mutaciones conductoras “drivers” en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas empleando el método de secuenciación de próxima generación.

Nuestros resultados evidencian que *JAK2 V617F* es la mutación más frecuente en nuestro ciudad tanto para PV, TE y MFP, aunque la frecuencia de presentación es mucho menor a la reportada en la literatura.

No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre los grupos mutados y no mutados versus las variables demográficas y los parámetros del hemograma, este hallazgo podría cambiar con el desarrollo de estudios multicéntricos que permiten la inclusión de un mayor número de pacientes.

Agradecimientos

Hospital Pablo Tobón Uribe y Clínica el Rosario, por contribuir como escenarios para el desarrollo de esta investigación.

Laboratorio Unidad de Investigación Genética Molecular (UNIGEM), por el apoyo para la realización y análisis de las pruebas de secuenciación. También por la oportunidad laboral ofrecida durante 18 meses, tiempo en el cual adquirí conocimientos y experiencia en el área de la biología molecular.

Mónica Mejía Ochoa (Bacterióloga Laboratorio Médico de Referencia), Gonzalo de Jesús Vásquez Palacio (Docente Universidad de Antioquia), por su compromiso en la captación de los pacientes durante la fase inicial del proyecto.

Angélica María Jiménez Mejía (Docente Universidad de Antioquia) por sus aportes en el desarrollo del proyecto y elaboración del manuscrito.

Bibliografía

1. Jiménez SI. Neoplasias mieloproliferativas: De la clínica a la biología molecular. *Acta Médica Colomb.* 2017;42(1):15–7.
2. 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;8(1):16–21.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Leri SAP, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4 edición. 2017. 586 p.
4. Videla YP, Quintana S, Pérez Maturo J, Di Gerónimo V, Martín N, Pagani F. Mutaciones en JAK2, MPL y CALR en neoplasias mieloproliferativas: análisis de disociación de alta resolución. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 2017;51(4):629–36.
5. Srouf SA, Devesa SS, Morton LM, Check DP, Curtis RE, Linet MS, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001–2012. *Br J Haematol.* 2016;174(3):382–96.
6. Solano JC, Casas CP, Abello V, Solano MH. Características clínicas y paraclínicas de las neoplasias mieloproliferativas crónicas cromosoma filadelfia negativas. *Acta Médica Colomb.* 2012;37(2):66–73.
7. Mehta J, Wang H, Iqbal SU, Mesa R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(3):595–600.
8. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rourke M, Mesa R, De Vocht F, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol.* 2014;89(6):581–7.
9. Instituto Nacional de Cancerología (INC). Anuario estadístico 2019. Bogotá, D. C.: INC; 2021. Página web: www.cancer.gov.co
10. Wu Z, Zhang X, Xu X, Chen Y, Hu T, Kang Z, et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol.* 2014;7(1):1–10.
11. Abello V, Quintero G, Espinosa D, Solano MH, Casas CP, Saavedra D, et al. Descripción de las características clínicas de las neoplasias

mieloproliferativas crónicas (NMPC) Description of the clinical characteristics of chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) First report of the colombian registry of MPNs. *Acta Médica Colomb* [Internet]. 2017;42(1):35–41.

12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016;127(20):2391–405. Available from: <http://www.ukm.my/geografia>
13. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):680–92.
14. Ugo V, James C, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Med Sci (Paris)*. 2005;21((6-7)):669–70.
15. 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.
16. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391–405.
17. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: The clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(24):3714–9.
18. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*. 2014;123(22):1–3.
19. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667–79.
20. Oscar V, Johan C, Neomar P, Diana Z, Echenique O, Rico J, et al. Síndromes Mieloproliferativos Crónicos JAK2 Positivo: Revision Narrativa de la Literatura. *iMedPub Journals*. 2020;2:1–8.
21. Heller PG. Biología molecular de las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas : 10 años después del JAK2. *HEMATOLOGÍA*. 2015;19(4):40–4.
22. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochem J*. 1999;344(2):281–92.
23. Sun C, Zhang S, Li J. Calreticulin gene mutations in myeloproliferative

neoplasms without Janus kinase 2 mutations. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(6):1593–8.

24. Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall DE, Hughes CN, Fiocco KA, et al. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*. 1998;141(3):647–62.
25. Saeidi K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;98:375–89.
26. Abe M, Suzuki K, Inagaki O, Sassa S, Shikama H. A novel MPL point mutation resulting in thrombopoietin-independent activation. *Leukemia*. 2002 Aug;16(8):1500–6.
27. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004 May;103(11):4198–200.
28. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug;101(31):11444–7.
29. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(7):1723–35.
30. 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 Jul;3(7):1140–51.
31. Akpınar TS, Hançer VS, Nalçacı M, Diz-Küçükkaya R. MPL W515L/K Mutations in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Turkish J Hematol*. 2013;30(1):8–12.
32. 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.
33. León-Basantes G, Abello-Polo V, Casas-Patarroyo CP, Espinosa-Redondo D, Solano-Trujillo MH. Calidad de vida en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadélfia negativas TT - Quality of life in patients with Philadelphia negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Acta Medica Colomb [Internet]*. 2019;44(2):82–90.

34. Sieza Y, Camilo I Di, Mazziotta L, Archuby ML, Riva ME, Orellano L. Distribución de mutaciones en JAK2, MPL y CALR en pacientes con sospecha de neoplasias mieloproliferativas crónicas Phi negativas provenientes de hospitales públicos de la provincia de Buenos Aires. *Rev Hematol* [Internet]. 2018;22(2):151–6.
35. Song J, Hussaini M, Zhang H, Shao H, Qin D, Zhang X, et al. Comparison of the Mutational Profiles of Primary Myelofibrosis, Polycythemia Vera, and Essential Thrombocytosis. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(5):444–52.
36. Jaradat SA, Khasawneh R, Kamal N, Matalka I, Al-Bishtawi M, Al-Sweedan S, et al. Analysis of JAK2V617F mutation in Jordanian patients with myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* [Internet]. 2015;8(4):160–6.
37. 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.
38. Soliman EA, El-Ghlban S, El-Aziz SA, Abdelaleem A, Shamaa S, Abdel-Ghaffar H. JAK2, CALR, and MPL Mutations in Egyptian Patients With Classic Philadelphia-negative Myeloproliferative Neoplasms. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2020;20(10):e645–51.
39. Benmoussa A, Dehbi H, Fehri S, Quessar A, Nadifi S. JAK2-V617F mutation in Moroccan patients with myeloproliferative disorders: Contribution, diagnosis and therapeutic prospects. *Pathol Biol*. 2011;59(4):2009–12.
40. Ojeda MJ, Bragós IM, Calvo KL, Williams GM, Carbonell MM, Pratti AF. CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology* [Internet]. 2018;23(4):208–11.
41. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* [Internet]. 2007;110(3):840–6.
42. Speletas M, Katodritou E, Daiou C, Mandalab E, Papadakis E, Kioumi A, et al. Correlations of JAK2–V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res*. 2007;31(10):1053–1062.