

Estudio de mutaciones en neoplasias mieloproliferativas Philadelphia negativas en un hospital público chileno

ISABEL JARAMILLO^{1,a}, VIVIANNE TORRES^{1,2}, LUIS LEYTON^{2,b},
MARITZA NAVARRETE², LILIAN PILLEUX^{1,2}.

Search for mutations in patients with Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms in a public hospital in Chile

Background: Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (Ph-MPN) are clonal disorders whose pathogenesis has been elucidated in recent years, creating diagnostic and prognostic algorithms. **Aim:** To study JAK2, CALR y MPL gene mutations in patients with Ph-MPN. **Materials and Methods:** Descriptive cross-sectional observational study of patients with MPN (2015-2019), reviewing clinical, demographic and laboratory data. JAK2, CALR and MPL gene mutations were analyzed by RT-PCR. **Results:** We studied 72 patients. Fifty percent had essential thrombocythemia (ET), 26.4% had polycythemia vera (PV) and 23.6% had primary myelofibrosis (PM). Bone marrow biopsy was available in 76.5%. At diagnosis, the mean age was 65.5 years and 61% were symptomatic. A thrombotic event was the most frequent problem in 20% and 25% had splenomegaly. There were statistically significant differences in hematological parameters between the different MPNs. JAK2 V617F mutation was detected in 61.1%. Only 19 JAK2 V617F negative patients were available for CALR and MPL mutation studies, identifying 10 triple negative cases. Kaplan Meier curves showed a median survival of 88 months, being similar in the three MPNs. Causes of death in 20 patients were thrombotic complications in 30%, disease progression in 25%, infection in 20%, other neoplasms in 15% and other causes in 10%. **Conclusions:** The presentation and frequency of JAK2 V617F, CALR and MPL mutations in our cohort was similar to those reported in other studies for ET and PM. JAK2 V617F mutation was lower for PV. No significant differences between the three MPNs were observed for overall survival. We could not assess the prognostic value of the mutations.

(Rev Med Chile 2022; 150: 849-854)

Key words: Janus Kinase 2; Mutation; Myeloproliferative Disorders.

Las neoplasias mieloproliferativas Philadelphia negativas (NMP Ph-) son un grupo heterogéneo de trastornos clonales caracterizadas por la sobreproducción de células maduras en sangre periférica, junto con un mayor riesgo de trombosis y progresión a leucemia mieloide aguda¹. En 1951, William Dameshek planteó la hipótesis de que, en lugar de ser proliferaciones “puras”, la policitemia vera

(PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis idiopática/primaria (MI) podían representar diferentes manifestaciones de un solo proceso subyacente². En las últimas 2 décadas, los nuevos descubrimientos moleculares, partiendo por la mutación JAK2 V617F en 2005³⁻⁵, seguido por exón 12 JAK2^{6,7}, exón 10 MPL^{8,9} y exón 9 CALR^{10,11}, permitieron comprender mejor su etiopatogenia y crear nuevos algoritmos

¹Unidad de Hematología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

²Hospital Base Valdivia. Valdivia, Chile.

^aTecnólogo médico.

^bBioquímico.

Financiamiento Proyecto DID 2015-41, Universidad Austral de Chile.

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido el 11 de septiembre de 2020, aceptado el 7 de marzo de 2022.

Correspondencia a:

Isabel Jaramillo

Unidad de Hematología UACH, Bueras 1003, Valdivia, Chile.

mariajaramillo@uach.cl

diagnósticos y pronósticos¹. Además, en este período se estandarizaron los criterios morfológicos para diferenciar las diferentes categorías de neoplasias mieloproliferativas (NMP)¹².

La mutación JAK2 V617 está presente en más del 95% de los pacientes con PV y en 50-60% de aquellos con TE o MI^{3,4,13,14}. Su mecanismo patogénico se puede resumir en una disminución del control autoinhibitorio del dominio JH2 mediado por cambios en la conformación de JH1-JH2 y su unión a ATP¹. Las mutaciones de JAK2 exón 12 localizadas dentro de la región de unión de los dominios SH2 and JH2, entre F533 and F547, se encuentran en 1-2% de los pacientes con PV^{6,15}. Las mutaciones en calreticulina (CALR) se encuentran en 25-35% de los pacientes con TE y 35%-40% de aquellos con MI^{10,11}. La presencia de mutaciones de MPL es menos frecuente, describiéndose en 2% de los pacientes con TE y 4% de los con MI^{10,11,16}. Cabe destacar que la presencia de las 3 mutaciones *driver* son mutuamente excluyentes, lo que se debe a una patogenia similar, mediada a través de activación inapropiada de la vía JAK-STAT y explica la eficacia de la inhibición de JAK2 independiente de presencia de su mutación¹⁷⁻¹⁹.

En nuestro país son escasas las publicaciones que describen la prevalencia de dichas mutaciones o datos de supervivencia en NMP, por lo que decidimos revisar la realidad en los pacientes atendidos en nuestro hospital.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio observacional transversal descriptivo de cohorte de pacientes con diagnóstico de NMP atendidos en la Unidad de Hematología del Hospital Base Valdivia (HBV) entre marzo 2015 y julio 2019. Los casos incluidos en el estudio fueron aquellos que tenían clínica y laboratorio concordantes, a partir de los registros de laboratorio de biología molecular con estudio JAK2 y de farmacia con indicación de hidroxycarbamida. Los pacientes fueron consultados si aceptaban participar y quienes lo hicieron firmaron un consentimiento informado en duplicado en presencia de testigo, aprobado por Comité de Ética de Investigación del Servicio de Salud Valdivia. Luego se revisaron sus fichas clínicas para obtener datos demográficos, clínicos y de laboratorio.

Las mutaciones en genes JAK2, CALR y MPL fueron analizados mediante una técnica *in house* de

PCR en tiempo real con un punto de corte en el ciclo 36, utilizando cebadores previamente publicados por otros investigadores²⁰⁻²², según se muestra en anexo 1. Las muestras de sangre periférica fueron extraídas mediante *kit* comercial (Quick DNA Kits, Zymo Research, Irving, Ca. USA) y, posteriormente, se procedió a amplificar en termociclador en tiempo real (ABI, StepOne™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizando mezcla maestra de genotipado TaqMan, las condiciones de amplificación y concentraciones de cebadores fueron de acuerdo a referencias.

Los datos fueron analizados con programa Graphpad Prism 8.0; en variables cuantitativas se calculó media y desviación estándar, y a las cualitativas, frecuencia absoluta y relativa. Para comparación de parámetros hematológicos se realizó ANOVA y para análisis de sobrevida, curvas de Kaplan Meier.

Resultados

En el período estudiado se encontraron 72 pacientes con NMP. La Tabla 1 expone las principales características demográficas y clínicas de los pacientes estudiados. La media de edad del total al momento del diagnóstico fue $65,5 \pm 12,2$ años, sin diferencias según tipo de NMP. En relación al sexo, hubo un predominio femenino más evidente para TE. La distribución por diagnóstico fue: 36 (50%) TE, 19 (26,4%) PV y 17 (23,6%) MI. El diagnóstico se realizó entre 2002 y 2017, disponiendo de biopsia de médula ósea en 76,5% del total, siendo más frecuente en MI (94,7%). Fueron sintomáticos al diagnóstico 61%, lo cual fue menor en TE. Los síntomas más frecuentes en orden de decreciente fueron: evento trombótico 20%, pérdida de peso 12%, mareos 11%, sangrado 8% y prurito 5,5%. La esplenomegalia fue documentada clínicamente o por imágenes en 25%. Los parámetros hematológicos se muestran en la Tabla 2, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre los 3 tipos de NMP en valores de recuento de eritrocitos, hemoglobinemia, hematocrito y recuento de plaquetas.

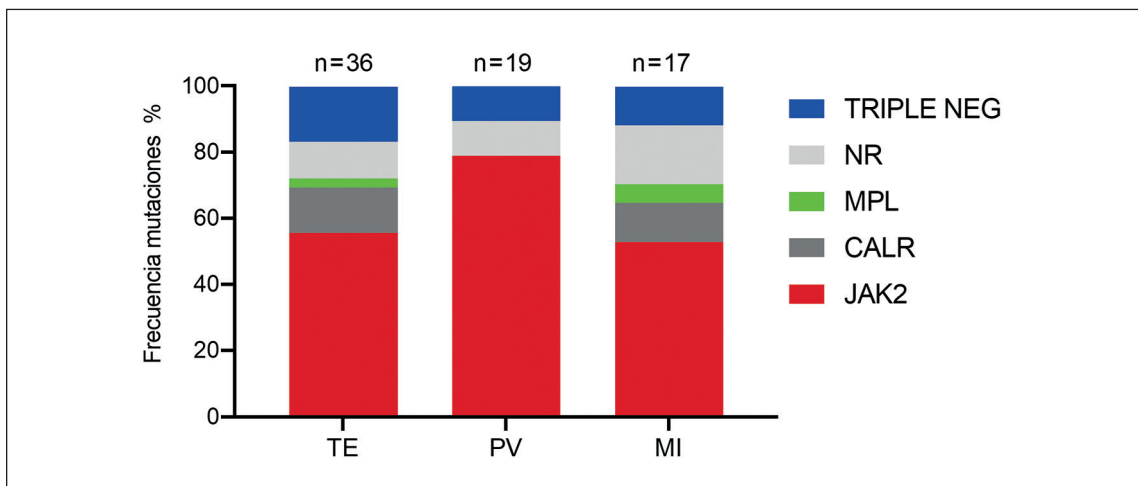
Se dispuso de estudio JAK2 V617F en todos los pacientes, detectándose su presencia en 61.1% del total, 55,5% TE, 79% PV y 56% MI. En los casos JAK2 negativos ($n = 28$) se determinó CALR Y MPL en 19 casos y en 9 no se obtuvo muestra. Los casos triple negativos fueron 6, 2 y 2 para TE, PV y MI, respectivamente. Los resultados se observan en las Figuras 1 y 2.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con NMP

Características		Total	Trombocitemia esencial	Policitemia vera	Mielofibrosis idiopática
Número pacientes		72	36	19	17
Edad al diagnóstico	Media (DS)	65,4 (12,2)	65,4 (12)	66,3 (12,3)	64,4 (13,1)
Hombres	n (%)	27 (37,5)	11 (31)	8 (42)	8 (47)
Mujeres	n (%)	45 (62,5)	25 (70)	11 (58)	9 (53)
Sintomáticos al diagnóstico	n (%)	44 (61)	20 (55,5)	13 (72,2)	11 (68,7)
Esplenomegalia	n (%)	18 (25)	4 (11)	4 (21)	10 (6)
Biopsia de MO	n (%)	55 (76,5)	29 (80)	10 (52)	16 (94,7)

Tabla 2. Parámetros hematológicos al diagnóstico según tipo de NMP. (* Media (DS))

	Trombocitemia esencial	Policitemia vera	Mielofibrosis idiopática	Total	p
Pacientes (n)	36	19	17	72	
Hemoglobina g/dl*	13,7 (2,7)	19,7 (2)	11,1 (3,7)	14,7 (4,3)	< 0,001
Hematocrito %*	42,4 (8,5)	61,2 (11,7)	34,9 (11)	45,6 (13)	< 0,001
VCM (fl)*	86,8 (14,1)	83,9 (8,4)	87,3 (7,4)	86,1 (11,5)	0,59
Leucocitos x 10 ³ *	13,2 (11,2)	13,7 (7,6)	11 (7,6)	12,8 (9,5)	0,67
RAN x10 ³ *	9,1 (8,7)	10,6 (7,4)	7,8 (5,6)	9,2 (7,7)	0,56
Plaquetas x10 ³ *	1.052,8 (399,3)	426 (182)	562,5 (462)	772,2 (466)	< 0,001

**Figura 1.** Distribución de mutaciones por frecuencia según tipo de NMP. (NR: no realizado).

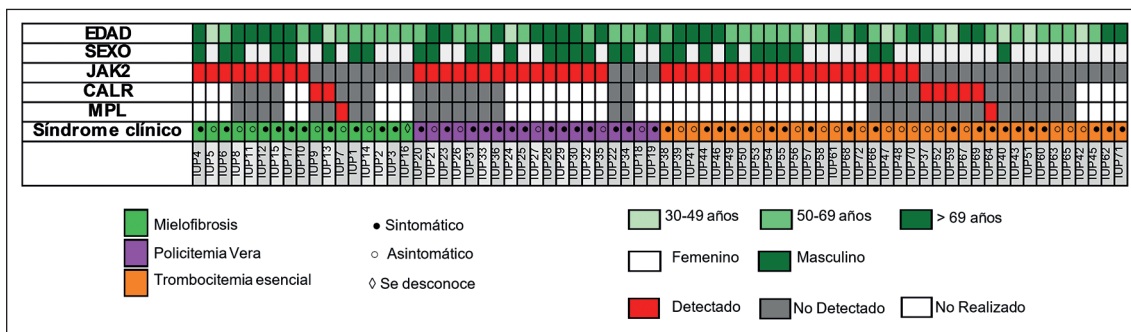


Figura 2. Características clínicas y de mutaciones de pacientes con NMP HBV.

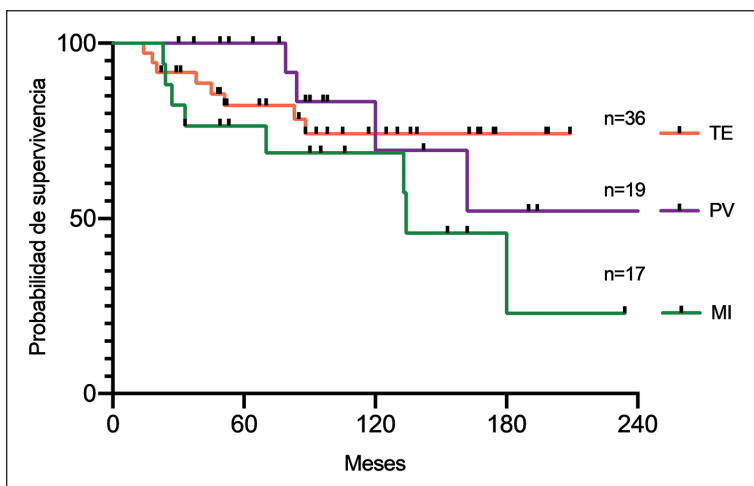


Figura 3. Curvas de Kaplan-Meier según tipo de NMP.

La terapia recibida fue hidroxiurea (96%), aspirina (81%), sangría (19%) y apoyo transfusional (12,5%). Solo 2 casos tuvieron acceso a inhibidores de JAK2, uno de ellos con la mayor sobrevida de la cohorte.

Al realizar curvas de Kaplan Meier se observó una mediana de supervivencia de 88 (14-322) meses para toda la cohorte, siendo similar para los 3 tipos de NMP. En la Figura 3 existe una tendencia luego de 15 años a mayor supervivencia en TE y menor en MI, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,727$). Al analizar la supervivencia por grupo etáreo (30-49, 50-60 y > 69 años) esta fue superior a menor edad, con medianas de 163, 95 y 67 meses, que fueron estadísticamente significativas ($p = 0,0064$). Las causas de muerte fueron ($n = 20$): complicaciones trombóticas (30%), progresión de la enfermedad (25%), infección (20%), otras neoplasias (15%) y otras (10%).

Conclusiones y Discusión

La presentación clínica, hematológica y frecuencia de las mutaciones JAK2 V617F, CALR y MPL observadas en nuestra cohorte corresponden a lo reportado en la literatura para TE y MI, siendo algo menor JAK2 V617F en PV (79%). La técnica realizada en nuestro estudio tenía una sensibilidad de 10^{-5} , lo que nos permite asegurar resultados confiables. Lo mismo ha sido reportado en otra cohorte chilena no publicada (70%) y una mexicana (62,5%), demostrando diferencias de la prevalencia JAK2 V617F en Latinoamérica, que podrían explicarse por etnia o factores ambientales²³. El mayor porcentaje de casos JAK2 V617F negativos en PV se podría atribuir, en parte, a la falta del estudio de la mutación JAK2 exón 12 y, además, es posible que se deba a la presencia de otros genes como TET2, ASXL1, CEBPA, por mencionar algunos relacionados en la vía de señali-

zación de JAK2²⁴. La sobrevida general (SG) tuvo una tendencia a ser superior luego de 14 años de seguimiento en TE, seguido por PV y al final MI, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo que puede deberse a que se trata de un estudio transversal. El valor pronóstico de las mutaciones no fue evaluable por ser una cohorte pequeña y su mayor aporte fue confirmar el diagnóstico de las NMP según criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS)²⁵, haciéndose evidente en nuestro medio la falencia del estudio de mutación de JAK2 exón 12, técnica de mayor costo por requerir secuenciación. Nuestro trabajo, además, permite respaldar el uso del algoritmo de estudio secuencial de mutaciones propuesto por Tefferi²⁶.

Las manifestaciones tromboticas fueron el síntoma de presentación más frecuente (20%) y también la primera causa de muerte (30%). Estudios recientes explican el rol patogénico de los monocitos clonales en la inflamación a nivel del endotelio vascular asociados a hemopatías clonales²⁷, lo cual podría explicar su ocurrencia a pesar de que los pacientes recibían terapia citorreductiva y antiagregante plaquetaria.

Agradecimientos: A nuestras paramédicas Sra. Patricia Contreras y Srta. Luisa Muñoz por su constante apoyo al equipo profesional y atención personalizada a nuestros pacientes.

Referencias

- Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2017; 102 (1): 7-17. doi: 10.3324/haematol.2014.113845
- Dameshek W. Editorial: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951; 6 (4): 372-5. *Blood* 2016; 127 (6): 663. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-686402>
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365: 1054-61. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71142-9.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352 (17): 1779-90. doi:10.1056/NEJMoa051113
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434: 1144-8. doi: 10.1038/nature03546
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007; 356: 459-68. doi: 10.1056/NEJMoa065202
- Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theodorides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008; 111: 1686-9. doi: 10.1182/blood-2007-07-101576
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008; 112: 141-9. doi: 10.1182/blood-2008-01-131664
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Burkhardt D, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica* 2009; 94: 141-4. doi: 10.3324/haematol.13224
- 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: 2379-90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347
- 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: 2391-405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542
- Arber D, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz M, Le Beau, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127 (20): 2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544
- James C, Ugo V, Le Couedic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434 (7039): 1144-8. doi:10.1038/nature03546
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocytosis and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7 (4): 387-97. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.023
- Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda R, Green A, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011; 117 (10): 2813-6. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-316810>
- 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. doi 10.1182/blood2013-11-537167.
17. 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): e123-33. doi:10.1182/blood-2014-02-554634.
 18. Kollmann K, Nangalia J, Warsch W, Quentmeier H, Bench A, Boyd E, et al. MARIMO cells harbor a CALR mutation but are not dependent on JAK2/STAT5 signaling. *Leukemia*. 2015; 29 (2): 494-7. doi: 10.1038/leu.2014.285.
 19. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy R, Gupta V, DiPersio J, et al. The clinical benefit of ruxolitinib across patient subgroups: analysis of a placebo-controlled, Phase III study in patients with myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2013; 161 (4): 508-16. doi: 10.1111/bjh.12274
 20. Jovanovic J, Ivey A, Vannucchi A, Lippert E, Oppliger Leibundgut E, Cassinat B, et al. Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet / MPN & MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* 2013; 27: 2032-9. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.219>.
 21. Zinke M, Nageswaran V, Reinhardt R, Burmeister T. Rapid and sensitive detection of calreticulin type 1 and 2 mutations by real-time quantitative PCR. *Mol Diagn Ther*. 2015; 19 (5): 329-34. doi:10.1007/s40291-015-0162-3
 22. Ruan G-R, Jiang B, Li L-D, Niu J-H, Li J-L, Xie M, et al. MPL W515L/K mutations in 343 Chinese adults with JAK2V617F mutation-negative chronic myeloproliferative disorders detected by a newly developed RQ-PCR based on TaqMan MGB probes. *Hematol. Oncol*. 2010; 28: 33-9. doi:10.1002/hon.899.
 23. 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. doi:10.1016/j.hemonc.2014.12.002.
 24. Loscocco GG, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Impact of Mutational Profile on the Management of Myeloproliferative Neoplasms: A Short Review of the Emerging Data. *Onco Targets Ther*. 2020; 13: 12367-82. doi: 10.2147/OTT.S287944. PMID: 33293830; PMCID: PMC7718985.
 25. Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H. et al (eds). *WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2017.
 26. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management [published correction appears in *Am J Hematol*. 2015; 90 (9): 849]. *Am J Hematol*. 2015; 90 (2): 162-73. doi:10.1002/ajh.23895
 27. Siddhartha J, Natarajan P, Silver A, Gibson C, Bick A, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017; 377: 111-21. doi: 10.1056/nejmoa1701719.

Anexo 1. Tabla de oligos y sondas usadas durante el estudio

Nombre Gen	Nombre Oligo/ sonda	Secuencia 5' - 3'	Marcaje fluorescente	ID acceso NCBI	Coordenadas
JAK2	Fw	CTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA	NA	NG_009904.1	93455
	Rv-WT	GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAC	NA		93526
	Rv-Mut	GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAA	NA		93526
	Snd-JAK2	TGAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTGGTTT	FAM-TAMRA		93456
CALR	Fw CALR-t1	ACAGGACGAGGAGCAGATGA	NA	NM_004343.3	1151
	Rv CALR-t1	GGACATCTTCTCCTCATCTTCT	NA		1276
	Snd-CALR-t1	TGTCCTCCTCATCCTCCTCATCCTCATCT	FAM-QSY		1244
	Fw CALR-t2	GCTTAAGGAGGAGGAAGAAGACAA	NA		1169
	Rv CALR-t2	TGTCCTCATCATCCTCCGACAATT	NA		1229
	Snd-CALR-t2	TCTGCTCCTCCTCCTTTGCGT	FAM-QSY		1205
MPL	Fw-MPL	GCGGTACCTGTAGTGTGCAGG	NA	NG_007525.1	16543
	Rv-MPL	GGTGACCGCTCTGCATCTAGT	NA		16473
	Snd-515wt	ACTGCCACCTCAGCAG	HEX-MGB		16525
	Snd-515K	AAACTGCAACCTCAGCAG	FAM-MGB		16523
	Snd-515L	ACTGCTCCTCAGCAGC	FAM-MGB		16525