

CARL y MPL en pacientes cubanos con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria

CARL and MPL in Cuban patients with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis

Lesbia Fernández Martínez ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8359-3061>

Heidys Garrote Santana¹ <https://orcid.org/0000-0002-8449-1278>

Ana María Amor Vigil¹ <https://orcid.org/0000-0001-9182-2664>

Carmen Alina Díaz Alonso¹ <https://orcid.org/0000-0001-6544-0662>

Julio Dámaso Fernández Águila² <https://orcid.org/0000-0002-1949-443X>

Kalia Lavaut Sánchez¹ <https://orcid.org/0000-0001-6906-2259>

Rosa María Lam Díaz¹ <https://orcid.org/0000-0002-9909-3862>

Yamilé Quintero Sierra¹ <https://orcid.org/0000-0002-6872-4326>

Adrián Romero González¹ <https://orcid.org/0000-0002-5029-9616>

Daniel Cabrera Hernández² <https://orcid.org/0000-0002-1135-2891>

¹ Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba

² Hospital General Universitario "Gustavo Aldereguía Lima", Cienfuegos, Cuba

*Autor para correspondencia: rchematologia@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria comparten la presencia de las mutaciones JAK2, CALR y MPL. En total, están presentes en poco más del 90 % de los pacientes con estas enfermedades.

Objetivos: Determinar el comportamiento de las mutaciones más frecuentes en los genes *MPL* y *CALR* en pacientes cubanos.

Métodos: Se realizó un estudio ambispectivo, descriptivo y longitudinal en el Instituto de Hematología e Inmunología de Cuba, entre los años 2010 y 2020. Se incluyeron todos los pacientes con sospecha de trombocitemia esencial y de mielofibrosis primaria con muestras de ADN válidas. Se les identificaron las mutaciones *CALR* y *MPL* por PCR en tiempo real.

Resultados: De los 53 pacientes estudiados, el 67,9 % fueron diagnosticados con trombocitemia esencial, el 22,6 % con mielofibrosis primaria. En el 90,6 % se pudo detectar alguna de las mutaciones conductoras; el 67,9 % fueron positivos a la mutación *JAK2V617F*, el 13,2 % a las mutaciones en el gen que codifica para la calreticulina y en el 9,4 % se identificaron mutaciones en el gen *MPL*.

Conclusiones: El comportamiento de las mutaciones conductoras *JAK2V617F*, *CALR* y *MPL* en la muestra de pacientes cubanos con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria estuvo en correspondencia con lo descrito en la mayoría de las investigaciones.

Palabras clave: *JAK2V617F*; calreticulina; *MPL*; trombocitemia esencial; mielofibrosis primaria

ABSTRACT

Introduction: Essential thrombocythemia and primary myelofibrosis share the presence of *JAK2*, *CALR* and *MPL* mutations. In total, they comprise slightly more than 90 % of patients with these diseases.

Objectives: To determine the behavior of the most frequent mutations in *MPL* and *CALR* genes in Cuban patients.

Methods: An ambispective, descriptive and longitudinal study was performed at the Institute of Hematology and Immunology of Cuba, between 2010 and 2020. All patients with suspected essential thrombocythemia and primary myelofibrosis with valid DNA samples were included. *CALR* and *MPL* mutations were identified by real-time PCR.

Results: Of the 53 patients studied, 67.9% were diagnosed with essential thrombocythemia, and 22.6% with primary myelofibrosis. In 90.6% it was possible to detect any of the driver mutations: 67.9% were positive for the *JAK2V617F* mutation, 13.2% for mutations in the gene coding for calreticulin and in 9.4% mutations in the *MPL* gene were identified.

Conclusions: The behavior of the driver mutations *JAK2V617F*, *CALR* and *MPL* in the sample of Cuban patients with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis was in correspondence with what is described in the majority of the investigations.

Palabras clave: *JAK2V617F*; calreticulin; *MPL*; essential thrombocythemia; primary myelofibrosis

Recibido: 23/12/22

Aceptado: 19/06/23

Introducción

Las NMP (neoplasias mieloproliferativas) clásicas BCR-ABL1 negativas se consideran hemopatías malignas en las que la presencia de mutaciones en las células madre hematopoyéticas dan lugar a una producción aberrante de clones mieloides que generan tres fenotipos clínicos distintos: policitemia Vera, trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP). La TE y la MFP comparten la presencia de tres mutaciones conductoras iniciadoras del fenotipo mieloproliferativo en los genes *JAK2* (*Janus quinasa 2*), *MPL* (del inglés, *myeloproliferative leukemia virus oncogene*) y *CALR* (calreticulina).^(1,2)

En la TE y la MFP (en cada una de ellas) alrededor del 50-60 % de los pacientes presenta la mutación *V617F* del *JAK2*. Mientras que cerca del 20 al 25 % de los pacientes con TE y del 25 al 30 % de los diagnosticados con MFP presentan alteraciones en el exón 9 del gen *CALR*. Por último, las conversiones genéticas en

el exón 10 del gen *MPL* apenas representan del 4 al 5 % de los afectados por TE y MFP. En total, están presentes en poco más del 90 % de los pacientes con estas enfermedades. ^(2,3)

En general, las mutaciones de los genes *JAK2*, *CALR* y *MPL* son descritas como mutuamente excluyentes, lo que unido a la frecuencia con la que se presentan en las NMP ha permitido establecer un algoritmo diagnóstico racional ante la sospecha clínica y hematológica de su presencia. En resumen, en la TE y la MFP, primero se estudia la mutación *JAK2V617F* y si este resulta positivo se confirma el diagnóstico. En los casos negativos se continúa el estudio de las mutaciones del gen *CALR* y si no se obtiene un diagnóstico confirmatorio, se procede al análisis de las mutaciones en *MPL*. ⁽⁴⁾

Hasta hace pocos años se consideraba que estas mutaciones conductoras eran mutuamente excluyentes, pero estudios recientes han demostrado que del 10 al 15% de los casos positivos a la mutación *JAK2V617F* con una carga alélica baja (inferior al 5 %) pueden coincidir con mutaciones de los genes *CALR* o *MPL*. ^(5,6)

Alrededor del 10 % de los pacientes con TE y aproximadamente del 5 al 10 % de aquellos con MFP reúnen los criterios diagnósticos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para las NMP, pero no se identifican en ellos ninguna de estas tres mutaciones conductoras. Ese grupo de pacientes se definen como triples negativos. ^(3,7,8) En algunos pacientes con TE, se han identificado mutaciones atípicas (no canónicas) del gen *MPL* y variantes de mutaciones del gen *JAK2*. ^(9,10)

No existen investigaciones previas en Cuba, que evalúen la TE y la MFP desde la perspectiva molecular de la identificación de mutaciones en los genes *MPL* y *CALR* por lo que el propósito de este trabajo es determinar su comportamiento en pacientes cubanos.

Métodos

Se realizó un estudio ambispectivo, descriptivo y longitudinal en pacientes con estudios previos de la mutación *JAK2V617F* por PCR-AE cualitativa. La

recopilación de los casos se extendió desde julio de 2010 a diciembre de 2020 y todas las determinaciones fueron realizadas en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI).

Se estudiaron 53 pacientes con sospecha de TE, MFP y NMP no clasificadas procedentes del IHI y del servicio de Hematología del Hospital General Universitario "Gustavo Aldereguía Lima", de Cienfuegos. En primer lugar, se realizó la cuantificación de la mutación *JAK2V617F*. Seguidamente, a los pacientes negativos a esta mutación o con una carga mutacional inferior al 5 % se les realizó la detección e identificación de mutaciones en el gen *CALR*. Por último, en los que resultaron doblemente negativos a estas mutaciones o con baja carga alélica de la mutación *JAK2V617F* se estudiaron las mutaciones en el gen *MPL*.

Los criterios de elegibilidad incluyeron a todos los pacientes con sospecha de TE y MFP con muestras de ADN genómico válidas para ser procesadas y que cumplieran con los criterios diagnósticos para las NMP clásicas *BCR-ABL1* negativas emitidas por la OMS en el 2016. No se admitieron pacientes que presentaban otra enfermedad o condición que pudiera influir en los resultados de las investigaciones de laboratorio y aquellos en los que no se pudo obtener información de las historias clínicas acerca de las variables útiles para el estudio.

Se empleó el libro de registro del laboratorio de biología molecular, para la selección de los pacientes con estudio molecular de la mutación *JAK2V617F*. Todos los diagnósticos fueron revaluados mediante la revisión de historias clínicas donde se obtuvieron los datos referentes a: edad, sexo, hemoglobina, conteo de plaquetas y leucocitos, así como la presencia de hepatomegalia, esplenomegalia y antecedentes de trombosis arterial o venosa y de sangrado. La biopsia de médula ósea solo se tuvo en cuenta como criterio de confirmación de la NMP. Esta información fue corroborada por los hematólogos de asistencia.

La información se recopiló en una planilla de recolección de datos, que constituyó la fuente primaria. Se creó una base de datos en una plantilla de Microsoft Office Excel 2010. Toda la información fue revisada y clasificada para ser procesada después en las distintas etapas de análisis estadísticos.

Se emplearon las muestras de ADN genómico extraídas de sangre periférica anticoagulada con EDTA y conservadas a una temperatura inferior a -20°C . Se seleccionaron las que presentaban una concentración de ADN mayor o igual a $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ y un cociente de A_{260}/A_{280} superior a 1,7, comprobado a través del espectrofotómetro de microgotas EPOCH (BioTek, EEUU).

Las muestras más antiguas de ADN habían sido aisladas mediante cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y precipitación con etanol absoluto; ⁽¹¹⁾ mientras que para las más recientes se empleó el QIAamp DNA Blood Mini Kit (cat. no. 51104, QIAGEN, GmbH, Alemania). ⁽¹²⁾

Detección e identificación cualitativa de mutaciones somáticas en el exón 9 del gen que codifica la calreticulina

Las muestras de ADN genómico fueron normalizadas a una concentración de $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ diluidas en solución tampón TE (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), provisto por el fabricante del kit CALR RGQ PCR (cat. 674013 de QIAGEN, GmbH, Alemania), ⁽¹³⁾ antes de su procesamiento.

Atendiendo a las instrucciones del fabricante, se preparó un volumen final de $25\ \mu\text{L}$ para cada una de las siete mezclas de reacción incluidos $5\ \mu\text{L}$ (50 ng) de ADN de la muestra. Se emplearon los controles suministrados en el kit. El programa de amplificación en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM se basó en un paso inicial de desnaturalización de 10 min a 95°C , seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 s, a continuación, otro paso de 60°C por 1 min con adquisición de la fluorescencia FAM en el canal verde y la HEX en el canal amarillo.

Los valores de C_T (del inglés, *cycle threshold*) obtenidos con las mezclas de reacción del kit CALR RGQ PCR para todos los controles y muestras se chequearon para ser validadas y detectar las mutaciones, según las indicaciones del fabricante. El estado de positivo o negativo se asignó por comparación del valor de C_T de cada muestra en el canal FAM con los criterios de positividad/negatividad, en cada una de las variantes, presentados en el inserto del kit.

Detección e identificación de las mutaciones W515L y W515K del gen MPL

El ADN se diluyó a 5 ng/ μ L en tampón TE pH 8,0 (la concentración se optimizó a 25 ng/ μ L para añadir un volumen de 5 μ L a la reacción). Se utilizó el kit ipsogen MPL W515L/K MutaScreen (cat. 676413 de QIAGEN, GmbH, Alemania) ⁽¹⁴⁾ en el equipo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Este análisis se basa en el empleo de dos sondas en una prueba multiplexada como parte de un experimento de discriminación alélica.

Las muestras fueron procesadas por duplicado, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se preparó un volumen final de 25 μ L para cada una de mezclas de reacción (MPL W515L y MPL W515K) que incluyó 5 μ L de ADN de la muestra. Se emplearon los cebadores, sondas y controles suministrados en el kit, excepto la Taq DNA Polimerasa y el agua libre de nucleasas que procedieron del kit QuantiNova Probe PCR (cat. 208256 de QIAGEN, GmbH, Alemania). ⁽¹⁵⁾ El programa de amplificación comprendió un paso inicial de 2 min a 50°C y otro paso de calentamiento de 10 min a 95°C seguido de 50 ciclos de dos pasos: 92°C por 15 s y 60°C por 1 min, con adquisición de fluorescencia FAM en el canal verde y VIC en el amarillo.

Una vez finalizada la corrida los datos se exportaron a una hoja de Excel en el software del equipo y se calculó la relación FAM/VIC de cada muestra. Esta relación se comparó con la media de la muestra de corte (mezcla de alelos MT y WT al 1,5 %), provista en el kit, que representa el límite de detección y se determinó la positividad de la muestra en estudio. Para facilitar el cálculo de los resultados, se creó una hoja de cálculo en Excel Windows 10 donde se introdujeron los valores FAM/VIC de cada muestra

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos se realizó con el empleo del paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows y con el paquete estadístico Past 4.03. Como

medida de resumen para las variables cuantitativas se utilizaron la mediana, la media y la desviación estándar y para las cualitativas las frecuencias absolutas y relativas. Para determinar asociación entre las variables clínicas y la mutación se utilizó la prueba Chi Cuadrado de independencia.

La comparación de las variables de laboratorio por la edad se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis para dos y tres grupos, respectivamente. En estas pruebas se tuvo en cuenta un nivel de significación de 0,05. En caso de encontrarse diferencias significativas en las comparaciones de tres grupos, para saber cuáles diferían entre sí, se realizaron las comparaciones *a posteriori* mediante la prueba de Mann-Whitney acompañada de la corrección de Bonferroni, con un nivel de significación de 0,017.

Procedimientos éticos

Para realizar esta investigación se contó con la autorización de la dirección del IHI, con la aprobación del Consejo Científico y del Comité de Ética de las Investigaciones, de dicha institución. Se respetó lo establecido en los principios básicos de la Declaración de Helsinki que contiene las recomendaciones a seguir en la investigación en seres humanos.

Las muestras de ADN fueron obtenidas con anterioridad para estudios de la mutación *JAK2V617F* con el consentimiento de los participantes. Se garantizó en todo momento, la integridad del paciente y la confidencialidad de la información.

Resultados

Características de los pacientes

De los 53 pacientes estudiados, el 67,9 % fueron diagnosticados con TE, el 22,6 % con MFP y solo en el 9,4 % no se pudo clasificar el tipo de NMP. En estos pacientes la edad estuvo comprendida entre 31 y 78 años, ligeramente inferior en los pacientes con TE con respecto al resto.

En este estudio se apreciaron diferencias significativas en parámetros clínico hematológicos relacionados con las características de cada enfermedad. Los pacientes con MFP presentaron menores cifras de hemoglobina y los afectados por TE tuvieron mayor conteo de plaquetas. La presencia de visceromegalia fue mayor en los pacientes con MFP y NMP no clasificada que en la TE (Tabla 1).

Tabla 1- Características demográficas, clínicas y hematológicas de los pacientes

Características	Trombocitemia esencial (n=36)	Mielofibrosis primaria (n=12)	Neoplasia mieloproliferativa no clasificable (n=5)	P
Edad (años) media (rango)	55,5 (31-76)	61,5 (40-75)	63 (38- 78)	0,22
Sexo M/F	7/29	4/8	3/2	0,1
Hemoglobina, (g/L) media (rango)	136,5 (78-157)	94,5 (43-151)	142 (122-181)	0,00*
Conteo de plaquetas (x 10 ⁹ /L), media (rango)	841 (350- 2862)	140 (10-817)	554 (415-1021)	0,00*
Conteo de leucocitos (x 10 ⁹ /L), media (rango)	9,8 (4,8-29,7)	15,2 (2,4-30,8)	10,8 (7-58,2)	0,60
Hepatomegalia, n (%)	3 (8,3)	4(33,3)	3(60,0)	0,008*
Esplenomegalia, n (%)	7(19,4)	11(91,7)	4(80,0)	0,00*
Trombosis, n (%)	4 (11,1)	1 (8,3)	0	0,72
Sangrado, n (%)	2 (5,6)	2 (16,7)	1 (20,0)	0,36

Mutaciones conductoras en la trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria

Del total de pacientes, en el 90,6 % se pudo detectar alguna de las mutaciones conductoras. El 67,9 % fueron positivos a la mutación *JAK2V617F*, el 13,2 % a las mutaciones en el gen que codifica para la calreticulina y en el 9,4 % se identificaron mutaciones en el gen *MPL*. No se detectaron mutaciones en cinco pacientes, los que fueron clasificados como triples negativos.

El 91,7 % de los afectados con TE presentó una de las alteraciones genéticas responsables del fenotipo mieloproliferativo. La positividad para el *JAK2V617F* en la TE fue del 66,7 %. En esta enfermedad el 16,7 % fueron positivos a las alteraciones

del gen *CALR*; en estos se observó un predominio de las mutaciones tipo 2. En tres pacientes se detectaron variaciones en el gen *MPL* que representaron el 8,3 % del total de este grupo. El 8,3 % de los pacientes se clasificaron como triples negativos, al no encontrarse ninguna alteración molecular. No se comprobó concomitancia de mutaciones en tres de los pacientes con baja carga alélica del *JAK2V617F* a los que, también, se les hicieron los estudios moleculares de las mutaciones en los genes *CALR* y *MPL*.

En el 91,7 % de los pacientes con MFP se detectaron una de las tres mutaciones conductoras. También, al igual que en la TE, el 66,7 % fueron positivos a la mutación *JAK2V617F*. Mientras que solo en un paciente se identificó la mutación tipo 2 del gen *CALR*, para un 8,3 % de positividad. En dos pacientes con MFP se detectaron alteraciones en el gen *MPL*, 16,7 % de los diagnosticados. Solamente en un paciente con MFP no se detectó alguna de las mutaciones estudiadas en esta serie. (Tabla 2)

Tabla 2 - Frecuencia de mutaciones conductoras de acuerdo a cada una de las enfermedades (trombocitemia esencial, mielofibrosis primaria y neoplasias no clasificadas)

Perfil mutacional	Trombocitemia esencial n=36 (%)	Mielofibrosis primaria n=12 (%)	Neoplasia mieloproliferativa no clasificable n=5 (%)	Total n=53 (%)
<i>JAK2V617F</i>	24 (66,7)	8 (66,7)	4 (80)	36 (68)
<i>CALR</i>	6 (16,7)	1 (8,3)	0 (0)	7 (13,2)
Tipo 1	2(33,3)	0 (0)	0 (0)	2(28,6)
Tipo2	4 (66,7)	1 (100)	0 (0)	5 (71,4)
<i>MPL</i>	3(8,3)	2 (16,7)	0 (0)	5 (9,4)
W515L	2(66,6)	1(50)	0 (0)	3 (60)
W515K	1(33,3)	1(50)	0 (0)	2 (40)
Total	33(91,7)	11(91,7)	4(80)	48 (90,6)
Triple negativo	3(8,3)	1(8,3)	1 (20)	5 (9,4)

En las tablas 3 y 4 se muestran las características clínicas y hematológicas según el genotipo obtenido en la TE y la MFP. No se pudieron establecer diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 3 - Características clínico-hematológicas de los pacientes con trombocitemia esencial estratificado por el estado mutacional

Características	JAK2V617F n=24	CALR n=6	MPL n=3	Triples negativos n=3
Edad, (años) mediana (rango)	55 (32-76)	57 (32-68)	66 (51-69)	51 (31-76)
Sexo, M/F	6/18	1/5	0/3	0/3
Hemoglobina (g/L), mediana (rango)	138,5 (96-57)	134,5 (108-155)	110 (78-142)	137 (118-137)
Conteo de plaquetas, (x 10 ⁹ /L), mediana (rango)	825 (350-1538)	971,5 (666-2190)	760 (395-2862)	600 (550-918)
Conteo de leucocitos, (x 10 ⁹ /L), mediana (rango)	9,8 (4,8-29,7)	9,2 (7,1-10,9)	8 (5,9-10,1)	8,6 (7-12,9)
Esplenomegalia, n(%)	5 (20,8)	1 (16,6)	0 (0)	1(33,3)
Hepatomegalia, n(%)	2 (8,3)	1 (16,6)	0 (0)	0 (0)
Trombosis, n(%)	1 (4,16)	1 (16,6)	0 (0)	2 (66,6)
Sangrado, n(%)	1 (4,16)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)

Tabla 4 - Características clínico-hematológicas de los pacientes con mielofibrosis primaria estratificado por el estado mutacional

Características	JAK2V617F n=8	CALR n=1	MPL n=2	Triples negativos n=1
Edad, mediana (rango)	67,5 (48-75)	59	55 (49-61)	40
Sexo, M/F	3/5	0/1	1/1	0/1
Hemoglobina, g/L, mediana (rango)	94,5 (43-151)	103	95 (82-108)	90
Conteo de plaquetas, x 10 ⁹ /L mediana (rango)	140 (10-817)	800	150 (80-220)	42
Conteo de leucocitos, x 10 ⁹ /L, mediana (rango)	20 (4,2-28,5)	30,8	4,2 (2,4-6)	3,8
Hepatomegalia, n (%)	3 (37,5)	0	1 (50)	0
Esplenomegalia, n(%)	8 (100)	1	2	0
Trombosis, n(%)	0	1	0	0
Sangrado, n(%)	1 (12,5)	0	1 (50)	0

Discusión

Las mutaciones conductoras están presentes en aproximadamente el 90 % de los pacientes con TE y MFP; ^(3,9,16) este porcentaje coincide con esta serie de pacientes cubanos con estas enfermedades estudiadas por primera vez en el país. Este resultado muestra que la combinación de los estudios moleculares para la detección de esas mutaciones conductoras resulta esencial para garantizar el diagnóstico certero de las NMP clásicas BCR-ABL1 negativas.

La mayoría de las investigaciones que involucran una gran serie de pacientes y que emplean métodos de detección más sensibles informan cifras similares. ⁽¹⁷⁾ Pietra y colaboradores, en un estudio en Italia que incluyó 1282 sujetos encontró que el 90 % de los pacientes con TE portaba alguna de las mutaciones conductoras, mientras que el 93 % de los diagnosticados con MFP era positivo a una de ellas. ⁽¹⁸⁾ Otro estudio, llevado a cabo en Argentina, por Ojeda y colaboradores, en 208 pacientes con TE y 46 con MFP mostró resultados similares con el 85,5 % y el 85,2 %, respectivamente, de los sujetos analizados con mutaciones conductoras. ⁽¹⁹⁾

La mutación *JAK2V617F* fue la más frecuente de las tres lo cual coincide con otras investigaciones y se encontró en un porcentaje ligeramente superior a estudios previos. ⁽²⁰⁾

En orden de frecuencia, en la TE, se encontraron las mutaciones del gen *CALR* en el 16,6 % de los diagnosticados con esa enfermedad, pero en la MFP fueron desplazadas por las mutaciones en el gen *MPL*. En esta muestra predominaron las mutaciones tipo 2 de *CALR* en ambas enfermedades, a diferencia de lo que informan la mayoría de las publicaciones sobre el tema en los países occidentales referente a que la mutación tipo 1 del *CALR* es la predominante. ^(16,17,21)

Sin embargo, en un estudio realizado por Soliman y colaboradores, en Egipto en 68 individuos con TE y 40 con MFP, solo detectaron un paciente con *CALR* tipo 1 de los 20 encontrados (11 con *CALR* tipo 2 y el resto con otras variantes del gen). Estos investigadores atribuyeron estas diferencias a influencias genéticas y ambientales. ⁽²²⁾ Ojeda encontró un predominio del tipo 2 en la MFP; mientras que

en la TE halló una distribución equitativa entre ambos tipos (19 del tipo 1 y 17 del tipo 2).⁽¹⁹⁾ En China, Li y colaboradores, observaron un comportamiento similar en el predominio de las variantes tipo 2 en pacientes con MFP.⁽²³⁾ Estas discrepancias en cuanto al predominio del tipo 2 sobre el tipo 1 en estas poblaciones fueron explicadas por las características.

Las mutaciones en *MPL* son las más infrecuentes de las tres.^(2, 3, 15, 10) En este estudio se encontraron en cinco de los 53 pacientes, y resultó ser la segunda más frecuente en la MFP. Para un análisis concluyente, se requiere disponer de un mayor número de casos.

La escasa cantidad de pacientes incluidos en el estudio pudo influir en que no se encontraron diferencias significativas entre el genotipo y las características clínico hematológicas de los pacientes. No obstante, en la TE hubo coincidencias con otras investigaciones en relación con algunas de las características clínicas y hematológicas de los pacientes.^(2, 16) Los pacientes más jóvenes fueron aquellos en donde no se detectaron mutaciones. Los pacientes positivos a alteraciones en el gen *CALR* mostraron un mayor conteo de plaquetas que el resto; mientras que los que presentaron modificaciones en el gen *MPL* registraron menores cifras de hemoglobina. En este sentido, se debe ampliar la muestra para obtener resultados que permitan evaluar estas características.

El comportamiento de las mutaciones conductoras *JAK2V617F*, *CALR* y *MPL* en la muestra de pacientes cubanos con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria estuvo en correspondencia con lo descrito en la mayoría de las investigaciones con algunas particularidades en las características de presentación de esas enfermedades.

Referencias bibliográficas

1. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and indepth discussion. Blood Cancer J.

- 2018;8(2):15. DOI: <https://10.1038/s41408-018-0054-y>
2. Sharma V, Wright KL, Epling-Burnette PK, Reuther GW. Metabolic vulnerabilities and epigenetic dysregulation in myeloproliferative neoplasms. *Front Immunol.* 2020;11:604142. DOI: <https://10.3389/fimmu.2020.604142>
 3. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):680-92. DOI: <https://10.1182/blood-2016-10-695957>
 4. Usseglio F, Beaufils N, Calleja A, Raynaud S, Gabert J. Detection of CALR and MPL mutations in low allelic burden JAK2 V617F essential thrombocythemia. *J Mol Diagn.* 2017;19(1):92-98. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.08.006
 5. Mora B, Passamonti F. Developments in diagnosis and treatment of essential thrombocythemia. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(3):159- 71. DOI: <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1585239>
 6. Mansier O, Paz DL, Ianotto JC, Le Bris Y, Chauveau A, Boyer F et al Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Am J Hematol.* 2018;93(4):e84-6. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajh.25014>
 7. 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: <https://doi.org/10.2147/OTT.S287944>
 8. Loscocco GG, Coltro G, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Integration of molecular information in risk assessment of patients with myeloproliferative neoplasms. *Cells.* 2021;10(8):1962. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10081962>
 9. Jang MA, Choi CW. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *Korean J Intern Med.* 2020 Jan;35(1):1-11. DOI: <https://10.3904/kjim.2019.317>

10. Schischlik F, Kralovics R. Mutations in myeloproliferative neoplasms – their significance and clinical use. *Expert Rev Hematol.* 2017;10(11):961-73. DOI: <https://10.1080/17474086.2017.1380515>
11. Amor Vigil AM, Díaz Alonso CA, Garrote Santana H, Suárez González Y, Fernández Delgado N, Avila Cabrera OM, et al. Introducción del estudio molecular de la mutación V617F del gen JAK2 en neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL negativas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2013 [citado 16/10/19];29(4):[aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/86>
12. QIAGEN. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 3rd ed 2012.
13. QIAGEN. CALR RGQ PCR Kit Handbook. Cat. 674013. Nov 2016.
14. QIAGEN. Ipsogen® MPL W515L/K MutaScreen Handbook. Cat. 676413. Jan 2013.
15. QIAGEN. QuantiNova™ Probe PCR Handbook. Cat. 208256. Sep 2013
16. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):667-79. DOI: 10.1182/blood-2016-10-695940
17. 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(25):2379-90. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311347>
18. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanesi C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016;30(2):431 -8. DOI: <https://doi.org/10.1038/leu.2015.277>
19. Ojeda MJ, Bragós IM, Calvo KL, Williams GM, Carbonell MM, Pratti AF. CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with BCRABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology.* 2018;23(4):208-11. DOI: <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1385891>
20. Fernández-Martínez L, Garrote-Santana H, Amor-Vigil A, Díaz-Alonso C, Fernández-Águila J, Lavaut-Sánchez K, et al. Influencia de la carga alélica del

JAK2V617F en pacientes cubanos con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2022 [citado 22/12/22]; 38(4):e1655. Disponible en:

<https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1655>.

21. Misawa K, Yasuda H, Araki M, Ochiai T, Morishita S, Shirane S, et al. Mutational subtypes of JAK2 and CALR correlate with different clinical features in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. Int J Hematol. 2018;107(6):673-80. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2421-7>
22. Soliman EA, El-Ghlban S, El-Aziz SA, Abdelaleem A, Shamaa S, AbdelGhaffar H. JAK2, CALR, and MPL mutations in Egyptian patients with classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2020;20(10):e645-1 . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2020.05.011>
23. Li B, Xu J, Wang J, Gale RP, Xu Z, Cui Y, et al. Calreticulin mutations in Chinese with primary mielofibrosis. Haematologica. 2014;99(11):1697-700. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.109249>

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Lesbia Fernández Martínez, Heidys Garrote Santana, Ana María Amor Vigil

Curación de datos: Lesbia Fernández Martínez, Julio Dámaso Fernández Águila, Kalia Lavaut Sánchez, Yamilé Quintero Sierra, Adrián Romero González, Daniel Cabrera Hernández

Análisis formal: Lesbia Fernández Martínez, Rosa María Lam Díaz

Investigación: Lesbia Fernández Martínez, Heidys Garrote Santana, Ana María Amor Vigil, Carmen Alina Díaz Alonso, Annelys González González

Metodología: Lesbia Fernández Martínez, Heidys Garrote Santana, Ana María Amor Vigil, Carmen Alina Díaz Alonso, Annelys González González

Redacción borrador- original: Lesbia Fernández Martínez.

Redacción revisión-edición: Lesbia Fernández Martínez, Heidys Garrote Santana, Ana María Amor Vigil