

# Pacientes cubanos con neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas clásicas y mutación JAK2 V617F

## Cuban patients with classic Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms and JAK2 V617F mutation.

Karina Casanueva-Calero,<sup>1</sup> Gissel García-Menéndez,<sup>1</sup> María Teresa Martínez-Echevarría,<sup>1</sup> Milania Díaz-López,<sup>1</sup> Nadezhda González-García,<sup>1</sup> José Carnot-Uría<sup>2</sup>

### Resumen

**ANTECEDENTES:** La mutación JAK2V617F constituye un marcador importante para definir la existencia de una neoplasia mieloproliferativa Filadelfia negativa clásica.

**OBJETIVO:** Evaluar la frecuencia de la mutación JAK2V617F en pacientes cubanos con neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas clásicas.

**MATERIAL Y MÉTODO:** Estudio transversal descriptivo que de 2012 a 2018 incluyó pacientes con neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas clásicas remitidos del servicio de Hematología del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, en Cuba. La detección de la mutación se realizó mediante la técnica de PCR alelo-específico en el Laboratorio de Genética Molecular de esa institución.

**RESULTADOS:** De los 95 pacientes estudiados, 56 (58.9%) resultaron positivos a la mutación y 39 (41.1%) negativos. La mayor frecuencia se encontró en los pacientes con policitemia vera (n = 33.7%), seguida de la trombocitemia esencial (n = 22; 46.8%) y la mielofibrosis primaria (n = 1; 25%). La asociación entre las frecuencias de la mutación y las enfermedades clínicas fueron significativas (p = 0.009). El mayor porcentaje de pacientes con la mutación correspondió a la población masculina (n = 30, 53.6%), al color de la piel blanco (n = 40, 71.4%) y a los de 50 años de edad o más.

**CONCLUSIONES:** La frecuencia de la mutación JAK2V617F en pacientes cubanos con policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria corresponde con la reportada en estudios similares en otros escenarios poblacionales.

**PALABRAS CLAVE:** Mutación; neoplasias mieloproliferativas crónicas; reacción en cadena de la polimerasa; PCR.

### Abstract

**BACKGROUND:** The mutation JAK2V617F constitutes an important marker to define the presence of a classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia.

**OBJECTIVE:** To evaluate the frequency of the mutation JAK2V617F in Cuban patients with classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms.

**MATERIAL AND METHOD:** A descriptive cross-sectional study was carried out from 2012 to 2018 including patients with classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms referred from the Hematology service of the Clinical and Surgical Hospital Hermanos Ameijeiras, Cuba. The detection of the mutation was carried out using an allele-specific PCR technique at the Laboratory for Molecular Genetics of this institution.

**RESULTS:** Of 95 studied patients, 56 (58.9%) were positive to the mutation and 39 (41.1%) negatives. The highest frequency was found in patients with polycythemia vera (n = 33, 75%), followed by those with essential thrombocythemia (n = 22; 46.8%) and primary myelofibrosis (n = 1; 25%). The association between the frequencies of the mutation and the clinical diseases was significant (p = 0.009). The greatest percentage of patients with the mutation corresponded to males (n = 30; 53.6%), to the patients with white color of the skin (n = 40; 71.4%) and to those aged 50 years or more.

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética Molecular.

<sup>2</sup> Servicio de Hematología.

Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, La Habana, Cuba.

**Recibido:** 22 de abril 2019

**Aceptado:** 12 de julio 2019

### Correspondencia

Karina Casanueva Calero  
kcasanv@infomed.sld.cu

### Este artículo debe citarse como

Casanueva-Calero K, García-Menéndez G, Martínez-Echevarría MT, Díaz-López M y col. Pacientes cubanos con neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas clásicas y mutación JAK2 V617F. Hematol Méx. 2019 octubre-diciembre;20(4):255-261. <https://doi.org/10.24245/rhematol.v20i4.3139>

**CONCLUSIONS:** The frequency of the mutation JAK2V617F in Cuban patients with polycythemia vera, essential thrombocythemia or primary myelofibrosis correlates with those reported in similar studies in other population scenarios.

**KEYWORDS:** Mutation; Chronic myeloproliferative neoplasms; Polymerase chain reaction; PCR.

## ANTECEDENTES

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas son trastornos clonales de la célula madre hematopoyética caracterizados por la proliferación en la médula ósea de una o más de las líneas celulares. Las más notables en la práctica clínica son la leucemia mieloide crónica y las neoplasias mieloproliferativas crónicas cromosoma Filadelfia negativas clásicas, entre las que están incluidas la policitemia vera, la trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria.<sup>1-3</sup>

La policitemia vera es la más común entre las neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas con incidencia de 2 por cada 100,000 habitantes, la trombocitemia esencial ocurre con incidencia de 1.5-2.5 casos por 100,000 personas por año y la mielofibrosis primaria es la más infrecuente con incidencia anual de 0.2-1.5 casos por 100,000 personas.<sup>2</sup> Asimismo, según la base de datos EURO CARE-5 (EUROpean CAncer REgistry) 2002-2007 se observó el doble de casos de estas neoplasias (n = 36,582) respecto a EURO CARE-4 1995-2002 (n = 14,524) en una escala de tiempo similar a la anterior,<sup>3</sup> es decir, se está incrementando la incidencia en todo el mundo de esas enfermedades.

En 90-95% de los pacientes con policitemia vera 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 de 50%

de los pacientes con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria.<sup>1,2,4-8</sup> En esa 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 ese dominio sobre el dominio JH1 con actividad tirosina cinasa, lo que aumenta la transducción de las señales de los factores de crecimiento, principalmente de la eritropoyetina, con el resultado final de una excesiva proliferación hematopoyética.<sup>2,4-6,8,9</sup>

A diferencia de la policitemia vera, donde la existencia de la mutación JAK2V617F proporciona un diagnóstico más certero, la ausencia de ésta en la trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria no excluye el diagnóstico. Además, la existencia de esta mutación no permite discriminar entre las distintas neoplasias mieloproliferativas crónicas, ni tampoco entre éstas y otras neoplasias mieloides, que con menor frecuencia pueden mostrar esta alteración molecular. Por ello, se hace necesario utilizar otros criterios diagnósticos clínicos, histológicos y moleculares para su adecuada clasificación.<sup>9</sup>

La principal aplicación clínica de la detección de la mutación JAK2V617F radica en el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas. De esta manera constituye un marcador clonal que permite diferenciar

trastornos neoplásicos de afecciones no clonales,<sup>9</sup> formando parte de uno de los criterios diagnósticos de policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria que establece la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>10-12</sup> En consecuencia, en los últimos años se han desarrollado diferentes métodos moleculares para la detección de la citada mutación, la PCR alelo específico cualitativo es uno de los más usados.

En Cuba no son muchos los reportes del comportamiento de las frecuencias de aparición de la mutación JAK2V617F en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas cromosoma Filadelfia negativas. Por ello, nos propusimos en este trabajo evaluar la frecuencia de la mutación en pacientes con diagnóstico clínico de policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria mediante la PCR alelo específico cualitativa, que sería de gran utilidad para la mejor comprensión de estas enfermedades en nuestro país, permitiendo establecer un diagnóstico más completo y certero de las mismas.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio transversal descriptivo que de 2012 a 2018 incluyó pacientes con neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas clásicas remitidos del servicio de Hematología del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, en Cuba.

### Muestra

Se usaron muestras de ADN obtenidas a partir de 200 µL 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 (A260) usando un monocromador de microgotas NanoDropOne® (ThermoScientific).

### Detección de la mutación V617F en el gen JAK2

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 colaboradores<sup>1</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 µmol/L para los dos oligonucleótidos cebadores en sentido y 1.5 µmol/L para el oligonucleótido cebador en antisentido). La identificación de los productos de la amplificación se realizó mediante electroforesis submarina en geles de agarosa a 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.

### Análisis estadístico

Se realizó análisis de frecuencia y análisis de comparación de medias mediante la prueba estadística  $\chi^2$  con el uso del programa estadístico SPSS versión 20.

## RESULTADOS

Se incluyeron 95 pacientes. En el análisis de las edades de los pacientes estudiados se encontró que tenían entre 23 y 89, con promedio de 60 años. De ellos, 49 correspondieron al género

femenino. Los pacientes tenían las siguientes neoplasias mieloproliferativas crónicas: policitemia vera (n = 44), trombocitemia esencial (n = 47) y mielofibrosis primaria (n = 4); la distribución de los mismos en cuanto al color de la piel fue la siguiente: 69 blancos y 26 no blancos (**Cuadro 1**).

De las 95 muestras analizadas, 56 (58.9%) resultaron positivas a la mutación y 39 (41.1%) negativas. La mayor frecuencia se determinó en los pacientes con policitemia vera (n = 33, 75%), seguida de la trombocitemia esencial (n = 22; 46.8%) y la mielofibrosis primaria (n = 1; 25%). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de la mutación relacionadas con las enfermedades (p = 0.009). Esta significación se asoció fundamentalmente con el diagnóstico de la policitemia vera comparado con la trombocitemia esencial (p = 0.035) y la mielofibrosis primaria (p = 0.006). No se encontró significativa la mutación para los diagnósticos de trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria (p = 0.400).

**Cuadro 2**

El mayor porcentaje de pacientes con la mutación correspondió a la población masculina

**Cuadro 1.** Distribución de las variables demográficas en la población estudiada

Variables	Frecuencia Núm. (%)
<b>Edad</b>	
Mayores o iguales a 50 años	73 (76.8)
Menores de 50 años	22 (23.2)
<b>Género</b>	
Femenino	49 (51.6)
Masculino	46 (48.4)
<b>Color de la piel</b>	
Blancos	69 (72.6)
No blancos	26 (27.4)
Total	95 (100)

**Cuadro 2.** Comparación de la frecuencia de la mutación JAK2 V617F en pacientes con policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria

Diagnóstico clínico	JAK2V617F		Total	Significación
	Negativa	Positiva		
Trombocitemia esencial	25	22	47	
Policitemia vera	11	33	44	
Mielofibrosis primaria	3	1	4	
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>56</b>	<b>95</b>	<b>p = 0.009</b>
Policitemia vera	11	33	44	
Mielofibrosis primaria	3	1	4	
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>34</b>	<b>48</b>	<b>p = 0.035</b>
Policitemia vera	11	33	44	
Trombocitemia esencial	25	22	47	
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>55</b>	<b>91</b>	<b>p = 0.006</b>
Mielofibrosis primaria	3	1	4	
Trombocitemia esencial	25	22	47	
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>23</b>	<b>51</b>	<b>p = 0.400</b>

(n = 30, 53.6%), al color de la piel blanco (n = 40, 71.4%) y a los de 50 años o más (n = 45, 80.4%). **Cuadro 3**

**DISCUSIÓN**

La detección de la mutación JAK2V617F constituye uno de los criterios mayores definidos por la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de la policitemia vera, la trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria.<sup>10-12</sup>

La mayor parte de los estudios considera que la frecuencia de positividad a la mutación en los pacientes con policitemia vera debía encontrarse en más de 90% y en 50-60% en los sujetos con trombocitemia esencial y mielofibrosis prima-

**Cuadro 3.** Frecuencia de la mutación según el género, el color de la piel y el intervalo de edad

Variables	Frecuencia Núm. (%)
<b>Género</b>	
Femenino	26 (46.4)
Masculino	30 (53.6)
<b>Color de la piel</b>	
Blanco	40 (71.4)
No blanco	16 (28.6)
<b>Edad</b>	
Mayores e iguales de 50 años	45 (80.4)
Menores de 50 años	11 (19.6)
<b>Total</b>	56 (100)

ria.<sup>1,2,4-7</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.

Nuestros resultados avalan lo planteado por Alshemmari y colaboradores, quienes describen un intervalo de frecuencias de aparición de la mutación para las tres enfermedades, refiriendo entre 65 y 97% para los pacientes con policitemia vera, entre 23 y 57% para la trombocitemia esencial y entre 35 y 57% para la mielofibrosis primaria.<sup>13</sup> Este criterio se ve también reflejado en otros estudios realizados en diferentes escenarios poblacionales, como Latinoamérica,<sup>14,15</sup> Asia<sup>16</sup> y Europa.<sup>17-20</sup>

Las diferencias en las frecuencias reportadas de la existencia de la mutación JAK 2V617F pudieran deberse a las características propias de las poblaciones, como la etnia y las migraciones.<sup>3</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>7,9</sup> Para la detección de la mutación JAK2 se recomienda que los métodos moleculares de rutina tengan un nivel de sensibilidad entre 1-3%.<sup>9</sup> La sensibilidad de la técnica utilizada en nuestro estudio, PCR alelo-específica, varía alrededor de 1-5%,<sup>9</sup> lo que avala la confiabilidad de nuestros resultados.

En nuestro estudio, 11 (25%) pacientes con diagnóstico clínico de policitemia vera resultaron negativos para la mutación. Estos individuos probablemente podrían tener otras mutaciones asociadas con el gen JAK 2, como las presentes en el exón 12 o pudiera tratarse de otra forma de policitemia.<sup>6,8,10-12</sup>

Los pacientes con diagnóstico clínico de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria que fueron negativos a la mutación V617F pudieran tener otras mutaciones, como las presentes en el exón 9 del gen que codifica a la proteína calreticulina (CALR), o las presentes en el exón 10 del gen que codifica el receptor de la trombopoyetina (MPL),<sup>8,10-12</sup> lo que explicaría nuestro resultados.

Se sabe que las personas caucásicas tienen tasas de incidencia de estas mutaciones significativamente mayores comparadas con personas de ascendencia afroamericana, asiática o nativos americanos (2.12 vs 1.78, 1.38, 0.89;  $p < 0.05$ ).<sup>3</sup> Nuestros resultados muestran la existencia de la mutación en los pacientes con color de la piel blanco ( $n = 40$ , 71,4%) en mayor frecuencia, lo que pudiera deberse a que nuestra población tiene gran influencia española.

En cuanto a la edad, nuestros resultados también corresponden con lo reportado en la bibliografía, pues en la mayoría de los pacientes el inicio de la enfermedad ocurrió a partir de la edad de 50 años.<sup>2,21</sup>

Nuestro estudio evidenció que en una muestra casi igual de mujeres (n = 49) y hombres (n = 46) la existencia de la mutación JAK2V617F fue más frecuente en la población masculina. Esto pudiera deberse a que el mayor porcentaje de paciente positivos a la mutación correspondió a los que tenían policitemia vera, cuyo predominio de la enfermedad es en hombres.<sup>2,8</sup>

Asimismo, en el caso particular de los individuos con trombocitemia esencial el predominio fue en la población femenina.<sup>2,8</sup> De manera interesante, nuestro trabajo evidenció que, para este diagnóstico, la mutación predominó en mujeres.

## CONCLUSIÓN

La frecuencia de la mutación JAK2V617F en pacientes cubanos con policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria corresponde a la reportada en estudios similares en otros escenarios poblacionales.

## REFERENCIAS

- Baxter E, Scott LM, Campbell PJ, 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.
- Jiménez SI. Neoplasias mieloproliferativas. De la clínica a la biología molecular. *Acta Med Colomb* 2017;42:15-7.
- Martínez JL, Ramos CO, Santoyo A, et al. Implicaciones clínicas y de pronóstico de la mutación JAK2 V617F en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas. *Rev Hematol Mex* 2016;17:161-8.
- Heller PG. Biología molecular de las neoplasias mieloproliferativas crónicas: 10 años después del JAK2. *Hematología* 2015;19:40-4.
- Kerguelen AE. Utilidad de la cuantificación de la carga mutacional de JAK2V617F en neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph negativas clásicas [Tesis Doctoral]: Universidad Autónoma de Madrid; 2012.
- Remacha AF, Puget G, Nomdedéu JF, Estivill C, Sardá MP, Canals C. Valoración de la mutación V617F del gen JAK2 en síndromes mieloproliferativos crónicos con cromosoma Filadelfia negativo. *Med Clin (Barc)* 2006;127:601-4. DOI: 10.1157/13094416.
- Quintana S, Schoenfeld E, Di Gerónimo V, Martín N. Detección de la mutación V617F del gen JAK2 mediante análisis de disociación de alta resolución. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2014;48:447-55.
- Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J* 2017;129:667-79. doi: 10.1182/blood-2016-10-695940.
- Lev PR, Heller PG. Estudio molecular en neoplasias mieloproliferativas crónicas: mutación JAK2V617F. *Hematología* 2013;17:176-78.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J* 2018;8:15. doi: 10.1038/s41408-018-0054-y.
- 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 J* 2015;5:1-8. doi: 10.1038/bcj.2015.64.
- Alshemmari SH, Rajaan R, Ameen R, Al-Drees MA, Almo-sailleakh MR. JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2014;93:791-6. doi: 10.1007/s00277-013-1988-6.
- Abello V, Quintero G, Espinosa D, et al. Descripción de las características clínicas de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC). *Acta Med Colomb* 2017;42:35-41.
- Campoverde A, Oliveros W, Reyes I, 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.
- Wu Z, Zhang X, Xu X, et al. The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol* 2014;7:48. doi: 10.1186/s13045-014-0048-6.
- 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. doi: 10.3892/br.2017.977.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-90. DOI: 10.1056/NEJMoa051113.
- Payzin KB, Savasoglu K, Alacacioglu I, et al. JAK2 V617F Mutation status of 232 patients diagnosed with chronic myeloproliferative neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014 Dec;14(6):525-33. doi: 10.1016/j.clml.2014.02.013.

20. Vizmanos JL, Ormazábal C, Larráyoiz MJ, Cross NC, Calasanz MJ. JAK2 V617F mutation in classic chronic myeloproliferative diseases: a report on a series of 349 patients. *Leukemia* 2006;534-35. DOI: 10.1038/sj.leu.2404086.
21. Moulard O, Mehta J, Jon Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol* 2013;92:289-97. doi: 10.1111/ejh.12256.