

ARTÍCULO ORIGINAL

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

Frequency of mutations in the *JAK2*, *MPL*, and *CALR* genes in *BCR::ABL1*-negative chronic myeloproliferative neoplasms in patients from two hospitals in the city of Medellín, Colombia, during 2020-2021

Erika Pino¹, Paola Acevedo¹, Kenny Gálvez², Beatriz Aristizábal³

Fecha de sometimiento: 28/02/2022, fecha de aceptación: 23/05/2022

Disponible en internet: 30/12/2022

<https://doi.org/10.35509/01239015.861>

Abstract

Background: In the 2016 WHO classification, the subgroup of *BCR::ABL1* negative chronic myeloproliferative neoplasms (MPNs) is made up of three entities: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF), which are characterized by mutations in the *JAK2*, *MPL*, and *CALR* genes with important diagnostic and prognostic value.

Objective: To determine the frequency of mutations in the *JAK2*, *MPL*, and *CALR* genes in *BCR::ABL1* negative chronic MPNs and to explore the association between the type of *BCR::ABL1* negative chronic MPNs, mutational status, and blood count parameters in patients from two hospitals in the city of Medellín, Colombia, during 2020-2021.

Methods: Cross-sectional descriptive observational study, which included patients with a diagnosis of *BCR::ABL1*-negative MPNs. *JAK2*, *MPL*, and *CALR* genes were assessed by massive 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 in 13 cases (54.2%) and mutated in 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 what has been reported in the world literature, with *JAK2* V617F being the most frequent mutation in *BCR::ABL1*-negative MPNs. Lower frequencies for *CALR* and *MPL* may be influenced by the sample size.

Keywords: myeloproliferative disorders, *BCR-ABL1*, *JAK2*, *MPL*, *CALR*

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.

¹ Grupo Hematopatología Molecular, Universidad De Antioquia, Medellín, Colombia

² Servicio de Hematología y Trasplante de Médula Ósea, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

³ Laboratorio Unidad de Investigación Genética Molecular (UNIGEM), Medellín, Colombia

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 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 masiva 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.

Palabras clave: trastornos mieloproliferativos, *BCR::ABL1*, *JAK2*, *MPL*, *CALR*

Introducción

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) son trastornos clonales de las células madres hematopoyéticas, caracterizadas 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 mielodisplásico (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 linfoide, 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 médula 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 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.

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 tipo 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.

Metodología

Se realizó un estudio observacional descriptivo transversal, en pacientes con NMPC *BCR::ABL1* negativa desde enero de 2020 hasta mayo de 2021, atendidos en dos instituciones hospitalarias de la ciudad de Medellín (Hospital Pablo Tobón Uribe y Clínica el Rosario). 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- y de las diferentes instituciones hospitalarias participantes del proyecto. 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).

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.

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

Las mutaciones fueron detectadas a partir de secuenciación masiva, empleando el panel TruSight One de illumina®, que cubre 12 Mb de contenido genómico, incluye 4813 genes asociados con fenotipos clínicos específicos, 62 000 exones blancos aproximadamente, profundidad de cobertura mínima >20x (el 95% de las regiones objetivo generalmente cubren >20x) y cobertura promedio >100x.

Análisis bioinformático:

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 había 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”.

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 la hipótesis nula.

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, 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 estos pacientes 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

Se detectaron un total de 174 variantes (agrupadas en 43 variantes diferentes), de las cuales 3 son consideradas mutaciones patogénicas. Las mutaciones presentes en *JAK2* fueron las más frecuentes con los 53,5% de los casos, seguidas 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 unos 55,8%, seguidas por 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	%	JAK2	MPL	CALR
			23 (53,5)	14 (32,5)	6 (14,0)
			n (%)	n (%)	n (%)
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 (17,4)	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,)	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_2572-109delAAA	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

Gen	Mutación	Interpretación Clínica	n	%
JAK2	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_1150delCTTAAGGAGGAGGAAGAA-GACAAGAAACGCAAAGAGGAGGAGGAGGCAGAGG	Patogénica	1	0,6
	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 Figura 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 Figura 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

Tipo de NMPC	Hemoglobina (g/dL)		Hematocrito (%)	
	Media	DE	Media	DE
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	

Tipo de NMPC	Recuento de glóbulos blancos (103/ μ L)		Recuento de plaquetas (109/L)	
	Mediana	Mínimo-Máximo	Mediana	Mínimo-Máximo
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	

PV: Policitemia Vera; TE: Trombocitemia Esencial; MFP: Mielofibrosis Primaria
 *Anova de 1 factor; ** H de Kruskal Wallis.

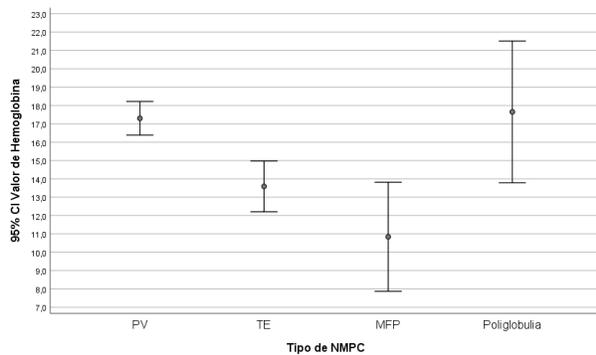


Figura 1. Promedio de hemoglobina según tipo de NMPC. Se realizó Anova de 1 factor y comparaciones múltiples con la HSD de Tukey, IC del 95% (para el promedio de hemoglobina según la condición clínica)

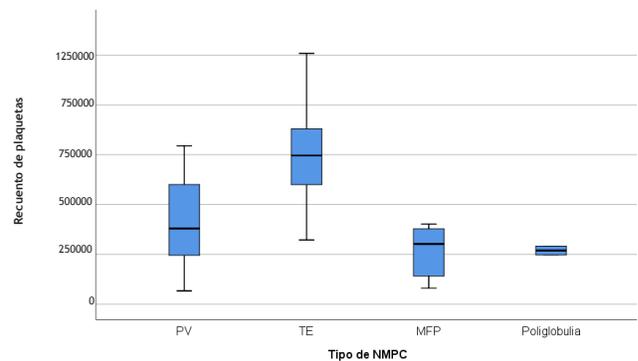


Figura 2. Recuentos de plaquetas según tipo de NMPC. Se realizó prueba H de Kruskal Wallis con comparaciones múltiples a través de U de Mann Whitney con corrección de Bonferroni

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 en el gen *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_1150) y en *MPL* a una mutación sin sentido en el codón 515 (p.Trp515* c.1544G>A). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el estado mutacional y los parámetros del hemograma (Tabla 5). Entre 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 (mm ³ de sangre)	Mutado	375963,6	226122,8	0,073*
	No Mutado	597076,9	328362,5	
		Mediana	Min-Max	
Recuento de Blancos (mm ³ de sangre)	Mutado	8770	7480 - 169600	0,173**
	No Mutado	8600	4600 - 104000	

*t Student; ** U de Mann Whitney

De las mutaciones patológicas identificadas, se observó una mayor frecuencia de estas 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 patológica fue identificada en los pacientes

que presentaron poliglobulia. Las diferencias entre las frecuencias comparadas no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,073$) (Figura 3). Por último, en la Figura 4 ilustramos la frecuencia de las mutaciones *JAK2*, *MPL* y *CALR* en pacientes con PV, TE y MFP por técnica de secuenciación masiva.

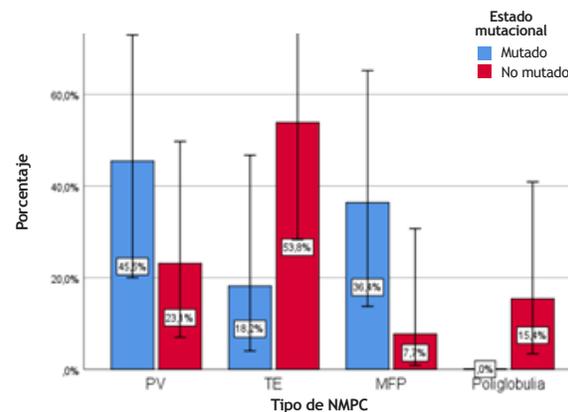


Figura 3. Estado mutacional según tipo de NMPC. Mutado: Se refiere a la presencia de alteraciones genómicas patológicas en cualquiera de los 3 genes evaluados

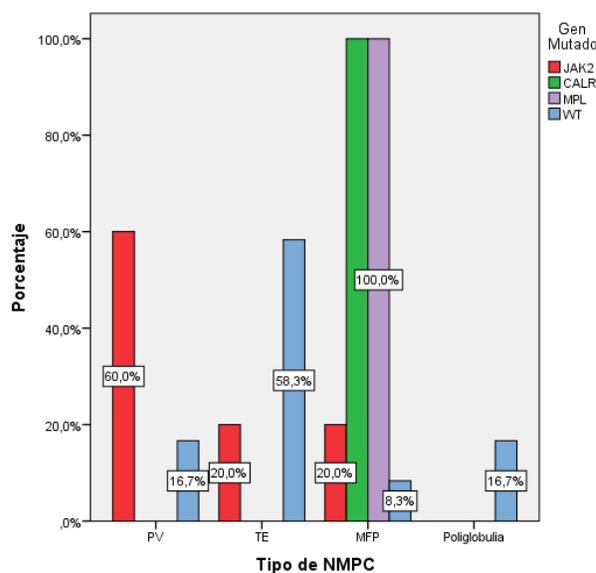


Figura 4. Gen Mutado según Tipo de NMPC. El 100% de las mutaciones en los genes *MPL* y *CALR* se presentaron en pacientes con MFP

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 fecha y hasta la redacción de este manuscrito, solo se cuenta 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, 11-12), mientras que para el caso de las mutaciones en los genes *CALR* y *MPL* no se cuenta con ningún estudio publicado que refleje la frecuencia de las mismas. Pese a las limitaciones de nuestro estudio, debido principalmente al tamaño muestral, 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 masiva.

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 (2,13). Por el contrario, países como Estados Unidos (14) y Jordania (15), 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 nuestro estudio observamos un ligero predominio de PV en hombres y de TE en las mujeres, países como Suiza reportan un mayor número de casos de PV en mujeres (16). 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 (14,16-17). 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, (14,16-17).

Es importante mencionar que los hallazgos encontrados anteriormente demuestran que desde la clínica (signos y síntomas, resultados del hemograma y 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 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 en igualdad para TE y MFP, con frecuencias de presentación por debajo a las reportadas por otros países como Marruecos (18), Estados Unidos (14) y Argentina (19), pero mucho más alta comparada con el estudio local realizado en la ciudad de Bogotá 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 pudieran 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 León 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” (12).

Similarmente 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 (19); 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 Instituto Nacional de Cancerología (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, y se caracteriza por ser de tipo cambio de sentido (13, 20-22). 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 (23). 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 con la revisión bibliográfica realizada, este estudio sería el primero en nuestro país en donde se evalúan las 3 mutaciones conductoras en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR::ABL1* negativas empleando el método de secuenciación masiva. Nuestros resultados evidencian que *JAK2* V617F es la mutación más frecuente en nuestro ciudad tanto para PV, TE y MFP. 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 permitan 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.

Fondo de Becas de Maestría de la Universidad de Antioquia, por la financiación de los derechos de matrícula para los semestres 2, 3 y 4.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés relacionado con este trabajo.

Referencias

1. Jiménez SI. Neoplasias mieloproliferativas: De la clínica a la biología molecular. *Acta Médica Colomb.* 2017;42(1):15-7. Disponible en: https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=50120-24482017000100015
2. Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, Guzman-Olvera V, Reyes-Núñez 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. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.12.002>
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. Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2017>
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. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53554497009>
5. Srour 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. <https://doi.org/10.1111/bjh.14061>
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. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=163124275004>
7. Mehta J, Wang H, Iqbal SU, Mesa R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(3):595-600. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.813500>
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. <https://doi.org/10.1002/ajh.23690>
9. Instituto Nacional de Cancerología (INC). Anuario estadístico 2019. Bogotá, D. C.: INC; 2021. Disponible en: <https://www.cancer.gov.co/conozca-sobre-cancer-1/publicaciones/anuario-estadistico-2019>
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. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0048-6>
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). Primer informe del registro colombiano de NMPC. *Acta Médica Colomb.* 2017;42(1):35-41. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-886337>
12. León-Basantés G, Abello-Polo V, Casas-Patarroyo CP, Espinosa-Redondo D, Solano-Trujillo MH. Calidad de vida en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas. *Acta Médica Colomb.* 2019;44(2):82-90. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=163162170005>
13. 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.* 2018;22(2):151-6. Disponible en: <https://revistahematologia.com.ar/index.php/Revista/article/view/20>
14. 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. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw222>.
15. 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.* 2015;8(4):160-6. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2015.07.004>
16. 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. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-537167>
17. Soliman EA, El-Ghban 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.* 2020;20(10):e645-51. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2020.05.011>
18. 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. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.06.005>
19. 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.* 2018;23(4):208-11. <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1385891>

20. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667-79. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940>
21. 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*. 2007;110(3):840-6. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064287>
22. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):1140-51. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030270>
23. 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. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.09.005>