

https://doi.org/10.24245/rev_hematol.v22i2.5576

Mutaciones en el gen *CALR* y su papel en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas

Mutations in *CALR* gene and its role in the diagnosis and prognosis of chronic myeloproliferative neoplasms.

Ricardo Morales-Herrejón,¹ Víctor Alfredo Pérez-Contreras,³ Carlos Cortés-Penagos^{2,3}

Resumen

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NPMC) representan un grupo de enfermedades genéticas caracterizadas por mutaciones en los genes JAK2 y MPL. La identificación reciente de mutaciones en el gen *CALR* en casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria abre la posibilidad de incluir nuevos marcadores para establecer el diagnóstico y pronóstico de estos padecimientos. Este artículo describe las características de las mutaciones en el gen *CALR* y su relación con la aparición de las neoplasias mieloproliferativas crónicas. Las mutaciones del gen *CALR* asociadas con casos de neoplasias mieloproliferativas crónicas ocurren predominantemente en el exón 9. Estas mutaciones, principalmente inserciones y delecciones, generan una nueva secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína. La eliminación de 52-pb (mutación tipo 1) y la inserción de 5-pb (mutación tipo 2) ocurren en el 80 al 90% de los casos estudiados. La modificación del extremo C-terminal se asocia fuertemente con su efecto oncogénico. La existencia de mutaciones en el gen *CALR* se ha relacionado con características clínicas distintivas y buen pronóstico. Asimismo, se ha sugerido que las mutaciones en *CALR* ocurren en la fase temprana de la aparición de las neoplasias atribuyéndole un papel conductor de la transformación.

PALABRAS CLAVE: Leucemia; neoplasias mieloproliferativas crónicas; mutación; proliferación.

Abstract

Myeloproliferative neoplasms represent a broad group of genetic disorders characterized by the presence of JAK2 and MPL mutations. Discovery of somatic mutations in calreticulin gene (*CALR*) in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis open up the possibility to include a new molecular marker to increase the diagnostic accuracy for these neoplasms. This paper describes the mutation profile of *CALR* and the relationship with the origin and prognosis impact of myeloproliferative neoplasms. All mutations in calreticulin gene (*CALR*) associated with myeloproliferative neoplasms occurs on exon 9. These mutations, classified as insertions and deletions, generate a new C-terminal amino acid sequence. Deletion of 52-bp (type 1 mutation) and insertion of 5-bp (type 2 mutation) are found in 80-90% of all reported cases. C-terminal modifications are suggested to drive the oncogenic pathway. The presence of mutations in calreticulin gene (*CALR*) have been related to clinical distinctive characteristics and good prognosis. *CALR* mutations appear early in myeloproliferative neoplasms and could potentially be used as transformation marker.

KEYWORDS: Leukemia; Myeloproliferative neoplasms; Mutation; Proliferation.

¹ División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez.

² Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

³ Laboratorios Mendel. Mendelab SA de CV, Morelia, Michoacán, México.

Recibido: abril 2021

Aceptado: mayo 2021

Correspondencia

Carlos Cortés Penagos
carlos.cortes@umich.mx

Este artículo debe citarse como:

Morales-Herrejón R, Pérez-Contreras VA, Cortés-Penagos C. Mutaciones en el gen *CALR* y su papel en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas. Hematol Méx. 2021 abril-junio; 22 (2): 88-96.

ANTECEDENTES

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas negativas al marcador cromosoma Filadelfia, que incluyen a la policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria, se caracterizan por la proliferación clonal descontrolada de células madre y progenitores hematopoyéticos, lo que resulta en el incremento del número de células maduras de uno o más de los linajes sanguíneos mieloídes.¹ La principal característica genética que define a estos padecimientos es la existencia de una mutación activadora de la proteína JAK2, que consiste en la sustitución del aminoácido valina (V) por fenilalanina (F) en la posición 617 de la secuencia proteica (V617F). Esta mutación, clasificada como *missense*, ocurre en aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes al momento del diagnóstico de alguna de las neoplasias mieloproliferativas crónicas.^{2,3} La proteína JAK2 pertenece a una familia de proteínas con actividad de cinasa que participan en la regulación de la proliferación de las células de la sangre a partir sus progenitores a través de la interacción con receptores de citocinas. La mutación JAK2V617F, identificada en 2005, genera una activación constitutiva del dominio cinasa de la proteína y, por tanto, un incremento en la fosforilación de sus sustratos, lo que se asocia con aumento en la respuesta inducida por las citocinas.⁴ Recientemente se identificaron otras mutaciones somáticas en pacientes negativos para la mutación JAK2V617F, tal es el caso de mutaciones *missense* en el exón 12 del mismo gen *JAK2*, así como en el gen *MPL* que codifica para el receptor de la trombopoyetina. Las mutaciones en *MPL* tienen lugar en el exón 10 que originan una sustitución de aminoácidos en la secuencia de la proteína, particularmente el triptófano (W) en la posición 515 y la serina (S) en la posición 505 (W515L; W515K; W515A; W515R; S505N). Las mutaciones en *MPL* se han reportado en el 5-10% de los casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria; sin embargo,

no se han identificado en casos de policitemia vera.⁵ Las mutaciones de *MPL* descritas generan una ganancia de función y conllevan a la activación del receptor en ausencia de la unión de la trombopoyetina y la consecuente señalización constitutiva de la vía proteínas JAK y reguladores de la transcripción (STAT).⁶

En 2013 dos estudios independientes demostraron una frecuencia alta de mutaciones en el gen que codifica para la proteína calreticulina (*CALR*) en casos de neoplasias mieloproliferativas crónicas. En el estudio de Nangalia y colaboradores se analizaron 151 pacientes identificándose, además de las mutaciones en los genes *JAK2* y *MPL*, mutaciones en el gen *CALR*. Estas mutaciones se detectaron en los pacientes que no mostraron mutaciones en *JAK2* o *MPL*. Las mutaciones identificadas incluyeron 19 variantes, todas ellas correspondientes a inserciones, delecciones o ambas, localizadas en el exón 9 del gen codificador. Todas las mutaciones generan un corrimiento del marco de lectura en +1 pares de bases modificando el extremo C terminal canónico de la proteína *CALR*.⁷ En este mismo estudio se ensayó el estado mutacional de *CALR* en pacientes con otras neoplasias hematológicas, así como otros tipos de cáncer, encontrándose mutaciones de *CALR* en el 8% de los casos de síndromes mielodisplásicos y en ningún caso en otras neoplasias.⁷

En el estudio de Klampfl y colaboradores (2013), se analizaron 1107 muestras de pacientes con alguna neoplasia mieloproliferativa crónica, y se observó que las mutaciones en el gen *CALR* solo estaban presentes en casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria, no así en pacientes con policitemia vera, determinando que esta mutación es excluyente con aquéllas en los genes *JAK2* y *MPL*.⁴ Entre los pacientes con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria negativos para mutaciones en *JAK2* y *MPL*, las mutaciones en *CALR* se identificaron en

un 67 y 88%, respectivamente. Estas mutaciones incluyeron un total de 36 diferentes variantes, todas ellas sobre el exón 9 de *CALR* y, de igual forma, correspondieron a mutaciones INDEL (inserción-delección).⁴ En este mismo trabajo se investigó la existencia de mutaciones en el gen *CALR* en otros tipos de neoplasias mieloides (leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia mielomonocítica crónica y anemia resistente con sideroblastos en anillo). Todos los casos analizados fueron negativos para mutaciones en *CALR* con excepción de tres pacientes con un diagnóstico de anemia resistente con sideroblastos en anillo (RARS).⁴ Hasta la fecha más de 50 diferentes tipos de INDELs se han descrito para el gen *CALR*.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE CALR

La proteína CALR fue identificada por primera vez en células de músculo esquelético por Ostwald y MacLennan en 1974, quienes, al caracterizar proteínas que se unían a calcio en el retículo sarcoplásmico, identificaron una proteína con alta afinidad por este ion que denominaron HABP (*high affinity binding protein*).⁸ Quince años después, y gracias a los avances en las técnicas moleculares, se clonó y caracterizó la secuencia de aminoácidos de HABP.⁹ La comparación de su secuencia con la de otras proteínas de unión a calcio reportadas hasta entonces en la bibliografía reveló que la secuencia era idéntica a las de calregulinas (CRP55, CaBP3, ERp60), así como a la proteína calsecuestrina.¹⁰ El nombre de “calreticulina” surge de un consenso que refleja su capacidad de unión al ion calcio y su localización particular en el retículo sarcoplásmico/ endoplásmico.^{10,11} El gen homólogo (*CALR*) se localiza en el cromosoma 19 (19p13.13) con una estructura de 9 exones en un total de 5891pb de longitud (**Figura 1**).¹² CALR madura es una proteína de 417 aminoácidos (46 kDa) que consta de tres dominios estructural y funcionalmente

diferentes. El primero es un dominio globular conservado N-terminal de unión a lectina (residuos 1-180), que consiste en una secuencia señal de retención en el retículo endoplásmico y que desempeña, además, un importante papel como chaperona y de unión a Zn²⁺.¹³ El dominio intermedio o dominio P (por su abundancia en el aminoácido prolina) [residuos 181-290] tiene alta afinidad, pero baja capacidad de sitios de unión para el ion Ca²⁺.¹³ Finalmente, el tercer y último dominio C-terminal (residuos 291-400) contiene múltiples sitios de unión a calcio, con baja afinidad, pero alta capacidad en contraste con el dominio P y está implicado en la homeostasis celular de este ion. La parte final del dominio C-terminal la constituye la secuencia señal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), implicada en la retención de CALR en el retículo endoplásmico (**Figura 1**). Esta secuencia de aminoácidos está presente en varias de las proteínas residentes del RE y permite la recuperación de las mismas desde el aparato de Golgi.^{12,13}

El Ca²⁺ desempeña un importante papel en las células como una molécula de señalización que influye en diversos procesos celulares. La mayoría del Ca²⁺ intracelular es almacenado en el lumen del retículo endoplásmico y cualquier modificación en el almacenamiento del mismo dentro de este compartimiento, así como cualquier obstrucción en su liberación, tienen el potencial de modificar diversas cascadas de señalización intracelular.¹⁴ CALR utiliza dos regiones como sitios de unión de Ca²⁺, uno de alta capacidad y baja afinidad compuesto de 43 residuos de aminoácidos ácidos con capacidad para unir 25 moles de Ca²⁺ por mol de proteína y otro sitio con alta afinidad y baja capacidad de unión (un mol de Ca²⁺ por mol de proteína), que se ubica en el dominio rico en prolina (dominio P).¹⁵ No es sorprendente que la sobreexpresión de calreticulina conduzca a mayores cantidades de Ca²⁺ en las reservas intracelulares, mientras que las células deficientes en

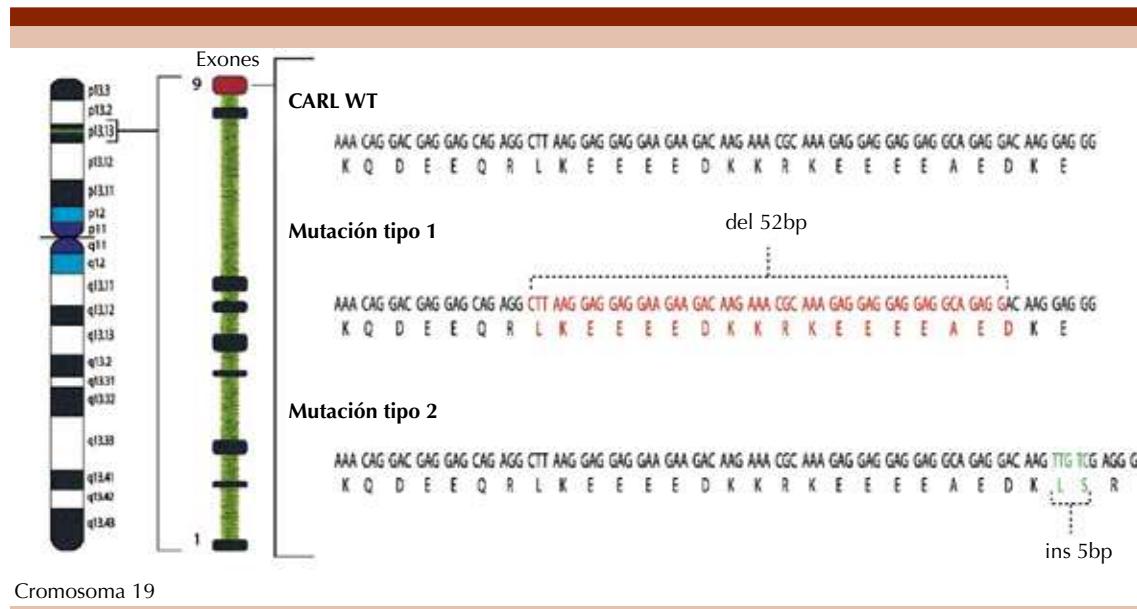


Figura 1. Estructura del gen *CALR* y mutaciones asociadas con neoplasias mieloproliferativas. El gen *CALR* se localiza en el cromosoma 19 (19p13.13) y está conformado por nueve exones. Las mutaciones más frecuentes en neoplasias mieloproliferativas (NMP) son las denominadas mutación tipo 1 o pérdida de 52 pb (rojo) y mutación tipo 2 o inserción de 5pb (verde). Los aminoácidos correspondientes a cada codón se presentan en código de una letra.

esta proteína presenten una capacidad reducida de almacenamiento de este ion y liberación lenta del mismo.¹⁶ Dentro del RE las proteínas nacientes interactúan con diversas chaperonas moleculares entre las que destacan calreticulina y calnexina.¹⁷ Ambas chaperonas constituyen el denominado ciclo calreticulina-calnexina que es responsable del correcto plegamiento de las nuevas glicoproteínas sintetizadas.¹⁶ Además de las funciones canónicas relacionadas con el retículo endoplásmico, *CALR* se localiza en el citosol, núcleo, así como en la superficie celular y también extracelularmente, donde cumple múltiples funciones como mediador crítico de procesos fisiológicos y patológicos, como la respuesta inmunitaria, modulación de vías de señalización, adhesión celular, proliferación, apoptosis y desarrollo embrionario, por nombrar algunos.¹⁶

MUTACIONES DE *CALR* EN LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS

Los primeros reportes de las mutaciones en el gen *CALR* en los casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria negativos a mutaciones en *JAK2* y *MPL*, mostraron un patrón llamativo de mutaciones somáticas. Todas las mutaciones encontradas sobre este gen corresponden a inserciones y delecciones, con más de 50 variantes distintas descritas hasta la fecha. Inicialmente se encontró que las mutaciones en *CALR* y *JAK2* eran mutuamente excluyentes; sin embargo, Wenyi y Zhongxin (2015) reportaron algunos casos donde coexisten ambas mutaciones y determinaron que la frecuencia de mutación mutua es inferior al 1%.¹⁸ Las mutaciones en *CALR* se encuentran aproximadamente en el 20-25% de

todos los pacientes con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria, lo que indica que *CALR* es el segundo gen más frecuentemente mutado en las neoplasias mieloproliferativas crónicas.¹⁹

Todas las mutaciones en *CALR* generan un cambio en el marco de lectura en el último exón del gen. Sin embargo, destacan por su frecuencia dos mutaciones que representan del 80 al 90% de los casos estudiados. La mutación tipo 1 que consiste en una eliminación (deleción) de 52-pb (c.1092_1143del; p. L367fs*46) y la mutación tipo 2 incluyen una inserción de 5-pb (c.1154_1155insTTGTC; pK385fs*47). **Figura 1**

La mayor parte de las mutaciones en *CALR* se muestran como heterocigotas, mientras que las mutaciones homocigotas son muy raras y en su mayor parte son inserciones de 5 pb (mutación tipo 2). Varios reportes indican que la mutación tipo 1 es más frecuente en mielofibrosis primaria en comparación con trombocitemia esencial.^{12,20} Todas las mutaciones de *CALR* que se han detectado provocan un desplazamiento en el marco de lectura de +1 y dan como resultado una nueva secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal que es común en todas las proteínas *CALR* mutantes.²¹ El alcance de las modificaciones C-terminal varía, pero todas las variantes comparten la pérdida de una secuencia de 27 aminoácidos con una ganancia concomitante de una nueva secuencia peptídica de 36 aminoácidos.⁷ Estas mutaciones resultan en la pérdida de la mayor parte del dominio ácido C-terminal, así como de la señal de retención KDEL. Según el tipo de mutación, las proteínas mutantes retienen cantidades variables de los aminoácidos cargados negativamente de la versión nativa. Con la delección de 52 pb (mutación tipo 1) se pierden casi todos los aminoácidos con carga negativa, mientras que con la inserción de 5 pb (mutación tipo 2) se retiene aproximadamente la mitad de los aminoácidos con carga negativa, lo que repercute finalmente en la unión y afinidad por el Ca²⁺.^{4,12} **Figura 2**

De esta manera, la disminución de la unión del Ca²⁺ y la pérdida del motivo de retención en el retículo endoplásmico KDEL son las principales consecuencias de las mutaciones sobre las cuales se estima puede mediar la acción patogénica en los pacientes que expresan *CALR* mutada.¹⁹

El análisis funcional de la mutación más frecuente de *CALR* (tipo 1; c.1092_1143del) reveló un aumento en el crecimiento de células dependiente e independiente de citocinas.²² Curiosamente, la evaluación de las cinasas y las actividades de señalización demostraron que las mutaciones de *CALR* generaban la activación de STAT5, similar a lo observado en las células portadoras de la mutación JAK2V617F. Asimismo, se han identificado mutaciones del gen *CALR* en células madre o progenitoras provenientes de pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas, que se mantienen presentes durante el curso de la enfermedad. En conjunto, estos datos sugieren que las mutaciones en el gen *CALR* representa un evento desencadenante de la enfermedad con un papel similar al de las mutaciones en JAK2 o MPL.^{2,4}

ASPECTOS CLÍNICOS ASOCIADOS CON LAS MUTACIONES DE *CALR*

El fenotipo clínico y pronóstico de los casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria sin mutación en *JAK2* se ha caracterizado ampliamente; esta población tiende a ser más joven, con recuentos plaquetarios más altos, reducidas tasas de trombosis y mejor supervivencia. Mucho de lo que se ha sabido sobre esta cohorte puede ahora atribuirse específicamente a la existencia de mutaciones en *CALR*. El efecto pronóstico de las mutaciones en calreticulina lo sugirieron Klampfl y colaboradores (2013), quienes encontraron que los pacientes con mielofibrosis primaria positivos para mutaciones en *CALR* tuvieron una supervivencia global significativamente mayor en comparación con cualquiera de los sujetos JAK2V617F y MPLW515 positivos,

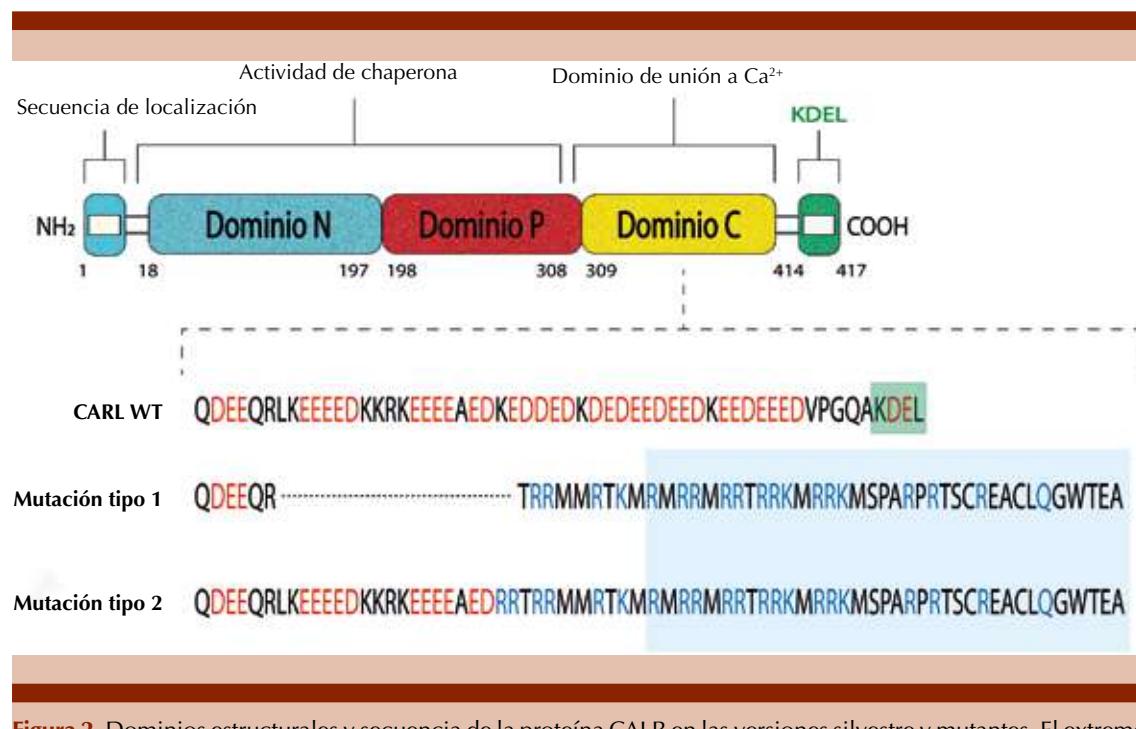


Figura 2. Dominios estructurales y secuencia de la proteína CALR en las versiones silvestre y mutantes. El extremo N contiene la secuencia de localización, los dominios N terminal (residuos 18-197) y el dominio intermedio rico en prolina o dominio P (residuos 198-308) están asociados con la actividad de chaperona. El dominio C terminal (residuos 309-417) promueve la unión con el ion Ca²⁺ y en la porción terminal presenta la secuencia KDEL (verde) implicada en la recuperación de la proteína desde el aparato de Golgi. Las mutaciones tipo 1 (eliminación de 52pb) y tipo 2 (inserción de 5pb) afectan al dominio C terminal, con la consecuente pérdida de la mayor parte de los aminoácidos ácidos (rojo), así como de la secuencia señal KDEL y la ganancia concomitante de una secuencia rica en aminoácidos básicos (azul).

esta observación también se reportó para los casos de trombocitemia esencial.^{12,23} Los pacientes con diagnóstico de trombocitemia esencial con mutación en *JAK2* o *CALR* son diferentes y tienen características biológicas y clínicas distintivas, incluso, pueden representar dos enfermedades diferentes.²⁴ Los estudios en trombocitemia esencial han demostrado que las mutaciones de *CALR* se asocian con una edad más joven, sexo masculino, concentraciones bajas de hemoglobina y un número de leucocitos y plaquetas más alto, así como menor probabilidad de eventos trombóticos.²⁵

Los pacientes con mielofibrosis primaria positivos para mutaciones de gen *CALR* muestran

características clínicas similares a los casos de trombocitemia esencial, así como mayor supervivencia en comparación con los pacientes con mielofibrosis primaria portadores de la mutación *JAK2V617F* o mutaciones en el exón 10 de *MPL*. En un estudio de 617 pacientes con mielofibrosis primaria, de los que 140 tuvieron alguna de las mutaciones en *CALR*, se encontró que aquéllos con una mutación tipo 1 tuvieron supervivencia global mayor en comparación con los que albergan la mutación *JAK2V617F*, mientras que no se observaron diferencias entre las mutaciones tipo 1 y 2 de *CALR*.²⁶ Cabe mencionar que, así como en muchas enfermedades existen mutaciones denominadas conductoras y mutaciones modificadoras o adicionales,

en las neoplasias mieloproliferativas crónicas muchas de estas mutaciones modificadoras se presentan en genes encargados de la regulación epigenética (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*).²⁷ En la mielofibrosis primaria ocurre un efecto sinérgico entre las mutaciones en *CALR* y *ASXL1* y se ha demostrado que en estos casos la supervivencia es mayor cuando se presenta *CALR+*, *ASXL1-* (media de 10.4 años) y menor en los casos *CALR-*, *ASXL1+* (media de 2.3 años). Sin embargo, los pacientes doble positivos o doble negativos tienen supervivencia similar con riesgo intermedio (media de 5.8 años).¹⁸

PAPEL DE LAS MUTACIONES EN *CALR* COMO PRECURSORAS DE LA TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA

Se ha sugerido que las mutaciones en *CALR* ocurren en la fase temprana de la aparición de las neoplasias mieloproliferativas crónicas; el análisis clonal ha mostrado que las mutaciones sobre este gen aparecen al comienzo de la enfermedad, lo que es consistente con su papel como mutación conductora.⁷ Las mutaciones en *CALR* pueden identificarse en los nichos donde residen las células madre hematopoyéticas y progenitoras, asignándole su valor como evento temprano en la patogénesis de las neoplasias mieloproliferativas crónicas.^{4,7} Una evidencia indirecta que sugiere que las alteraciones de *JAK2*, *MPL* y *CALR* son mutaciones conductoras en las neoplasias mieloproliferativas crónicas es el hecho de que estas mutaciones definen distintas afecciones dentro de la mielofibrosis primaria y muestran características clínicas y pronósticos distintivos y particulares.^{28,29} Además, la sobreexpresión de la mutación más frecuente de *CALR* (mutación tipo 1) causa un crecimiento independiente de citocinas *in vitro*, lo que apoya aún más su papel como mutación conductora.⁴

Debido a la exclusión mutua entre las mutaciones de *JAK2* y *MPL* con respecto a las mutaciones de *CALR* en los pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas, aunado a la similitud en cuanto a características clínicas y biológicas, puede establecerse que la proteína mutante *CALR* participa en la vía *MPL-JAK2*.²¹ Aunque el mecanismo subyacente no está del todo claro, se ha encontrado que la expresión de la mutación *CALR* induce la activación independiente de citocinas de *JAK2*, en las células Ba/F3.⁴ Se ha observado, además, que las células de la médula ósea de pacientes con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria que tienen mutaciones en *CALR* muestran la formación de colonias endógenas de megacariocitos; la presencia de estas colonias ha llevado a pensar que se produce la activación celular autónoma del receptor *MPL* o de alguna de las moléculas asociadas con su vía de señalización “río abajo”.³⁰ Estas observaciones han llevado a los investigadores a estudiar las propiedades oncogénicas de *CALR*, mediante la expresión de las mutaciones tipos 1 y 2 en líneas celulares donde la proliferación depende de la existencia de citocinas; los estudios resultantes han mostrado que las mutantes *CALR* inducen la proliferación celular independiente de citocinas en una manera dependiente de la expresión de *MPL*, pero independiente de la expresión de otra clase de receptores de citocinas tipo I.³¹ Este crecimiento independiente de citocinas también se encontró asociado con concentraciones elevadas de ERK 1/2 y STAT5 fosforilados.³¹ Estos datos implican que la mutante *CALR* activa las vías de señalización mediadas por *JAK2*, presumiblemente por la activación del receptor *MPL* en ausencia de la trombopoietina (TPO).²¹ Se ha visto que la expresión de la mutante *CALR* induce trombocitosis, pero no eritrocitosis o leucocitosis, lo que es consistente con los resultados de los estudios *in vitro* que señalan que *CALR*

mutada activa exclusivamente a MPL cuya expresión y función está limitada a los megacariocitos.

CONCLUSIONES

Las mutaciones en el gen que codifica para la proteína chaperona CALR asociada con el establecimiento y desarrollo de neoplasias mieloproliferativas crónicas, particularmente de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria, representan nuevos marcadores moleculares que permitirán ampliar el conocimiento de la fisiopatología de este grupo de enfermedades. En este sentido, podemos considerar a CALR un oncogen novedoso porque su función es distinta a lo establecido para los reguladores clásicos de la proliferación celular (receptores, cinasas de proteína, factores de transcripción, etc.). Sin embargo, y en concordancia con el origen común de las neoplasias mieloproliferativas crónicas negativas para el cromosoma Filadelfia, se ha demostrado la asociación de las versiones mutadas de CALR con la activación de la vía JAK-STAT a través de la interacción con el receptor MPL. Las mutaciones en el gen CALR corresponden a inserciones y ganancias (deleciones) de nucleótidos, las mutaciones tipo 1 (deleción de 52 pb) y tipo 2 (inserción de 5pb) son las mas comúnmente detectadas. Los casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria que muestran mutaciones en el gen CALR son clínicamente distintos de los portadores de mutaciones en JAK2 o MPL, por lo que constituyen afecciones únicas dentro de este conjunto de neoplasias. Hasta la fecha no se ha podido establecer una diferencia en el valor pronóstico entre los dos tipos de mutaciones para los casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria; sin embargo, los reportes más recientes indican que estas mutaciones determinan un pronóstico favorable comparado con lo establecido para las mutaciones JAK2 y MPL. El papel de CALR como marcador pronóstico y posible blanco terapéutico de las neoplasias mieloproliferativas crónicas aún se está escribiendo.

REFERENCIAS

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011; 117 (19): 5019-5032. doi. 10.1182/blood-2011-01-293050.
2. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352 (17): 1779-1790. doi. 10.1056/NEJMoa051113.
3. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative neoplasms. A contemporary review. *JAMA Oncology* 2015; 1 (1): 97-105. doi. 10.1001/jamaoncol.2015.89.
4. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan A, Nivarthi H, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369 (25): 2379-2390. doi. 10.1056/NEJMoa1311347.
5. Jones A, Cross N, White H. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica* 2008; 93 (10): 1560-1564. doi. 10.3324/haematol.12883.
6. Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL. Detection of MPL mutations by a novel allele-specific PCR-based strategy. *J Mol Diag* 2013; 15 (6): 810-818. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.07.006.
7. Nangalia J, Massie C, Baxter E, Nice F, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; 369 (25): 2391-2405. doi. 10.1056/NEJMoa1312542.
8. Ostwald TJ, MacLennan DH. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1974; 249 (3): 974-979.
9. Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, et al. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989; 264 (36): 21522-21528.
10. Michalak M, Milner RE, Burns K, Opas M. Calreticulin. *Biochem J* 1992; 285 (3): 681-692.
11. Smith M, Koch G. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J* 1989; 8 (12): 3581-3586.
12. Guglielmelli P, Nangalia J, Green A, Vannucchi A. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: hidden behind the reticulum. *Am J Hematol* 2014; 89 (5): 453-456. doi. 10.1002/ajh.23678.
13. Sun C, Zhang S, Li J. Calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms without Janus kinase 2 mutations. *Leuk Lymph* 2014; 56 (6): 1593-1598. doi. 10.3109/10428194.2014.953153.
14. Greber UF, Gerace L. Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. *J Cell Biol* 1995; 128 (1): 5-14. doi. 10.1083/jcb.128.1.5.

15. Barsh S, Michalak M. Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J Biol Chem* 1991; 266 (32): 21458-21465.
16. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LL, et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009; 417 (3): 651-666. doi. 10.1042/BJ20081847.
17. Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Inv Rev Cytol* 2005; 245: 91-121. doi. 10.1016/S0074-7696(05)45004-4.
18. Wenyi L, Zhongxin Y. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms. *Stem Cell Investig* 2015; 2 (16): 1-10. doi. 10.3978/j.issn.2306-9759.2015.08.01.
19. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014; 123 (24): 3714-3719. doi. 10.1182/blood-2014-03-530865.
20. Ji-Hun J, Hwan-Tae L, Ja-Young S, Yiel-Hea S, et al. Screening PCR versus sanger sequencing: detection of CALR mutations in patients with thrombocytosis. *Ann Lab Med* 2016; 36 (4): 291-299. doi. 10.3343/alm.2016.36.4.291.
21. Araki M, Komatsu N. Novel molecular mechanism of cellular transformation by a mutant molecular chaperone in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Science* 2017; 108 (10): 1907-1912. doi. 10.1111/cas.13327.
22. Chih-Cheng C, Jyh-Pyng G, Chou HJ, You JY, et al. Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 2014; 93 (12): 2029-2036. doi. 10.1007/s00277-014-2151-8.
23. Tefferi A, Wassie E, Guglielmelli P, Gangat N, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027. *Am J Hematol* 2014; 89 (8):E121-124. doi. 10.1002/ajh.23743.
24. Rumi E, Pietra D, Ferrett V, Klampfl T, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014; 123 (10): 1544-1551. doi. 10.1182/blood-2013-11-539098.
25. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014; 123 (10): 1552-1555. doi. 10.1182/blood-2013-11-538983.
26. Guglielmelli P, Rotunno G, Fanelli T, Pacilli A, et al. Validation of the differential prognostic impact of type 1/type 1-like versus type 2/type 2-like CALR mutations in myelofibrosis. *Blood Cancer J* 2015; 5 (10): 1-5. doi. 10.1038/bcj.2015.90.
27. Shih A, Abdel-Wahab O, Patel J, Levine R. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12 (9): 599-612. doi. 10.1038/nrc3343.
28. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014; 124 (7): 1062-1069. doi. 10.1182/blood-2014-05-578435.
29. Shivarov V, Ivanova M, Tiu R. Mutated calreticulin retains structurally disordered C terminus that cannot bind Ca²⁺: some mechanistic and therapeutic implications. *Blood Cancer J* 2014; 4 (2): 185-190. doi. 10.1038/bcj.2014.7.
30. Mondet J, Park JH, Menard A, Marzac C, et al. Endogenous megakaryocytic colonies underline association between megakaryocytes and calreticulin mutations in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2015; 100 (5): 1176-1178. doi. 10.3324/haematol.2014.118927.
31. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016; 127 (10): 1307-1316. doi. 10.1182/blood-2015-09-671172.