



Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba  
15 al 19 de mayo de 2023

## **La mutación JAK2 V617F y neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas clásicas en pacientes cubanos.**

Karina Casanueva Calero<sup>1</sup>

Gissel García Menéndez<sup>1</sup>

Nadezhda González García<sup>1</sup>

María Teresa Martínez Echevarría<sup>1</sup>

Milania Díaz López<sup>1</sup>

José Carnot Uria<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", La Habana, Cuba, kcasanv@infomed.sld.cu.

### **RESUMEN**

**Introducción:** La Policitemia Vera, la Trombocitemia Esencial y la Mielofibrosis Primaria son Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia negativas clásicas, las cuales constituyen alteraciones clonales de la célula madre hematopoyética. La mutación JAK2 V617F constituye un marcador genético importante para el diagnóstico de estas tres patologías.

**Objetivo:** Evaluar la frecuencia de la mutación JAK2 V617F y su relación con el diagnóstico y parámetros clínicos específicos en pacientes cubanos con Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia negativas clásicas.

**Material y método:** Se realizó una investigación descriptiva retrospectiva que de 2012 a 2019 incluyó pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia negativas clásicas remitidos del servicio de Hematología del Hospital Hermanos Ameijeiras, en Cuba. La detección de la mutación se realizó mediante PCR alelo-específico cualitativa en el Laboratorio de Genética Molecular de esa institución. Se evaluó la relación entre la mutación y las variables clínicas seleccionadas a través de pruebas estadísticas correspondientes.

**Resultados:** De los 69 casos analizados, 39 (56.5%) resultaron positivos a la mutación. La mutación resultó significativamente más frecuente en los pacientes con Policitemia Vera (34.8%,  $p = 0,005\%$ ), respecto a las otras 2 neoplasias mieloproliferativas crónicas. No encontramos asociación significativa de la mutación respecto a las características clínicas analizadas: complicaciones y transformación, en dichas patologías.

**Conclusión:** Los resultados obtenidos apoyan la utilidad de la detección de la mutación JAK2 V617F en el diagnóstico más preciso de las patologías analizadas en especial, de la Policitemia Vera. Sin embargo, no constituye un marcador genético independiente para la evolución y el pronóstico de estas entidades.

**Palabras clave:** Mutación JAK2 V617F, Neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph negativas clásicas, PCR alelo específica cualitativa.

## INTRODUCCIÓN

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) son trastornos clonales de la célula madre hematopoyética caracterizados por la proliferación en la médula ósea de una o más de las líneas celulares.<sup>(1-6)</sup> Las más notables en la práctica clínica son la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y las NMPC cromosoma Filadelfia (Ph) negativas clásicas, entre las que están incluidas la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis Primaria (MFP).<sup>(1-6)</sup>

La PV es la más común de estas patologías con una incidencia anual a nivel mundial de 0.4-2.8 por cada 100 000 habitantes, la TE ocurre con una incidencia de 0,38 a 1,7 por 100 000 habitantes y la MFP es la más infrecuente con una incidencia de 0,1 a 1 por 100 000 habitantes.<sup>(7,8)</sup> Es preciso mencionar que muchos de los reportes han sido realizados en países desarrollados por lo que la incidencia de las NMPC en países subdesarrollados pudiera estar subestimada.<sup>(8)</sup>

La principal causa de morbilidad en pacientes con NMPC Ph negativas clásicas son las complicaciones trombóticas, seguidas de las hemorrágicas y de la evolución a mielofibrosis o leucemia aguda.<sup>(6,8-11)</sup>

En el 90-95% de los pacientes con PV se ha identificado la mutación adquirida V617F en el gen que codifica a la proteína cinasa Jano 2 (JAK 2, del inglés *Janus Kinase 2*), que también aparece en alrededor del 50% de los pacientes con TE y MP.<sup>(2,5,6,12-15)</sup> En dicha mutación se produce un cambio de guanina (G) por timina (T) en la posición 1849 del exón 14 en el gen JAK2 localizado en el cromosoma 9. Esto se traduce en la sustitución del aminoácido valina por fenilalanina en la posición 617 del dominio pseudocinasa. Este cambio aminoacídico elimina la inhibición que ejerce dicho dominio sobre el dominio JH1 con actividad tirosina cinasa, aumentando la transducción de las señales de los factores de crecimiento, principalmente de la eritropoyetina, con el resultado final de una excesiva proliferación hematopoyética.<sup>(12-16)</sup>

El descubrimiento de la mutación JAK2 V617F en PV, TE y MP ha ocasionado tal impacto que ha pasado a formar parte de los criterios mayores definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a tener en cuenta para dar un diagnóstico certero de las NMPC Ph negativas clásicas.<sup>(3,4)</sup> No obstante, la ausencia de la misma en cualquiera de estas patologías no excluye el diagnóstico. Asimismo, la presencia de esta mutación no permite discriminar entre las distintas NMPC, ni tampoco entre éstas y otras neoplasias mieloides, las cuales con menor frecuencia pueden presentar esta alteración molecular. Es por ello que se hace necesario utilizar otros criterios diagnósticos clínicos, histológicos y moleculares para su adecuada clasificación.<sup>(3-6)</sup>

Desde la descripción de la mutación JAK2 V617F han sido numerosos los grupos de trabajo interesados en estudiar si la presencia de la mutación está asociada a un mayor riesgo de complicaciones y a la evolución clínica de las NMPC Ph negativas. Sin embargo, los resultados son contradictorios. Hasta el momento en nuestro país, no se ha documentado las implicaciones clínicas de la mutación JAK2 V617F en los pacientes con NMPC Ph negativas clásicas estudiadas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos como objetivo evaluar la frecuencia de la mutación JAK2 V617F y su relación con el diagnóstico y parámetros clínicos específicos en pacientes cubanos con NMPC negativas clásicas.

## Método

Estudio descriptivo retrospectivo de serie de casos que de 2012 a 2019 incluyó pacientes con NMPC Ph negativas clásicas remitidos del servicio de Hematología del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”, en Cuba.

Se usaron muestras de ADN obtenidas a partir de 200  $\mu$ L de sangre total en EDTA (4 mL) pertenecientes a pacientes con diagnóstico clínico-morfológico de las siguientes neoplasias mieloproliferativas crónicas: policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria, que fueron remitidos por el servicio de hematología del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”.

La extracción del material genético se realizó usando el estuche comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) siguiendo las normas del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó mediante medición espectrofotométrica de la absorbancia a 260 nm usando un monocromador de microgotas NanoDropOne (ThermoScientific).

La detección de la mutación V617F en el gen JAK2 se realizó en un termociclador programable (MJ Research, Watertown, Estados Unidos) usando el método de PCR alelo específico cualitativo descrito por Baxter y col<sup>(12)</sup> con ligeras modificaciones, que consistieron en el incremento en el número de ciclos de amplificación (de 36 a 40 ciclos) e incremento de la concentración final de los tres oligonucleótidos cebadores (1  $\mu$ mol/L para los dos oligonucleótidos cebadores en sentido y 1.5  $\mu$ mol/L para el oligonucleótido cebador en antisentido). La identificación de los productos de la amplificación se realizó mediante electroforesis submarina en geles de agarosa al 2% a voltaje constante (3 V/ cm) en solución tampón TBE 0.5 X (0.045 M Tris, 0.045 M borato, 1.25 mM EDTA pH 8.2) y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta.

El análisis estadístico se ejecutó empleando el programa estadístico SPSS versión 20. Las variables medidas en escalas cualitativas se resumieron en números absolutos y proporciones, expresadas en porcentajes. Para explorar la asociación entre la presencia de la mutación JAK2 V617F y variables de interés, se aplicó la prueba chi cuadrado de Pearson. Se prefijó el nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 69 pacientes, los cuales cumplieron con los criterios de selección. De ellos, 36 correspondieron al género femenino y 33 al género masculino. Las edades de los pacientes estuvieron comprendidas entre los 35 y 93 años con un promedio de 67. En cuanto al color de la piel, se distribuyeron en 44 blancos y 25 no blancos. Respecto al diagnóstico de estos pacientes, 33 tenían PV, 34 TE y 2 MFP.

El análisis de la frecuencia de la mutación JAK2V617F en las patologías estudiadas mostró una mayor frecuencia en los pacientes con PV ( $n = 24$ , 34.8%), seguida de la TE ( $n = 15$ ; 21.7%), no hubo casos positivos a la mutación en los individuos con la MFP ya que solo se estudiaron 2 casos con dicha patología. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,005$ ) cuando comparamos las frecuencias de la mutación en pacientes con PV, TE y MFP. Como se puede apreciar, esta significación está asociada a la presencia de la mutación en los casos con PV (tabla 1).

**Tabla 1:** Comparación de la frecuencia de la mutación JAK2V617F en pacientes con policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria

Diagnóstico clínico	Frecuencia Num (%)		Total	p
	JAK2V617F	JAK2V617F		
	Positivo	negativo		
Policitemia vera	24 (34.8%)	9 (13%)	33 (47.8%)	
Trombocitemia esencial	15 (21.7%)	19 (27,5%)	34 (49.3 %)	0,005
Mielofibrosis primaria	0	2 (2.9%)	2 (2.9%)	
<b>Total</b>	<b>39 (56.5%)</b>	<b>30 (43.5%)</b>	<b>69 (100%)</b>	

En nuestro trabajo, de los ocho pacientes (11,6 %) que se complicaron con eventos tromboticos, 6 tenían la mutación JAK2V617F, 3 con diagnóstico de PV y 3 con TE. No sufrieron complicaciones 61 individuos, de los cuales 33 presentaron dicha mutación (47,8 % del total n=61) (tabla 2). No se encontró asociación significativa entre la mutación JAK2V617F y las complicaciones ( $p = 0,458$ ), cuando realizamos el análisis con el total de pacientes (tabla 2), ni tampoco cuando realizamos el análisis en los pacientes con PV ( $p = 0,545$ ) y TE ( $p = 0,634$ ).

**Tabla 2:** Distribución del total de pacientes según mutación JAK2V617F y complicaciones.

Mutación JAK2V617F	Complicaciones		Total	P
	Sí	No		
	Num (%)	Num (%)		
Sí	6 (8,7%)	33 (47,8%)	39 (56,5%)	
No	2 (2,9%)	28 (40,6%)	30 (43,5%)	0.458
<b>Total</b>	<b>8 (11,6%)</b>	<b>61 (88,4%)</b>	<b>69 (100,0%)</b>	

En el 7,2 % de los pacientes se constató la transformación clínica a mielofibrosis secundaria o leucemia aguda (tabla 3). De los cinco pacientes que sufrieron transformación, 3 presentaban PV y evolucionaron a mielofibrosis secundaria, pero solo uno portaba la mutación JAK2V617F, los 2 restantes presentaban TE, uno evolucionó a MF siendo positivo a la mutación y la otra paciente evolucionó a una Leucemia Mieloide Aguda (LMA) resultando negativa a la mutación. No se encontró asociación significativa entre la mutación JAK2V617F y la transformación clínica ( $p = 0,760$ ) (Tabla 3). De igual manera, no encontramos asociación significativa entre la mutación JAK2V617F y la transformación clínica cuando hicimos el análisis por separado con la PV ( $p = 0,174$ ) y la TE ( $p=1,000$ ).

**Tabla 3:** Distribución de pacientes según mutación JAK2V617F y transformación clínica

Mutación JAK2V617F	Transformación clínica		Total	P
	Sí Num (%)	No Num (%)		
Sí	2 (2,9%)	37 (53,6%)	39 (56,5%)	0,760
No	3 (4,3%)	27 (39,1%)	30 (43,5%)	
<b>Total</b>	5 (7,2%)	64 (92,8%)	69 (100,0%)	

## DISCUSIÓN

En la mayor parte de la bibliografía consultada consideran que la frecuencia de positividad a la mutación en los pacientes con PV debía encontrarse en alrededor del 90% y en 50-60% en los sujetos con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria.<sup>(2,5,6,12-15)</sup> Si bien nuestros resultados no coinciden con lo planteado por estos autores, sí muestran significación asociada con la policitemia vera respecto al resto de las neoplasias mieloproliferativas crónicas analizadas. Sin embargo, varios estudios realizados en diferentes escenarios poblacionales, como Latinoamérica,<sup>(8,17)</sup> Asia<sup>(18,19)</sup> y Europa,<sup>(20,21)</sup> incluido uno nuestro realizado con anterioridad a este,<sup>(22)</sup> reportan frecuencia de aparición de la mutación JAK2 V617F para las tres patologías que no coinciden con lo planteado anteriormente.

Las diferencias en las frecuencias reportadas, incluidas las nuestras, de la existencia de la mutación JAK 2V617F pudieran deberse a las características propias de las poblaciones, como la etnia y las migraciones.<sup>(23)</sup> El tamaño de las muestras es otro factor que pudiera, al no ser representativo en muchos casos, influir en lo encontrado. Asimismo, es importante tener en cuenta el tipo de método molecular utilizado para la detección de la mutación porque existen diferentes tipos y los mismos varían en cuanto a sensibilidad y especificidad.<sup>(24)</sup>

El hecho de no encontrar diferencias significativas al analizar la posible asociación de la presencia de la mutación con la aparición de complicaciones en general y en cada una de las patologías en particular, especialmente en la TE, pudiera deberse al tamaño muestral y la casuística de que en ellos solo encontramos 8 pacientes complicados. Estos resultados están en correspondencia con lo reportado por otros autores en trabajos similares al nuestro realizados en otras poblaciones, donde no se reportan asociaciones significativas entre la aparición de trombosis y el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad respecto a la presencia de la mutación JAK2V617F.<sup>(25-27)</sup>

De igual forma que ocurrió con el análisis de la posible asociación de la presencia de la mutación con las complicaciones, el no encontrar significación estadística respecto a la mutación JAK2 V617F y la transformación pudo deberse al tamaño muestral.

En la mayoría de la bibliografía consultada no encontramos estudios que demostraran que la sola presencia de la mutación se asociara con la aparición de MF secundaria en pacientes con NMPC, lo cual está en correspondencia con el nuestro.<sup>(25-28)</sup>

## CONCLUSIONES

En nuestros casos la mutación es significativamente frecuente en la PV, luego es un marcador diagnóstico más específico de esta patología con respecto a TE y MFP. Sin embargo, no parece constituir un marcador genético independiente para la evolución y el pronóstico de estas entidades.

## REFERENCIAS

1. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood and Hematology*. 2017; 130: 470-79.
2. Jiménez SI. Neoplasias mieloproliferativas. De la clínica a la biología molecular. *Acta Med Colomb*. 2017; 42:15-7.
3. Arber D.A, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz M.J, Le Beau M.M, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *BLOOD*. 2016; 127(20). 2391-2405.
4. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka H.M, Vannucchi A.M, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in depth discussion. *Blood Cancer J*. 2018; 8(2):15.
5. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver R.T, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: Revised management recommendations from European Leukemia Net. *Leukemia*. 2018; 32(5):1057-69.
6. Carreño G. Bases moleculares de las neoplasias mieloproliferativas crónicas filadelfia negativas [Tesis Doctoral]: Universidad Complutense de Madrid; 2021.
7. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*. 2014; 92 (4):289-97.
8. Abello V, Quintero G, Espinosa D, Solano M.H, Casas C.P, Saavedra D, et al. Descripción de las características clínicas de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC). *Acta Med Colomb*. 2017; 42:35-41.
9. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017; 129(6):680-92.
10. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol*. 2019; 94(1):133-43.
11. Iurlo A, Cattaneo D, Gianelli U. Blast Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: Risk Factors, Biological Findings, and Targeted Therapeutic Options. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20:1-13.
12. Baxter E, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365:1054-6.
13. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J*. 2017; 129:667-79.
14. Greenfield G, McMullin M.F, Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol*. 2021; 14: 1-18.

15. Marneth A.E, Mullally A. The Molecular Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020; 10: 1-24.
16. Constantinescu S.N, Vainchenker W, Levy G, Papadopoulos N. Functional Consequences of Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. HemaSphere. 2021; 5:(6):1-8
17. Campoverde A, Oliveros W, Reyes I, Maldonado B, Becerra E, Ullauri V, et al. Detección de la mutación JAK2 V617F en neoplasias mieloproliferativas en población ecuatoriana por reacción en cadena de la polimerasa alelo específica. Centro de Biotecnología. 2017; 6:15-26.
18. 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; 7:1-10.
19. Xu W, Li J-Y, Xia J, Zhang S-J, Fan L, Qiao C. MPL W515L mutation in Chinese patients with myeloproliferative diseases. Leuk Lymphoma. England. 2008; 49(5):955–8.
20. Azevedo AP, Silva SN, Reichert A, Lima F, Júnior E, Rueff J. Prevalence of the Janus kinase 2 V617F mutation in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms in a Portuguese population. Biomedical Reports. 2017; 7:370-6.
21. Payzin KB, Savasoglu K, Alacacioglu I, Ozdemirkiran F, Mutlu B.B, Bener S, et al. JAK2 V617F Mutation status of 232 patients diagnosed with chronic myeloproliferative neoplasms. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2014; 14(6):525-33.
22. Casanueva K, García G, Martínez M.T, Díaz M, González N, Carnot J. Pacientes cubanos con neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas clásicas y mutación JAK2 V617F. Rev Hematol Mex. 2019; 20(4):255-261.
23. Ustáriz CR, Morera LM, Hernández P, Estrada del Cueto M, Bencomo A, García MA, et al. Origen y composición genética de la población cubana. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2011; 27(3):273-82.
24. Palumbo G.A, Stella S, Pennisi M.S, Piroso C, Fermo E, Fabris S, et al. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. Front. Oncol. 2019; 9:(321):1-10.
25. Lang T, Nie Y, Wang Z, Huang Q, An L, Wang Y, et al. Correlation analysis between JAK2, MPL, and CALR mutations in patients with myeloproliferative neoplasms of Chinese Uygur and Han nationality and their clinical characteristics. Journal of International Medical Research. 2018; 46(11): 4650–59.
26. Lin X, Huang H, Chen P. Retrospective analysis of the clinical features of 172 patients with BCR-ABL1-negative chronic myeloproliferative neoplasms. Molecular Cytogenetics. 2020; 13(8):1-7.
27. Zulkeflee R.H, Zulkafli Z, Johan M.F, Husin A, Islam M.A, Hassan R. Clinical and Laboratory Features of JAK2 V617F, CALR, and MPL Mutations in Malaysian Patients with Classical Myeloproliferative Neoplasm (MPN). Int. J. Environ. Res. Public Health. 2021;18:1-14
28. Yönal İ, Dağlar-Aday A, Akadam-Teker B, Yılmaz C, Naçacı M, Yavuz A.S, et al. Impact of JAK2V617F Mutational Status on Phenotypic Features in Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis. Turk J Hematol. 2016; 33: 94-10.