

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

Distribution of *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations in patients with suspected Phi negative myeloproliferative neoplasms from Buenos Aires public hospitals

Sieza Y, Di Camilo I, Mazziotta L, Archuby ML, Riva ME, Orellano L.

Laboratorio de Biología Molecular-Genética. Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor María Ludovica de La Plata.

yamilasieza@hotmail.com

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN ORAL EN EL MARCO DEL
XXIII CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA.

Fecha recepción: 11/06/2018
Fecha aprobación: 27/07/2018



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 n° 2: 151-156
Mayo - Agosto 2018

Palabras claves: NMPc,
mutaciones,
JAK2,
CALR,
MPL.

Keywords: cMPN,
mutations,
JAK2,
CALR,
MPL.

Resumen

Introducción. Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) son trastornos clonales de la hematopoyesis caracterizados por la proliferación en la médula ósea de una o más de las líneas mieloides. Las NMP crónicas (NMPc) Phi negativas (BCR-ABL negativas) más relevantes son las “clásicas”, que incluyen la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP). Las mutaciones principales asociadas a las NMPc involucran a los genes *JAK2*, *MPL* y calre-

ticulina (*CALR*). Éstas forman parte de los criterios diagnósticos mayores tanto de PV (*JAK2*) como de TE y MFP (*JAK2*, *MPL* y *CALR*) siendo su detección parte del algoritmo diagnóstico ante la sospecha de NMPc. **Objetivos.** Determinar el porcentaje de confirmación diagnóstica de NMPc mediante la detección de mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR*. Describir la distribución de las mutaciones en el grupo global de NMPc y según las diferentes entidades sospechadas (PV, TE, MFP).

Materiales y métodos. Se analizaron retrospectivamente los resultados obtenidos en pacientes con sospecha de NMPc de 15 hospitales públicos de la provincia de Buenos Aires desde el año 2010 hasta la actualidad. Se utilizó PCR de punto final. Se evaluó el patrón de distribución de mutaciones de *JAK2*, *MPL* y *CALR* en el grupo global y para cada patología. **Resultados.** Se estudiaron 325 pacientes con sospecha de NMPc, 129 pacientes con sospecha de PV, 147 de TE y 49 de MFP. Se detectó la presencia de alguna mutación en 224: *JAK2* V617F en 198, *CALR* en 18 y *MPL* en 8. En el análisis según el diagnóstico presuntivo, se encontró que para PV (129), la mutación *JAK2* V617F se detectó en 96

casos. Para TE (147), *JAK2* V617F fue encontrado en 82 pacientes, *CALR* en 13 y *MPL* en 4. En los 49 pacientes con sospecha MFP, *JAK2* V617F fue detectado en 20, *CALR* en 5 y *MPL* en 4. **Conclusiones.** La detección de las alteraciones moleculares en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* permitió la confirmación diagnóstica en el 68,9% de los pacientes estudiados. La mutación *JAK2* V617F se detectó en 88,4%, la del gen *CALR* en 8% y la del *MPL* en 3,6%. En los pacientes con sospecha de PV la mutación *JAK2* V617F se detectó en 74,4%. Para TE, *JAK2* V617F en 55,8%, *CALR* en 8,8% y *MPL* en 2,7%. En el caso de MFP el *JAK2* V617F fue detectado en 40,8%, *CALR* en 10,2% y *MPL* 8,2%.

Abstract

Introduction: Chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal disorders of hematopoiesis with proliferation of one or more myeloid lines. Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are usually referred to as “classical” (cMPN). Mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR* are the main molecular markers of cMPN and they are part of the diagnostic criteria. **Methods:** Samples from patients with suspected cMPN coming from 15 different hospitals in Provincia de Buenos Aires from 2010 to October 2017, were retrospectively analyzed for mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR* using end point PCR. The distribution pattern of mutations was evaluated for the whole group of cMPN and for each individual entity. **Results:** Samples from 325 patients with suspected cMPN were included, 129 PV, 147 TE and 49 MF. Mutations were detected in 224: *JAK2*

V617F in 198, *CALR* in 18 y *MPL* in 8. Analysis of the distribution pattern of mutations in each entity was performed. Suspected PV (129) were positive for *JAK2*V617F in 96. In ET (147) *JAK2*V617F was positive in 82, *CALR* mutations in 13 and *MPL* mutations in 4. In the case of MF (49), *JAK2*V617F was positive in 20, *CALR* in 5 and *MPL* in 4. **Conclusions:** Analysis of mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR* led to diagnosis in 68,9% of patients. *JAK2* V617F was found in 88,4%, *CALR* and *MPL* mutations were positive in 8 and 3,6% respectively. Patients studied to confirm PV rendered positive results for *JAK2* V617F in 74,4%. Those with probable ET were positive for *JAK2* V617F in 55,8%, whereas *CALR* and *MPL* were mutated in 8,8 and 2,7% respectively. The ones with probable MF were found positive for *JAK2* V617F in 40,8%, with mutations of *CALR* in 10,2% and *MPL* in 8,2%.

Introducción

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) son trastornos clonales de la hematopoyesis caracterizados por la proliferación en la médula ósea de una o más de las líneas mieloides. Desde el punto de vista clínico, las NMP crónicas Phi negativas (BCR-ABL negativas) más relevantes son las llamadas clásicas (NMPc), que incluyen la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP)⁽¹⁾.

Desde un punto de vista molecular, las mutaciones

principales asociadas a las NMPc involucran a los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* (calreticulina).

TE y MFP son similares en su patogénesis, en la que tiene un rol clave el linaje megacariocítico. Las NMPc se originan fundamentalmente por la mutación de genes llamados líderes (*drivers*) de NMP, los cuales activan en forma patológica la vía del *JAK2*. Recientemente se describieron las mutaciones de *CALR* que generan la activación del receptor de trombopoyetina *MPL* y de *JAK2*. Estas mutaciones y otras adicionales involucradas en la epigené-

tica, el empalme y la señalización son responsables de la expansión clonal y cambios fenotípicos capaces de originar la mielofibrosis (MFP) y/o la transformación leucémica.

El gen *JAK2* (9p24) codifica una tirosina quinasa citoplasmática que juega un rol esencial en las vías de señalización de citoquinas y factores de crecimiento. La alteración molecular más común es la mutación V617F en el exón 14. El resultado de la sustitución de guanina por timidina en el nucleótido 1849 del exón 14 produce el cambio de valina por fenilalanina en el codón 617 del dominio pseudoquinasa, lo cual le confiere a la proteína mutante una actividad quinasa constitutiva. La mutación se halla presente en aproximadamente el 95% de los pacientes con PV y en 50 a 60% de aquéllos con TE o MFP⁽²⁾. El gen *JAK2* puede, por otra parte, presentar pequeñas deleciones o inserciones en el exón 12, las cuales están presentes en la mayoría de las PV negativas para la mutación *JAK2* V617F⁽²⁾.

El gen *MPL* (1p34) incluye 12 exones y codifica el receptor de trombopoyetina (TPOR). Entre 5 y 10 % de los pacientes con TE o MPF sin alteraciones del *JAK2* presentan mutaciones en el exón 10 del gen *MPL*. La presencia de alguna de estas alteraciones conduce a la activación del receptor en ausencia de trombopoyetina, generando una activación constitutiva de la vía de señalización JAK-STAT. Se

han reportado 5 mutaciones recurrentes que involucran a dos aminoácidos (W515L, W515K, W515A, W515R y S505N) siendo las más frecuentes W515L y W515K^(2,3).

El gen de la calreticulina (*CALR*) (19p13.2) codifica una chaperona clave para el correcto plegado de proteínas y homeostasis del calcio. Las formas mutadas están presentes en 50 a 75% de los pacientes con TE o MFP negativos para mutaciones de *JAK2* y *MPL*, lo cual posibilita la unión anómala con el receptor MPL en el retículo endoplásmico, con la consecuente activación constitutiva del mismo. Estas mutaciones son inserciones/deleciones en el exón 9. La mayoría (85%) de las mutaciones de *CALR* son las tipo I (1367fs*46) que resulta en una del 52pb y la tipo II (K385fs*47) que genera una ins 5pb⁽²⁾.

Según algunas publicaciones las mutaciones en *JAK2*, *MPL* y *CALR* serían mutuamente excluyentes^(4,5). Sin embargo, su coexistencia ha sido reportada por otros grupos de trabajo⁽⁶⁻⁸⁾.

Es importante destacar que existen estudios que indican que las NMPc *CALR* positivas tendrían un curso clínico más benigno^(4,9).

Las mutaciones anteriormente descritas forman parte de los criterios diagnósticos mayores tanto de PV (*JAK2*) como de TE y MFP (*JAK2*, *MPL* y *CALR*) siendo su detección parte del algoritmo diagnóstico ante la sospecha de NMPc⁽¹⁰⁾.

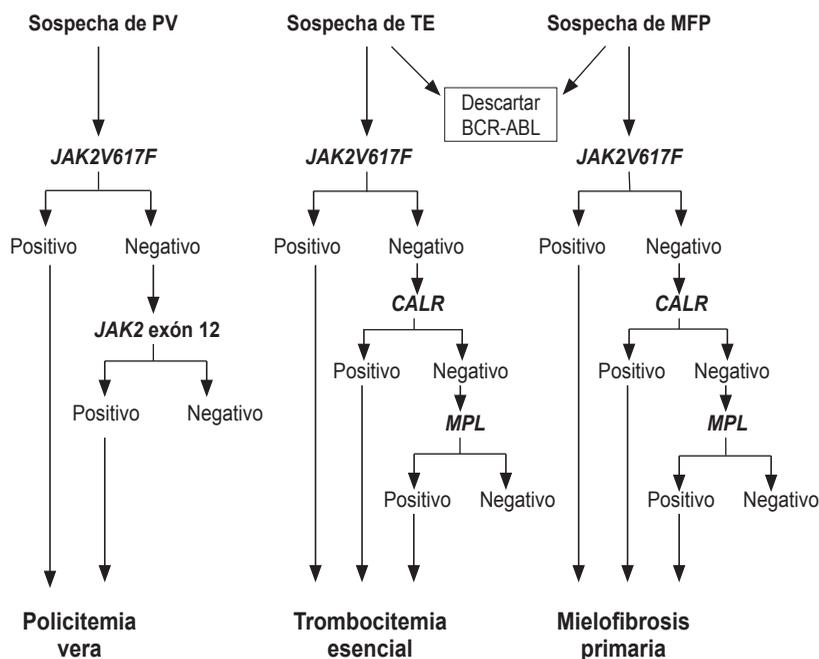


Figura 1. Algoritmo diagnóstico NMPc Phi negativas⁽¹⁰⁾.

En el Laboratorio de Biología Molecular del HIE-AyP Sor María Ludovica en el marco del trabajo cooperativo en conjunto con el HIGA San Martín, ambos de la ciudad de La Plata, desde el año 2009 contamos con la posibilidad del diagnóstico molecular por PCR ARMS para la mutación *JAK2* V617F, habiendo incorporado en 2015 la detección de mutaciones en los genes *MPL* y *CALR*. Esto ha representado un gran logro con repercusión directa en el estudio y manejo de estos pacientes de distintos hospitales públicos de diferentes Regiones Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires.

El laboratorio participa de los controles de calidad organizados por el Grupo Colaborativo de las principales Instituciones que cuentan con Laboratorios de Biología Molecular en el área de hematología de nuestro país.

Objetivos. Determinar el porcentaje de confirmación diagnóstica de NMPc mediante la detección de mutaciones en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR*. Describir la distribución de las mutaciones en el grupo global de NMPc y según las diferentes entidades sospechadas (PV, TE, MFP).

Materiales y métodos

Se analizaron retrospectivamente los resultados obtenidos en pacientes con sospecha de NMPc de 15 hospitales públicos de la provincia de Buenos Aires, desde el año 2010 hasta la actualidad. Se evaluó el patrón de distribución de mutaciones de *JAK2*, *MPL* y *CALR* en el grupo global y para cada patología. Se analizaron muestras de sangre periférica y médula ósea. Se realizó lisis de glóbulos rojos con *buffer* RCLB (*Red Cell Lysis Buffer*) para obtener un sedimento de leucocitos. Se obtuvo ADN genómico de sangre periférica o médula ósea utilizando el Quick-DNA Universal Kit de ZYMO RESEARCH. Se analizaron las mutaciones V617F en el exón 14 del gen *JAK2* mediante una PCR alelo específica (PCR-ARMS)⁽¹¹⁾ (**Figura 2**). Las mutaciones más frecuentes del gen *MPL* S505N, W515L, W515A y W515K en el exón 10 del gen se determinaron mediante una PCR multiplex alelo específica en un formato de 2 reacciones separadas⁽¹²⁾ (**Figura 3**). Las mutaciones del gen *CALR* son inserciones/delecciones en el exón 9 y para su detección se realizó una PCR-*multiplex* utilizando cebadores que permiten detectar las mutaciones tipo I y tipo II⁽¹³⁾ (**Figura 4**).

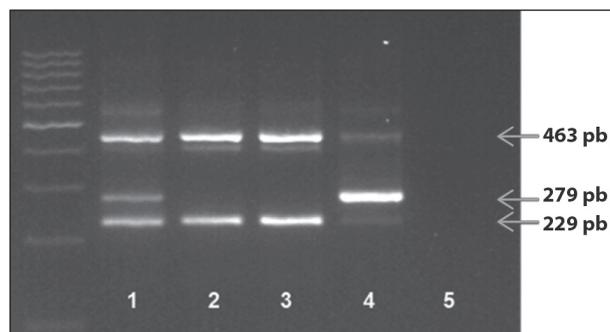


Figura 2. Visualización de los productos de la PCR *JAK2* V617F. En todas las calles se observa la banda control de 463 pb. Calle 1: se observan tanto la banda del alelo normal (*wild-type*) (229 pb) como la de alelo mutado (279 pb). Calle 2: hay una banda de 229 pb correspondiente al alelo normal. Calle 3, 4 y 5 son los controles negativo, positivo y agua de la PCR.

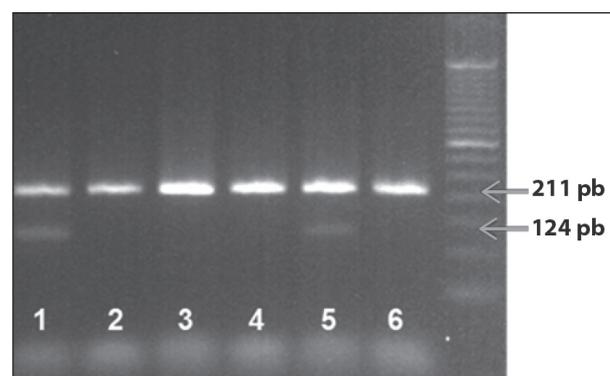


Figura 3. Visualización de los productos de la PCR *MPL*. En todas las calles se observa la banda control de 211 pb. Calle 1: se observa una banda de 124 pb correspondiente a la mutación W515L; calle 2, 3 y 6: no poseen mutación, calles 4 y 5 son los controles negativo y positivo respectivamente, correspondiente a la mutación W515L.

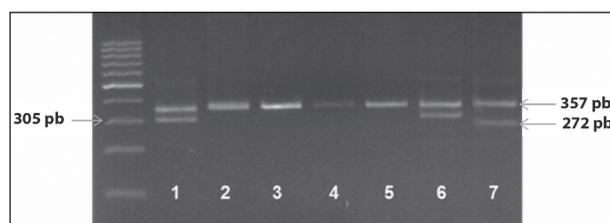


Figura 4. Visualización de los productos de la PCR *CALR*. En todas las calles se observa la banda control de 357 pb. Calle 1: se observa una banda de 305 pb correspondiente a la mutación tipo I; calles 2, 3 y 4 no presentan ninguna de las 2 mutaciones estudiadas; calle 5 control negativo (-), calles 6 y 7 controles positivos tipo I (305 pb) y tipo II (272 pb) de PCR.

Resultados

Se estudiaron 325 pacientes con sospecha de NMPc, con una relación hombre/mujer: 1,23 y un rango de edad de 20 a 95 años. Se evaluaron 129 pacientes con sospecha de PV, 147 de TE y 49 de MFP. Del total de pacientes estudiados, se detectó la presencia de alguna de las alteraciones moleculares en los genes analizados en 224 (68,9%).

De los 224 pacientes con alteraciones moleculares, la mutación *JAK2* V617F se detectó en 198 pacientes (88,4 %), la del gen *CALR* en 18 (8%) y la del *MPL* en 8 (3,6 %). En los 18 pacientes confirmados con mutación en el gen *CALR*, 12 correspondieron a la mutación tipo I (66,7%) y 6 a la tipo II (33,3%). Con respecto al gen *MPL*, la mutación W515L fue la única detectada en nuestra población (**Figura 5**).

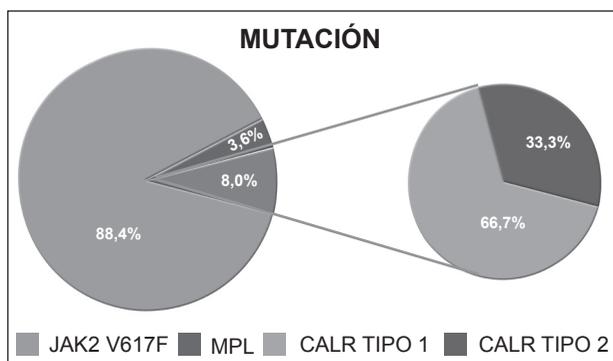


Figura 5. Distribución de alteraciones moleculares detectadas.

Cuando se realizó el análisis de los resultados de los estudios de mutaciones según el diagnóstico presuntivo, se encontró que para PV (129), la mutación *JAK2* V617F se detectó en 96 casos (74,4%). En los pacientes con sospecha de TE (47), *JAK2* V617F fue encontrado en 82 pacientes (55,8%), *CALR* en 13 (8,8%) y *MPL* en 4 (2,7%). No se detectaron las mutaciones estudiadas en 48 pacientes (32,7%) (**Figura 6**).

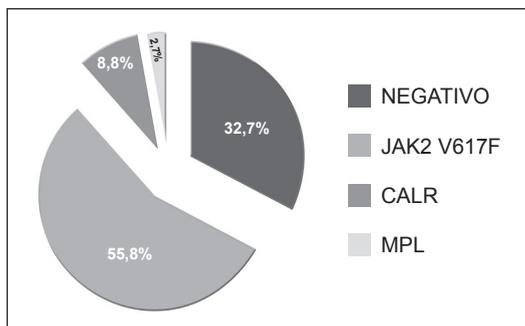


Figura 6. Distribución de alteraciones moleculares en sospecha de TE.

De los 49 pacientes con sospecha clínica de MFP el *JAK2* V617F fue detectado en 20 (40,8%), *CALR* en 5 (10,2%) y *MPL* en 4 (8,2%). No se detectaron alteraciones moleculares en 20 pacientes (40,8%) (**Figura 7**).

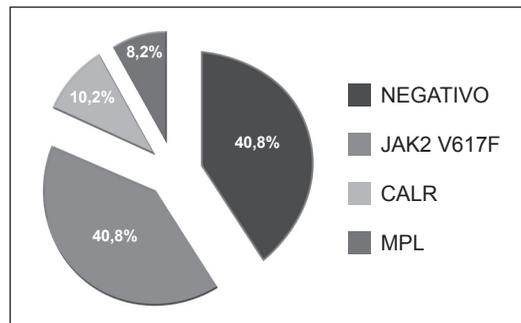


Figura 7. Distribución de las alteraciones moleculares en sospecha de MFP.

Conclusiones

La detección de las alteraciones moleculares en los genes *JAK2*, *MPL* y *CALR* permitió la confirmación diagnóstica en el 68,9% de los pacientes estudiados. La mutación *JAK2* V617F se detectó en 198 pacientes (88,4 %), la del gen *CALR* en 18 (8%) y la del *MPL* en 8 (3,6 %). La mutación W515L en el gen *MPL* fue la única detectada en nuestra población, siendo la más frecuentemente descrita en otras series.

En los pacientes con sospecha de PV la mutación *JAK2* V617F se detectó en 74,4%. Para TE, se detectó *JAK2* V617F en 55,8%, *CALR* en 8,8% y *MPL* en 2,7%. En el caso de sospecha clínica de MFP el *JAK2* V617F fue detectado en 40,8%, *CALR* en 10,2% y *MPL* 8,2%.

Los porcentajes de detección de las mutaciones *JAK2* V617F en pacientes con diagnóstico presuntivo de PV y en el gen *CALR* en aquellos con sospecha de TE y MFP fueron menores a los reportados, resultado esperable si se toma en cuenta que, en nuestro caso se utilizaron como parte del algoritmo diagnóstico y en la literatura los pacientes tenían diagnóstico confirmado de NMPc. Por otra parte, nuestra población podría tener características diferentes a las publicadas en cuanto a la distribución de las mutaciones.

La falta de detección de mutaciones analizadas en el presente estudio no descarta una NMPc, dado que los estudios permiten confirmar clonalidad pero no descartarla. Por otro lado, existen otros genes que pueden influir en la fisiopatogenia de las NMPc.

La relevancia de la disponibilidad en el sector públi-

co de estas pruebas diagnósticas consiste en que la confirmación de la alteración clonal de estas entidades de manera precoz permite la toma de decisiones clínico terapéuticas esenciales para el correcto manejo de las patologías, con impacto pronóstico en un sector de la población habitualmente más vulnerable y con menor acceso a técnicas de alta complejidad y costo.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R y col. The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127 (20): 2391-2405.
- Vainchenker W, Kralovics R. Genetics basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017; 129 (6): 667-679.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM y col. *MPL* mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008; 112:141-149.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS y col. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl. J Med*. 2013; 369 (25): 2379-90.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ y col. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl. J Med*. 2013; 369 (25): 2391-405.
- Tefferi A, Lasho TL, Finke CM y col. *CALR* vs *JAK2* vs *MPL*-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014; 28:1472-1477.
- Fu R, Xuan M, Zhou y col. Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment. *Leukemia*. 2014; 28:1912-1914.
- Lundberg P, Karow A, Nienhold R y col. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014; 123:2220-2228.
- Rumi E, Pietra D, Ferretti V y col. *JAK2* or *CALR* mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014; 123 (10): 1544-51.
- Besses C, Cervantes F. Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas Manual de Recomendaciones GEMFIN Segunda Edición, 2016.
- Qiaofang C, Pin L, Amy VJ y col. Amplification Refractory Mutation System, a Highly Sensitive and Simple Polymerase Chain Reaction Assay, for the Detection of *JAK2* V617F Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders. *JMD*. 2007; Vol. 9, No. 2.
- Larissa VF, Helmut CW, Kojo SJ, Elenitoba-Johnson y Bryan L. Betz. Detection of *MPL* Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy. *JMD*. 2013; Vol. 15, No. 6.
- Ji HJ, Hwan TL, Ja YS y col. Screening PCR Versus Sanger Sequencing: Detection of *CALR* Mutations in Patients With Thrombocytosis. *Ann Lab Med*. 2016; 36:291-299.
- Quiao C, Sun C, Ouyang Y y col. Clinical importance of different calreticulin gene mutation types in wild-type *JAK2* essential thrombocythemia and myelofibrosis patients. *Haematologica*. 2014; 99(10):e182-4.
- Wu Z, Zhang X, Xu X y col. The mutation profile of *JAK2* and *CALR* in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol*. 2014; 7:48.
- Pietra D, Brisci A, Rumi E y col. Deep sequencing reveals double mutations in cis of *MPL* exon 10 in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011; 96 (4):607-11.
- Wojtaszewska M., Iwoła M, Lewandowski K. Frequency and Molecular Characteristics of calreticulin Gene (*CALR*) Mutations in Patients with *JAK2*-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Acta Haematol*. 2015; 133:193-198.
- Tefferi A, Pardanani A. Genetics: *CALR* mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014; 11(3):125-6.
- Xia J, Lu MZ, Jiang YQ y col. *JAK2* V617F, *MPL* W515L and *JAK2* exon 12 mutations in Chinese patients with primary myelofibrosis. *Chin J Cancer Res*. 2012; 24(1):72-6.