

JAK2 exón 12, CALR y MPL: estudio de mutaciones en pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas phi negativas:

Lic. Javier Diego Mas / Depto. Citogenética

Las neoplasias mieloproliferativas phi-negativas (NMP) son un grupo de desórdenes clonales de las células madre hematopoyéticas, caracterizadas por una proliferación anormal de las células mieloides. Carecen del rearrreglo *BCR-ABL1* típico de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), y comprenden a la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis Primaria (MFP).

El diagnóstico de las NMP se realiza siguiendo los criterios propuestos por la revisión de la Organización Mundial de la Salud (WHO) del 2008, entre los cuales cabe destacar la clínica, la morfología de sangre periférica y médula ósea, junto con los estudios moleculares como herramientas complementarias. Los estudios citogenéticos poseen un valor muy importante para definir el pronóstico de las NMP, grupos de riesgo, excluir la presencia del cromosoma fildelfia y descartar procesos reactivos. Sin embargo las alteraciones citogenéticas observadas se hallan en muy bajo porcentaje al momento del diagnóstico, y no son específicas de las NMP.

Mediante el uso de las técnicas de biología molecular, desde el 2005 en adelante, se han descrito más de 20 mutaciones en las NMP. Entre estas, la de mayor frecuencia es la mutación ***JAK2V617F*** en el exón 14 del gen *JAK2*. Su frecuencia estimada es de 97% para la PV, 50-60% para la TE y de un 55-65% para la MFP. Las mutaciones en el exón 12 del gen *JAK2*, aunque de menor frecuencia, pero de gran relevancia, son halladas en pacientes con PV. Tanto la mutación en el exón 14, como las mutaciones en el exón 12, representan el "gold standard" para demostrar clonalidad y uno de los criterios mayores de diagnóstico de las NMP.

Las mutaciones en el gen de la Calreticulina (**CALR**), son las segundas más frecuentes en las NMP. La *CALR* es una proteína con múltiples funciones que van desde el plegamiento de glicoproteínas y la homeostasis del calcio, hasta la proliferación celular y la apoptosis. Las mutaciones en *CALR* activarían la vía de señalización JAK-STAT en ausencia de citocinas, con consecuencias en la proliferación celular.

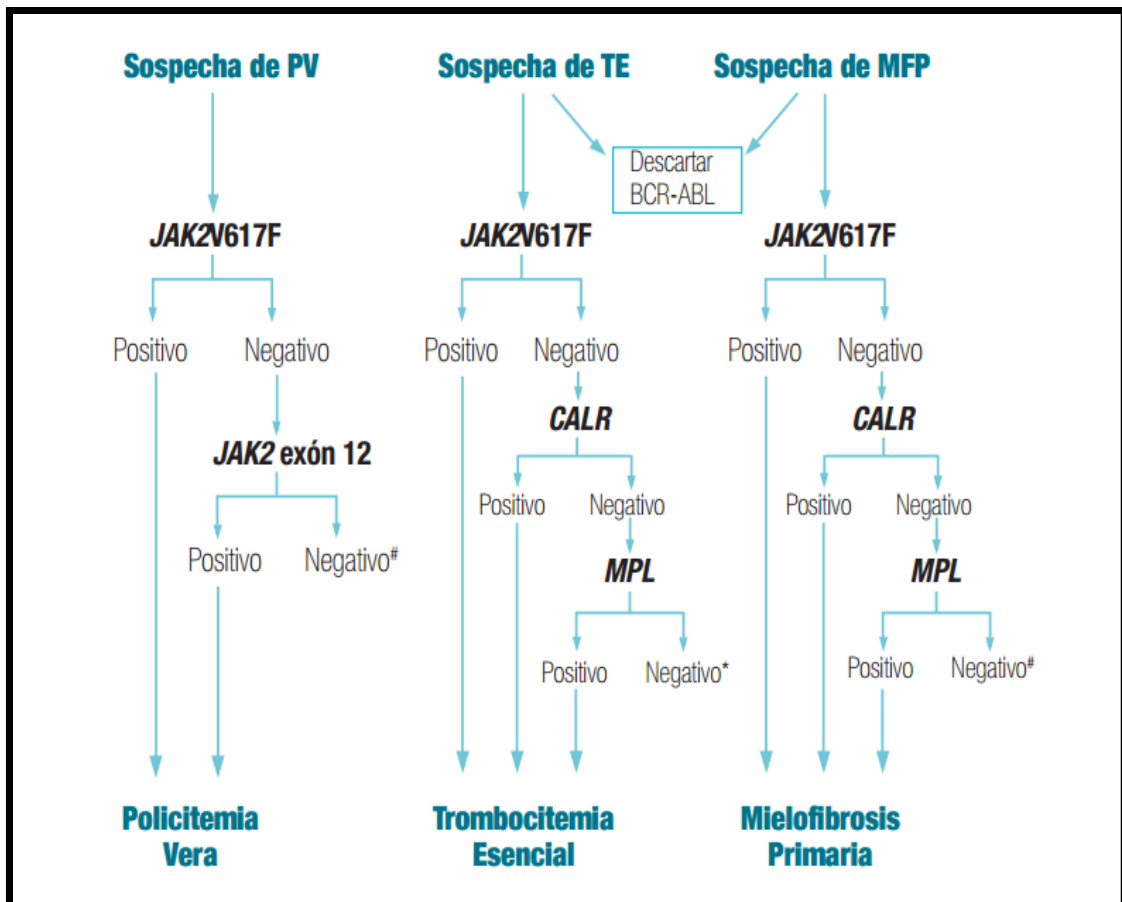
Salvo contadas excepciones, las mutaciones en *CALR* no se observan en la PV, aparentando ser relativamente específicas de la TE y MFP, donde presentan una frecuencia estimada del 20-25%. En este contexto las mutaciones en *CALR* serían de utilidad como marcador de clonalidad. En los últimos años, diversos autores hallaron mutaciones recurrentes en el gen de la *CALR* en la mayoría de los pacientes que carecían de mutaciones en *JAK2* o *MPL*.

Se han descrito más de 50 mutaciones en el exón 9, dos de las cuales representan más del 80% del total. La más frecuente es la de tipo 1 (aprox. 50%) que consiste en una delección de 52 pb, mientras que la de tipo 2 (> 30%) consiste en una inserción de 5 pb.

Otras mutaciones específicas de las NMP, utilizadas como criterio diagnóstico (WHO 2008), son las del gen **MPL**. Éste codifica el receptor de la trombopoyetina, el cual regula la producción de progenitores hematopoyéticos y plaquetas. Las mutaciones del gen *MPL* se hallan en un 3% de los pacientes con TE y en un 7% de los pacientes con MFP. Dichas mutaciones tienen lugar en el exón 10, y conducen a una sustitución de aminoácidos con respecto a la proteína normal (W515L; W515K; W515A; W515R; S505N). La W515L y W515K representan la vasta mayoría de las mutaciones descritas en la literatura, mientras que W515A, W515R y S505N son reportadas menos frecuentemente. Todas estas mutaciones producen una ganancia de función y una activación del receptor en ausencia de trombopoyetina, resultando en una activación de la vía de señalización JAK-STAT.

Por lo tanto, mediante la incorporación de las mutaciones *JAK2* exón 12, *CALR* y *MPL*, a la mutación *JAK2V617F*, es posible estudiar más del 90 por ciento de las mutaciones descritas en las NMP, las cuales además de ser de carácter diagnóstico, tienen un valor pronóstico.

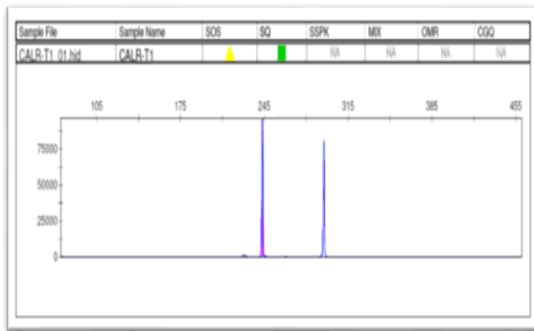
El algoritmo de trabajo propuesto para el estudio de las NMP es el siguiente:



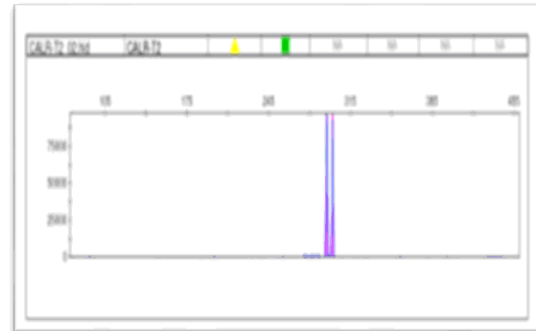
Extraído del “Manual de recomendaciones en Neoplasias Mieloproliferativas crónicas Filadelfia Negativas”. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (2014).

Para el estudio de las mutaciones mas frecuentes de las NMP, el laboratorio cuenta con las siguientes metodologías:

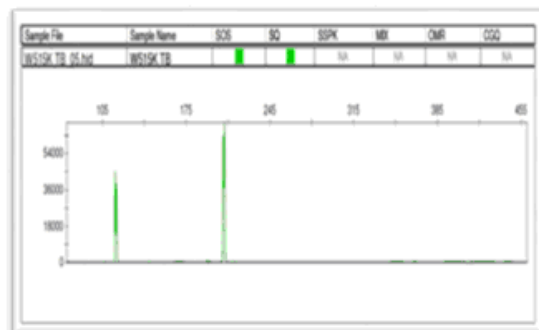
- **JAK2 exón 12:** Secuenciación de Sanger. Permite detectar cargas alélicas de hasta un 20 %.
- **CALR:** PCR y detección por electroforesis capilar. Detecta cargas alélicas de hasta un 5 %.
- **MPL:** PCR y detección por electroforesis capilar. Detecta cargas alélicas de hasta un 2,5 %.



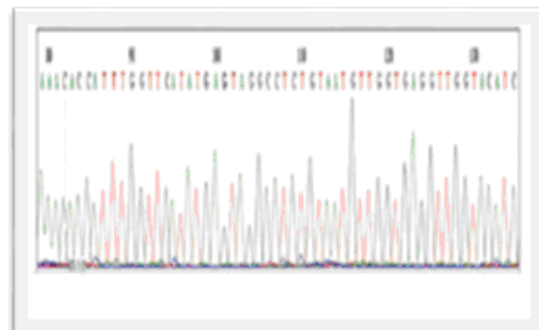
A)



B)



C)



D)

- A) Análisis de fragmentos. Mutación de tipo 1 del gen *CALR*.
 B) Análisis de fragmentos. Mutación de tipo 2 del gen *CALR*.
 C) Análisis de fragmentos. Mutación W515K del gen *MPL*.
 D) Secuenciación del exón 12 del gen *JAK2*.

Práctica	Código	Tipo de muestra	Tiempo de entrega
JAK2 exón 12	6033	2-5 mL sangre /médula ósea c/ EDTA	20 días
CALR-Mutaciones exón 9	6032	2-5 mL sangre /médula ósea c/ EDTA	10 días
MPL- Mutaciones exón 10	6034	2-5 mL sangre /médula ósea c/ EDTA	20 días

Bibliografía

- Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Blood Cancer Journal* 2015; 5.
- Chi J, Nicolaou AK, Nicolaidou V et al. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia* (2014) 28, 1152–1154.
- Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KSJ, Betz BL. Detection of MPL mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2013; 15(6):810-818.
- Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C et al. Laboratory guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2013; 5(6): 733-744.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine* 2013; 369:2379-90.
- Lavi N. Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Rambam Maimonides Medical Journal* 2014; 5(4).
- Musso AM. Significación de las mutaciones en neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas (NMP). *Hematología* 2015; 19(1):54-59.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with non mutated JAK2. *New England Journal of Medicine* 2013; 369:2391-405.
- Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014; 10(123): 1552-55.
- Wenyi L, Zhongxin Y. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Stem Cell Investigation* 2015; 2(16): 1-10.