



Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Doctor Ignacio Chávez"

División de estudios de posgrado



"Estudio de la incidencia de mutaciones en el gen DNMT3A en las
neoplasias mieloproliferativas crónicas y su asociación con los
marcadores moleculares CALR, MPL y JAK2"

Tesis para obtener el grado de:
Maestro en ciencias de la Salud

Presenta:

Químico Farmacobiólogo
Ricardo Morales Herrejón

Dirección de tesis:

D.C (Biología Molecular): Carlos Cortés Penagos

Co-asesor: M.C Víctor Alfredo Pérez Contreras

Morelia, Michoacán

México

Agosto 2020

La Maestría en Ciencias de la Salud
de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Conacyt

El estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Recibió beca del Conacyt
durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud
Registro de becario: 702772
CVU: 890670

Dirección de tesis

Doctor en ciencias (Biología Celular)

Carlos Cortes Penagos

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

RESUMEN

“Estudio de la incidencia de mutaciones en el gen DNMT3A en las neoplasias mieloproliferativas crónicas y su asociación con los marcadores moleculares CALR, MPL y JAK2”

Introducción. Las NMPC son trastornos que se caracterizan por una proliferación y sobreproducción descontrolada de una o más de las líneas celulares mieloides, cuyo origen está relacionado con mutaciones genéticas y alteraciones cromosómicas que contribuyen a su desarrollo. La mutación *JAK2 V617F*, junto con las mutaciones en los genes *CALR* y *MPL*, constituyen los principales marcadores moleculares pronósticos y diagnósticos de las NMPC. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de las mutaciones en el gen *DNMT3A*, (epigenética), en las NMPC, dado que mutaciones en este gen se han encontrado en los estadios iniciales de aparición y relacionado en la progresión y evolución de estas neoplasias hacia LMA. **Objetivo general:** Analizar la frecuencia y los tipos de mutaciones que se presentan en los genes *CALR*, *MPL* y *DNMT3A* para los casos de NMPC y LMA en una muestra de la población mexicana. **Materiales y métodos:** Mediante el consentimiento informado se realizó la recolección de muestras de sangre periférica y/o medula ósea con diagnóstico de NMPC y LMA, se extrajo el DNA por medio de kit, se clasificaron las muestras con base en la presencia de la mutación *JAK2 V617K* y se les realizó PCR punto final y PCR alelo específica, seguido de electroforesis en gel de agarosa y finalmente se secuenciaron por el método de Sanger y se analizaron los electroferogramas. **Resultados:** Se recopilaron un total de 49 muestras, (35 *JAK2 V617F* -, 11 *JAK2 V617F* + y 3 presuntivas de LMA), de estas solo el grupo *JAK2 V617F* – resulto positivo a las mutaciones de *CALR* y *MPL*, con 7 y 2 muestras positivas respectivamente. Para el caso de *DNMT3A* las muestras seleccionadas resultaron todas negativas a las mutaciones R882 y solo se encontró una mutación sinónima no reportada en la literatura. **Conclusión:** los tipos y la frecuencia de mutaciones en los genes *CALR* y *MPL* en los casos de NMPC en la población mexicana coincide con lo reportado en otras poblaciones y las mutaciones R882 de *DNMT3A* no coexisten con mutaciones en *JAK2*, *CALR* y *MPL* en las fases bien establecidas de estas neoplasias.

Palabras clave: NMPC, mutación, gen, DNMT3A, secuenciación, pronóstico, diagnóstico

"Study of the incidence of mutations in the DNMT3A gene in chronic myeloproliferative neoplasms and its association with the molecular markers CALR, MPL and JAK2"

Introduction. NMPCs are disorders characterized by uncontrolled proliferation and overproduction of one or more of the myeloid cell lines, the origin of which is related to genetic mutations and chromosomal alterations that contribute to their development. The *JAK2 V617F* mutation, together with the mutations in the *CALR* and *MPL* genes, constitute the main prognostic and diagnostic molecular markers of NMPCs. In recent years, the importance of mutations in the *DNMT3A* gene, (epigenetics), in NMPCs has been shown, since mutations in this gene have been found in the initial stages of appearance and related to the progression and evolution of these neoplasms towards AML. **Course objective:** To analyze the frequency and types of mutations that occur in the *CALR*, *MPL* and *DNMT3A* genes for NMPC and AML cases in a sample from the Mexican population. **Materials and methods:** By means of informed consent, peripheral blood and / or bone marrow samples were collected with a diagnosis of NMPC and AML, DNA was extracted using a kit, and samples were classified based on the presence of the mutation *JAK2 V617K* and endpoint PCR and allele-specific PCR were performed, followed by agarose gel electrophoresis and finally they were sequenced by the Sanger method and the electropherograms were analyzed. **Results:** A total of 49 samples were collected, (35 *JAK2 V617F* -, 11 *JAK2 V617F* + and 3 presumptive AML), of these only the *JAK2 V617F*- group was positive for the *CALR* and *MPL* mutations, with 7 and 2 samples positive respectively. In the case of *DNMT3A*, the selected samples were all negative for R882 mutations and only one synonymous mutation was found that was not reported in the literature. **Conclusion:** the types and frequency of mutations in the *CALR* and *MPL* genes in the cases of NMPC in the Mexican population coincide with that reported in other populations and the R882 mutations of *DNMT3A* do not coexist with mutations in *JAK2*, *CALR* and *MPL* in the phases well established of these neoplasms.

Key words: NMPC, mutation, gene, DNMT3A, sequencing, prognosis, diagnosis.

Abreviaturas

EPO	Eritropoyetina
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HEM	Hematopoyesis extramedular
IL	Interleucina
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
MK	Megacariocitos
MK Post-PV	Mielo fibrosis post Policitemia Vera
MFP	Mielofibrosis primaria
MO	Médula ósea
NMPC	Neoplasias Mieloproliferativas crónicas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PV	Policitemia Vera
RE	Retículo endoplásmico
SMD	Síndrome Mielodisplasico
TE	Trombocitosis Esencial
TPO	Trombopoyetina

Índice

1.- Introducción	1
2.- Marco teórico	4
2.1.- Neoplasias Mieloproliferativas crónicas y leucemia mieloide aguda.....	4
2.3- Aspectos y alteraciones moleculares de las neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas: Policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis primaria	10
2.4.- La epigenética en las neoplasias mieloproliferativas crónicas	20
2.5- Evolución clonal de las Neoplasias mieloproliferativas crónicas	21
2.6.- Familia de las DNA Metiltransferasas	22
2.7- mutaciones del gen DNMT3A y su impacto en la transformación fibrótica y leucémica en las NMPC	24
3.- Justificación	27
4.- Hipótesis	30
5.- Objetivo General	30
5.- Objetivos específicos	30
6.- Estrategia	31
7.- Materiales y Métodos	32
8.- Resultados	36
9.- Discusión general	59
10.- Resumen de resultados	63
11.- conclusión	64
12.- Perspectiva	64
13.- Bibliografía	65

Índice de tablas

Tabla 1.- Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016	5
Tabla 2.- NMPCs clásicas negativas, características clínicas morfológicas y moleculares ..	11
Tabla 3.- Secuencia, longitud de amplificado y principales características de los cebadores.....	36
Tabla 4.- Recopilación de las muestras JAK2 V617F -, se indica clave de muestra, diagnostico presuntivo y estudios adicionales de cariotipo y del gen de fusión BCR-ABL, para algunas de las mismas	44
Tabla 5.- Recopilación de las muestras JAK2 V617F +, se indica clave de muestra, diagnostico presuntivo y estudios adicionales de cariotipo y del gen de fusión BCR-ABL, para algunas de las mismas	45
Tabla 6.- Recopilación de las muestras presuntivas de LMA, se indica clave de muestra, diagnostico presuntivo y estudios adicionales	45
Tabla 7.- Resultados de los análisis para la detección de las mutaciones tipo I y II de CALR de las muestras JAK2 V617F -	47
Tabla 8.- Resultados de los análisis para la detección de las mutaciones tipo I y II de CALR de las muestras JAK2 V617F +	48
Tabla 9.- Características de las muestras positivas a las mutaciones tipo I y II de CALR .	48
Tabla 10.- Resultados de los análisis para las mutaciones W515K y W515L de MPL de las muestras JAK2 V617F - y CALR -	52
Tabla 11.- Características de las muestras positivas a las mutaciones tipo I y II de CALR	52
Tabla 12.- Resultados de los análisis para las mutaciones R882 del gen DNMT3 en los grupos de muestras: CALR +, MPL +, JAK2 V617F +, muestras triple negativas y con diagnóstico presuntivo de LMA	56
Tabla 13.- Resumen de resultados de las muestras positivas a mutaciones de CALR, MPL y DNMT3A, todas pertenecientes al grupo JAK2 V617F -	59

Índice de figuras

Figuras 1, 2 y 3.- Prueba de la funcionalidad de los cebadores para la amplificación de los exones 9, 10 y 23 de los genes CALR, MPL y DNMT3A	39
Figura 4.- Análisis electroforético de todas las muestras positivas para las mutaciones tipo I y II de CALR	46
Figura 5.- Análisis electroforético de las muestras JAK2 V617F – y CALR –, para las mutaciones W515K y W515L de MPL	51
Figura 6.- Imágenes de referencia para las mutaciones de DNMT3A	54
Figura 7.- Electroferogramas de regiones del exón 23 de DNMT3A	55

1.- Introducción

La hematopoyesis es un proceso ordenado y continuo por el cual las células madre hematopoyéticas pluripotentes de la medula ósea dan lugar a todo el conjunto de células que pueblan la sangre y los sistemas linfáticos (Spivak, 2010). Dado que una sola célula madre hematopoyética pluripotente puede dar lugar a todos los tipos de células presentes en la sangre y en los vasos linfáticos, la hematopoyesis es por definición un proceso clonal; más específicamente, este proceso es fundamentalmente policlonal debido a que varias células madre hematopoyéticas pluripotentes están produciendo distinta progenie en todo momento (eritrocitos, linfocitos, granulocitos, plaquetas y monocitos) (Heller, 2015).

Por el contrario, monoclonalidad es el sello de los trastornos mieloproliferativos y define su naturaleza maligna. Por razones aún no totalmente delucidadas, cuando ocurre la transformación de una célula madre hematopoyética pluripotencial, esta adquiere una mayor supervivencia y proliferación en contraste con sus contrapartes normales. De tal forma, que finalmente, sólo la progenie de la célula transformada reside o invade la sangre y la medula ósea (Spivak, 2010). El término neoplasia se utiliza en medicina para designar una masa anormal de tejido. Se produce porque las células que lo constituyen se multiplican a un ritmo superior a lo normal. Las neoplasias pueden ser benignas cuando se extienden solo localmente y malignas cuando se comportan de forma agresiva, comprimen los tejidos próximos y se diseminan a distancia. Neoplasia maligna y cáncer son dos expresiones con el mismo significado y en el lenguaje médico habitual es frecuente emplear el término neoplasia maligna como sustituto de la palabra cáncer (Bellosillo & Rozman, 2016).

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC), son trastornos clonales de la hematopoyesis caracterizados por la proliferación excesiva, acumulación y

expansión en la medula ósea de una o más de las líneas celulares mieloides, (eritrocitos, plaquetas, granulocitos y monocitos), sin alteraciones en la diferenciación y maduración de las mismas. Las más relevantes clínicamente son la leucemia mieloide crónica (LMC) y las neoplasias mieloproliferativas crónicas filadelfia negativas: Policitemia vera (PV), con una incidencia anual de 0.5 a 1.5/100.000 personas con una edad media de diagnóstico de 67 años, con igual distribución entre ambos sexos; Trombocitemia esencial (TE), con una incidencia anual de 0.21-2.27 /100.000 personas, la mayoría de los casos se diagnostican entre los 50 a 60 años de edad, sin predilección por algún sexo y Mielofibrosis primaria (MFP), con una incidencia anual de 0.4–1.4/100.000 habitantes con una media de edad entre los 60 y 70 años, de igual forma con una distribución similar en mujeres y hombres (Heller, Kornblitt, & Larripa, 2017). Se sabe que la pamielosis o aumento descontrolado en la proliferación de células y progenitores hematopoyéticos mieloides, que se produce en estos padecimientos, es debida a la presencia de mutaciones y alteraciones cromosómicas características en tales neoplasias, que se presentan de manera recurrente y que constituyen por lo tanto importantes marcadores moleculares que ayudan a caracterizar a estos tipos de cáncer (Heller et al., 2017).

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas negativas (PV, TE y MFP), se caracterizan por la presencia frecuente de la mutación *JAK2 V617F*, descubierta en el año 2005 y que provoca una activación constitutiva de la vía de transducción de señales JAK-STAT, lo que promueve una proliferación descontrolada de alguno de los linajes mieloides (McLornan, Percy & McMullin, 2006). El descubrimiento de la mutación *JAK2 V617F*, abrió una nueva era en la comprensión, pronóstico, diagnóstico y tratamiento de las neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas (NMPC) a partir de la cual, nuevas mutaciones somáticas han sido detectadas, como alteraciones en los genes *MPL* y *CALR*, que fungen al igual que las mutaciones de *JAK2* como

mutaciones conductoras, y también en genes involucrados en la regulación epigenética, entre los que destacan *TET2*, *DNMT3A* e *IDH1/2*.

Finalmente, se conoce que alteraciones epigenéticas en las NMPC se presentan de manera bastante frecuente; concretamente para el caso del gen *DNMT3A* que codifica para la enzima metiltransferasa homónima, se han descubierto importantes mutaciones que alteran la actividad catalítica de la enzima y consecuentemente, también el patrón de metilación del DNA. Se ha reportado además que las mutaciones de *DNMT3A* se presentan en los estadios iniciales de las NMPC así como también en los casos de evolución a mielofibrosis y LMA, tanto de Novo como secundaria, lo que sugiere que puede estar implicado en la transformación leucémica; sin embargo, esto se desconoce hasta el momento.

2.- Marco teórico

2.1.-Neoplasias Mieloproliferativas crónicas y leucemia mieloide aguda

Las neoplasias mieloides incluyen a varias entidades patológicas que difieren en cuanto a las células afectadas (eritrocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, mastocitos y plaquetas), la diferenciación y estado de maduración de las mismas, diferentes mutaciones somáticas, alteraciones citogenéticas y características clínicas. Dentro de las neoplasias mieloides, la leucemia mieloide crónica (LMC), las neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas: Policitemia Vera, Trombocitemia esencial y Mielofibrosis primaria (PV, TE y MF), síndrome mielodisplásico (SMD) y la leucemia mieloide aguda (LMA), figuran entre las de mayor importancia, por ser las más frecuentes (Shih, Abdel, Patel & Levine, 2012). Estas enfermedades afectan en su mayoría a las personas adultas y para el caso de la LMA, representan el 3% de todas las neoplasias malignas en ambos sexos (Kundranda, Tibes & Mesa, 2012).

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas son consideradas como cánceres raros debido a que su incidencia es baja; aproximadamente 6 personas entre cada 100,000 (Rumi & Cazzola, 2017). La clasificación actualmente más aceptada y utilizada para las neoplasias mieloproliferativas crónicas es la de la Organización Mundial de la Salud del 2016, basada en criterios anatomopatológicos de médula ósea (MO) y criterios moleculares, siendo indispensable la identificación tanto del cromosoma filadelfia en la LMC y mutaciones en los genes JAK2, MPL y CALR para las NMPC, (Heller, 2015). Las neoplasias mieloproliferativas incluyen las siguientes entidades: leucemia mieloide crónica BCR-ABL positiva (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), conociéndose como neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas (NMPC), que son las más frecuentes y representativas; sin embargo, existen otras menos comunes que abarcan la

leucemia neutrofílica crónica (LNC), leucemia eosinofílica crónica (LEC), mastocitosis y las neoplasias mieloproliferativas inclasificables, véase la tabla 1 (Bellosillo & Rozman, 2016).

Tabla 1: Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016

Leucemia Mieloide Crónica, <i>BCR-ABL1</i> positiva (LMC)
Policitemia Vera (PV)
Mielofibrosis Primaria (MFP)
Trombocitemia Esencial (TE)
Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC)
Leucemia Eosinofílica Crónica (LES)
Mastocitosis
Neoplasias Mieloproliferativas inclasificables

Para el caso de la leucemia mieloide crónica, se conoce que la principal anormalidad genética asociada es la presencia del cromosoma Filadelfia, descubierta en el año 1960 por los científicos Peter Nowell y David Hungerford (Sawyers, 1999). En el año 1973, Janet Rowley identificó la translocación genética como el origen de la anormalidad (Quintás-Cardama & Cortes, 2008). Esta anormalidad afecta a los cromosomas 9 y 22; el 90 por ciento de los enfermos de leucemia mieloide crónica la presenta, mientras el resto de los afectados padecen otras translocaciones que afectan a otro u otros cromosomas de la misma forma que sucede con los cromosomas 9 y 22. El defecto genético del cromosoma Filadelfia consiste en un fenómeno conocido como translocación. Partes de los dos cromosomas, el 9 y el 22 (translocación 9-22), intercambian sus posiciones; dando como resultado el gen de fusión BCR-ABL, que codifica para la proteína homónima, que es una enzima

tirosinquinasa. La transcripción del BCR-ABL permanece activa continuamente, sin necesidad de ser activado por otras proteínas mensajeras; este a su vez, activa un número de proteínas y enzimas controladoras del ciclo de división celular e inhibe la reparación del ADN, causando la inestabilidad del genoma y finalmente la aparición de esta leucemia (Quintás-Cardama & Cortes, 2008).

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC), antes conocidas como síndromes mieloproliferativos crónicos, son trastornos clónales que se caracterizan por la transformación clonal de una célula madre hematopoyética pluripotencial (teniendo esto como origen común), proliferación y sobreproducción de una o más de las líneas celulares mieloides sin la presencia de un estímulo definido y que está relacionado con ciertas mutaciones genómicas que contribuyen al desarrollo de tales padecimientos (Bellosillo & Rozman, 2016). La PV es una neoplasia de células progenitoras hemopoyéticas, con una proliferación celular trilineal, predominantemente de células progenitoras eritroides, con aumento de hematíes circulantes. Cursa generalmente con hemoglobina y hematocrito elevados en forma persistente, leucocitosis, trombocitosis, esplenomegalia, hepatomegalia y otros focos de hematopoyesis extramedular (HEM) (Bellosillo & Rozman, 2016). La TE es una neoplasia mieloproliferativa crónica, que compromete en forma primaria la línea de los megacariocitos de la médula ósea, caracterizada por una persistente trombocitosis e hiperplasia megacariocítica, en ausencia de eritrocitosis o leucoeritroblastosis. Tiene un curso clínico relativamente benigno, con una mayor frecuencia de complicaciones trombóticas (15-25%), también trastornos hemorrágicos y un aumento del riesgo de transformación a una neoplasia hematológica más severa como la MF-post TE (4-8% a 10 años) y menor frecuencia de evolución a SMD y LMA (Heller, 2017). La mielofibrosis primaria es una enfermedad clonal de la célula madre progenitora hematopoyética caracterizada por fibrosis progresiva de la médula ósea y el desarrollo de hematopoyesis

extramedular. Clásicamente evoluciona en etapas iniciando con una etapa proliferativa llegando al cuadro característico de anemia progresiva, elementos inmaduros mieloides y eritroides (leucoeritroblastosis) en sangre periférica (SP) y en algunos casos se presenta la transformación leucémica (Heller, 2017).

Por otro lado, la leucemia mieloide aguda representa del 15 al 20% de las leucemias agudas en niños y el 80% en adultos; el intervalo de incidencia es aproximadamente 1.5 por cada 100,000 en infantes menores de 1 año, decrece a 0.4 por cada 100,000 en niños de edades entre 5 y 9 años, posteriormente incrementa gradualmente hasta 25 por 100,000 en octogenarios aproximadamente (Campo, et al., 2011). Es un tipo de cáncer hematológico muy heterogéneo y complejo genéticamente, caracterizado por diversas anormalidades cromosómicas, genéticas y epigenéticas que alteran el crecimiento celular normal, promueven una proliferación descontrolada y diferenciación anormal o incompleta de las células madre y progenitoras mieloides, que finalmente alteran el proceso normal de maduración de los precursores mieloides, más específicamente del mieloblasto, que es un precursor inmaduro de la estirpe de los glóbulos blancos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos) (Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). En los últimos años, se han identificado varias mutaciones genéticas adquiridas y la desregulación de la expresión génica en este tipo de leucemia. Dentro del gran espectro de mutaciones encontradas podemos destacar las alteraciones recurrentes de los genes MLL, FLT3, NPM1, CEBPA Y RAS (Schlenk, et al., 2008).

Estas alteraciones parecen caer en dos grupos de complementación ampliamente definidos. Un grupo (clase I) comprende mutaciones que activan las vías de transducción de señales y, por lo tanto, aumentan la proliferación y/o la supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas. Las mutaciones que activan a los miembros de la familia del receptor tirosina quinasa FLT3 o RAS se

consideran mutaciones de clase I (Schlenk, et al., 2008). El otro grupo de complementación (clase II) comprende mutaciones que afectan los factores de transcripción o los componentes del complejo de coactivación transcripcional y causan una diferenciación deficiente. Sobre la base de sus funciones fisiológicas conocidas, las mutaciones en CEBPA, MLL y, posiblemente también, NPM1 caen en este grupo (Schlenk, et al., 2008).

En adición a la amplia variedad de mutaciones antes señaladas, los datos genéticos emergentes señalan que hay clases adicionales de mutaciones que comúnmente ocurren en pacientes con neoplasias mieloides. Los ejemplos más destacados son de recientes estudios genómicos que han identificado alteraciones somáticas en genes que codifican proteínas que se encargan de la regulación de la metilación del DNA y de las modificaciones postraduccionales de las histonas. Estos hallazgos han fortalecido la importancia de la desregulación epigenética en la patogénesis de los cánceres mieloides y, en particular, en la LMA. (Shih, Abdel, Patel & Levine, 2012). En concordancia con los datos genéticos que muestran que las mutaciones sobre los reguladores epigenéticos ocurren a la par con las mutaciones de clase I y II, para el caso de la Leucemia mieloide aguda, también se ha determinado que perturbaciones solas sobre estos genes son capaces de conferir la capacidad de auto renovación y conducir a la transformación maligna de los precursores mieloides. Los genes involucrados en la regulación epigenética que incluyen a: TET2, DNMT3A, ASXL1, IDH1/IDH2, IKZF1 y EZH2, sufren mutaciones recurrentes en los trastornos mieloides y recientemente, se ha demostrado que tienen una gran relevancia biológica, clínica, pronóstica, diagnóstica y terapéutica potencial en las leucemias (Gianina , 2016).

Como se comentó, la leucemia mieloide aguda representa una entidad patológica compleja, en el sentido de la gran cantidad de anormalidades genéticas que este tipo de cáncer presenta y, adicionalmente, por el hecho bien conocido de que esta

leucemia constituye la etapa final de evolución de otros tipos de neoplasias y leucemias entre las que se incluyen las neoplasias mieloprolifetivas crónicas y la leucemia mieloide crónica. El hecho inherente que subyace en lo antes comentado, es que tanto las NMPC y la LMC pueden progresar en diferentes estadios, para finalmente evolucionar a una fase más grave que es la LMA.

En esta evolución paulatina de las NMPC hacia LMA, se sabe que existen mutaciones que repercuten en mayor grado, están más relacionadas con dicha progresión y aparecen en los primeros estadios de estas neoplasias y por lo tanto representan mutaciones conductoras de tales padecimientos, definiéndose estas como aquellas mutaciones que les confieren a las células cancerígenas una ventaja fundamental de crecimiento, proliferación y supervivencia para su transformación neoplásica. Se diferencian de las “mutaciones pasajeras”, que aparecen tanto en células normales como en cancerosas y que no determinan necesariamente el desarrollo del cáncer. En este contexto destacan las mutaciones en el gen de regulación epigenética *DNMT3A* que codifica para una enzima metiltransferasa; se ha estimado que mutaciones sobre este gen aparecen en las etapas más tempranas de las NMPC y pueden ser de las más importantes en cuanto propicien la evolución de estos cánceres hematológicos.

De esta manera y para los propósitos del presente estudio, primero definiremos las principales características y mutaciones en las neoplasias mieloproliferativas crónicas, para posteriormente describir más a profundidad sobre la epigenética, *DNMT3A* y el rol de las mutaciones sobre este gen en las NMPC.

2.3- Aspectos y alteraciones moleculares de las neoplasias mieloproliferativas crónicas clásicas: Policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis primaria

Las lesiones o alteraciones genéticas responsables de los diversos trastornos mieloproliferativos crónicos incluyen translocaciones, inserciones, eliminaciones cromosómicas y mutaciones puntuales. Para el caso de las NMPC, estas alteraciones están representadas en su mayoría por mutaciones que ocurren principalmente sobre tres genes: *JAK2*, *MPL* y *CALR* (tabla 2); de esta manera, durante el desarrollo de estas neoplasias la célula madre hematopoyética o célula progenitora sufre una serie de mutaciones genéticas que modifican en algún punto su sistema de señalización celular (receptor-segundo mensajero-proteína efectora), teniendo como consecuencia cambios en la funcionalidad y expresión de proteínas que son clave en procesos como proliferación, muerte y diferenciación celular (Campo, et al., 2011). De esta manera, mutaciones sobre dichos genes constituyen importantes biomarcadores moleculares, que repercuten en los criterios de pronóstico diagnóstico y clasificación (Tefferi, & Pardanami, 2015).

Tabla 2. NMPCs clásicas negativas, características clínicas morfológicas y moleculares (Rumi & Cazzola, 2017).

Entidad	Características clínicas y morfológicas	Principales genes alterados	Relación entre genotipo y fenotipo y pronóstico clínico
PV	Eritrocitosis frecuente con trombocitosis. Presenta también hiper celularidad y una proliferación trilineal (pamnielosis)	-JAK2 (V617F) está presente en el 96% de los pacientes. -JAK2 mutaciones en el exón 12 en 4% de los pacientes (asociado a eritrocitosis aislada). -Pacientes sin mutaciones en JAK2 son muy raros	PV pacientes tienen un riesgo incrementado de trombosis. PV puede progresar a mielofibrosis y menos común a la fase blástica similar a LMA.
TE	Trombocitosis con proliferación de megacariocitos alargados	-JAK2 (V617F) en 60-65% de los pacientes. -CALR exón 9 indels en 20-25% de los pacientes. -MPL mutaciones en el exón 10 en 4-8% de los pacientes.	-TE involucra riesgo de trombosis y sangrado y puede progresar a neoplasias mieloides más agresivas. -JAK2 V617F mutación en TE involucra alto riesgo de trombosis y puede progresar a PV o mielofibrosis. - CALR mutación en TE involucra bajo riesgo de trombosis y alto riesgo de progresión a mielofibrosis.
MFP	Varias anormalidades en sangre periférica. -Proliferación granulocítica y megacariocítica en la medula ósea acompañado de fibrosis colágena o reticular en diversos grados. -Hematopoyesis extra medular en el hígado o en el bazo.	-JAK2 (V617F) en 60-65% de los pacientes. - CALR exón 9 indels en 25-30% de los pacientes. - MPL mutaciones en el exón 10 en 4-8% de los pacientes.	-MFP se asocia con la mayor carga asintomática y el peor pronóstico en las NMP con un riesgo variable de progresión a LMA. -CALR mutada se asocia con una supervivencia más larga en comparación con otros genotipos. -JKA2 V617F y MPL mutantes se presentan un peor pronóstico en comparación con CALR mutado en MFP.

El gen *JAK2* (gen Janus cinasa 2), localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (9p24) codifica para una proteína, también llamada JAK2 con actividad tirosina cinasa, proteína que desempeña un importante papel en el crecimiento, proliferación y en el control de la producción de células sanguíneas a partir de las células madre hematopoyéticas. Esta proteína cinasa forma parte de la vía de transducción de señales JAK-STAT que utilizan los receptores de citocinas tipo I como el receptor de la eritropoyetina (EPO), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) o la trombopoyetina (TPO) así como para la transducción de señal por muchos receptores de citoquinas, como los receptores de interleucinas (IL) -3, IL-5, y IL-6 (Heller, 2015).

En el año 2005, diversos grupos de investigación descubrieron la mutación *JAK2V617F*; esta mutación consiste en el cambio de una guanina por una timidina en el nucleótido 1849 que está localizado en el exón 14 del gen *JAK2* (McLornan, et al., 2006). Esta alteración resulta en el cambio del aminoácido 617 que en condiciones normales es una valina (V) por fenilalanina (F). Este aminoácido se localiza en el dominio pseudocinasa JH2 de la proteína JAK2 que tiene actividad inhibidora sobre el dominio cinasa. Como consecuencia de la mutación *JAK2V617F*, se produce una activación constitutiva de la proteína JAK2 en ausencia de la unión del ligando al receptor hematopoyético, lo que provoca una ganancia de función; es decir, una activación permanente de esta vía de transducción de señales (Bellosillo & Rozman, 2016).

Ya en el año 2008, la presencia de la mutación *JAK2V617F*, fue incorporada por la OMS como criterio diagnóstico mayor para policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP). La mutación *JAK2V617F* se detecta en el

90-95% de pacientes con PV, 60% de pacientes con TE y 60% de pacientes con MFP (Bellosillo & Rozman, 2016). Estudios posteriores al descubrimiento de la mutación *JAK2V617F*, identificaron mutaciones en el exón 12 del gen *JAK2* en pacientes con PV negativos para la mutación *JAK2V617F*. Éstas se detectan en 4% de los casos de PV y representan del 60-80% de las mutaciones en los casos de PV, *JAK2V617F*-negativas. Estas mutaciones consisten en cambios puntuales, deleciones o inserciones que afectan a la zona de unión entre los dominios SH2 y JH2 y producen un efecto similar al de la mutación *JAK2V617F*, esta alteración no ha sido detectada en casos de TE o de MFP ni en pacientes que ya cuentan con la mutación *JAK2V617F* (Scott, et al., 2007).

En el año 2013, dos estudios independientes demostraron una frecuencia alta de mutaciones en el gen que codifica para la proteína calreticulina en las NMPC. En el estudio de Nangalia, et al., 2013, se analizaron 151 pacientes con alguna neoplasia mieloproliferativa crónica, (PV, TE o MFP) y se identificaron además de las mutaciones en los genes *JAK2* y *MPL*, mutaciones en el gen *CALR*. Las mutaciones somáticas en el gen que codifica para la proteína calreticulina (*CALR*) fueron identificadas a partir de un grupo de pacientes que no presentaron mutaciones en *JAK2* o *MPL*. Las mutaciones identificadas incluyeron 19 variantes, todas ellas inserciones, deleciones o ambas, localizadas en el exón 9 del gen *CALR*. Estos cambios generan un corrimiento del marco de lectura en +1 pares de bases modificando el extremo C terminal canónico de la proteína CALR, (Nangalia, et al., 2013). Adicionalmente, el estatus mutacional de *CALR* se ensayó en pacientes con otras neoplasias hematológicas, así como otros tipos de cáncer, encontrándose mutaciones de *CALR* en 8% de los casos de síndromes mielodisplásicos y en ningún caso de otros tipos de cáncer (Nangalia, et al., 2013).

En el estudio de Klampfl, et al. 2013, se analizaron 1107 muestras de pacientes con alguna NMPC, observándose que las mutaciones de *CALR* no estaban presentes en los casos de PV, siendo exclusivos para los casos de TE y MFP y mutuamente excluyentes con mutaciones en *JAK2* y *MPL* (Klampfl, et al., 2013). Entre los pacientes con TE y MFP negativos para mutaciones en *JAK2* y *MPL*, las mutaciones en *CALR* fueron identificadas 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) (Klampfl, et al., 2013). En este mismo trabajo se investigó la presencia de mutaciones en el gen *CALR* en otros tipos de neoplasias mieloides (leucemia mieloide aguda - LMA, leucemia mieloide crónica - LMC, síndrome mielodisplásico - SMD, leucemia mielomonocítica crónica -LMMC y anemia refractaria con sideroblastos en anillo -RARS). La mayoría de los casos fueron negativos para mutaciones en *CALR* y estas solo se observaron en un total de 3 pacientes con un diagnóstico de RARS (Klampfl, et al., 2013). Hasta la fecha más de 50 diferentes tipos de indels han sido descritas para el gen *CALR*.

El gen *CALR* se encuentra localizado en el cromosoma 19p13.13 con una arquitectura de 9 exones en un total de 5891pb de longitud, (Guglielmelli, Nangalia, Green & Vannucchi, 2014). *CALR* madura es una proteína de 417 aminoácidos (46kDa) 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 al Zn^{2+} (Sun, Zhang, & Li, 2014). El dominio intermedio o dominio P (por su abundancia en el aminoácido prolina) (residuos 181-290), presenta una alta afinidad, pero una baja capacidad de sitios de unión para el Ca^{2+} (Sun, et al., 2014). 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 involucrado en la homeostasis celular de este ion. La parte final del dominio C-terminal la constituye la secuencia señal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) que está involucrada en la retención de CALR en el retículo endoplásmico; esta secuencia está presente en algunas de las proteínas residentes del RE y permite la recuperación de las mismas desde el aparato de Golgi hacia el RE (Sun, et al., 2014), (Guglielmelli, et al., 2014).

Dentro del RE las proteínas nacientes no plegadas aun, interactúan con diversas chaperonas moleculares y enzimas entre las que destacan calreticulina y calnexina, (Bedard, Szabo, Michalak & Opas, 2005), ambas chaperonas constituyen el denominado ciclo calreticulina/calnexina que es responsable del apropiado plegamiento de las nuevas glicoproteínas sintetizadas (Campo, et al., 2011). Además, como se comentó, CALR en el RE es responsable del control de la concentración de Ca^{2+} luminal, en donde el 50% de la concentración de este catión se asocia a esta proteína (Guglielmelli, 2014). Además de las funciones canónicas relacionadas con el retículo endoplásmico, CALR se encuentra en el citosol, núcleo, así como en la superficie celular y extracelularmente, donde cumple múltiples funciones como mediador crítico de procesos fisiológicos y patológicos como la respuesta inmune, modulación de vías transcripcionales, adhesión celular, proliferación, apoptosis y desarrollo embrionario por nombrar algunas, (Michalak, Groenendyk, Szabo, Gold, & Opas, 2009), MFP (Wenji & yu, 2015).

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 80-90% de los casos; la mutación tipo I que consiste en una eliminación de 52-pb, (c.1092_1143del; p. L367fs*46) y la mutación tipo II que

incluye una inserción de 5-pb (c.1154_1155insTTGTC, pK385fs*47), (Ji Hun, et al., 2016) (Sun et al., 2016).

Todas las mutaciones (indels) de *CALR* que han sido detectadas, provocan un desplazamiento en el marco de lectura de +1 y dan como resultado una nueva secuencia de aminoácidos que es común en todas las proteínas *CALR* mutantes en el extremo C-terminal (Araki & Komatsu, 2017). El alcance de las alteraciones C-terminales varía, pero todas las variantes mutadas comparten una pérdida de una secuencia de 27 aminoácidos con una ganancia concomitante de un nuevo péptido que consta de 36 aminoácidos (Nangalia, et al., 2013). Estas mutaciones dan como resultado la pérdida de la mayor parte del dominio ácido C-terminal, así como de la señal de retención KDEL (Lavi, 2014).

Las eliminaciones de 52 pb (mutación tipo I) eliminan casi todos los aminoácidos con carga negativa, mientras que las inserciones de 5 pb (mutación tipo II), retienen aproximadamente la mitad de los aminoácidos con carga negativa y esto repercute finalmente en la unión y afinidad por el Ca^{2+} (Guglielmelli, et al., 2014) (Klampfl, et al., 2013). De esta manera, estos dos trastornos en la perturbación de la unión del Ca^{2+} y la pérdida del motivo de retención en el retículo endoplásmico KDEL, son las principales consecuencias de las mutaciones y las que se estima puedan mediar sus acciones patogénicas en los pacientes que expresan *CALR* mutada (Cazzola & Kralovics, 2014).

La evaluación de las cinasas y las actividades de señalización demostraron que las mutaciones de *CALR* daban como resultado la activación de STAT5, similar a lo observado en aquellas células portadoras de la mutación JAK2V617F en las NMPCs. Además, se observaron mutaciones de *CALR* en células madre o progenitoras purificadas de pacientes con NMPCs y se mantuvieron estables durante el curso de las enfermedades. En conjunto, estos datos sugieren que las mutaciones de *CALR*

pueden representar un evento desencadenante de la enfermedad y desempeñan un papel esencial similar al de las mutaciones en JAK2 o MPL durante el desarrollo y la evolución de las NMPCs (Klampfl, et al., 2013), (Cheng , et al., 2014).

Varios estudios señalan que la mutante *CALR* activa las vías de señalización mediadas por JAK2, presumiblemente por la activación del receptor MPL en ausencia de la TPO (Araki & Komatsu, 2017). 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 (Araki, et al., 2016), (Mondet, et al., 2015).

El gen MPL (localizado en el cromosoma 1p34) incluye 12 exones y codifica para el receptor de la trombopoyetina (TPO), el cual pertenece a la familia de receptores homodiméricos de clase I (Hitchcock & Kaushansky, 2014). MPL juega un papel central en la regulación de la megacariopoyesis, al regular la producción de plaquetas en respuesta a la TPO; sin embargo, MPL también regula las células madre hematopoyéticas y el compartimento de las células progenitoras inmaduras. La TPO induce la quietud de las células madre hematopoyéticas y su supervivencia, manteniendo así su reservorio (Qian, et al., 2007), pero induce la proliferación de progenitores (Graaf & Metcalf, 2011). Este papel crucial se ilustra por el hecho de que la pérdida de la función de MPL o TPO en humanos conduce a una trombocitopenia profunda, que progresa a insuficiencia de la médula ósea (Seo, et al., 2017).

Desde un punto de vista estructural, MPL tiene tres dominios principales (Varghese, Defour, Pecquet & Constantinescu, 2017). El dominio extracelular está compuesto por dos módulos consecutivos de homología del receptor de citosina; el dominio transmembrana es necesario para la inserción del receptor en la membrana a través de una hélice α y es seguido por un dominio citosólico yuxtamembrana (también llamado dominio anfipático) (Staer, et al., 2006). El dominio intracelular es necesario para mediar la señalización a través de su unión a JAK2, siendo JAK2 esencial para la inducción de vías de señalización “rio abajo”. En cuanto a la expresión del receptor MPL en la superficie celular, se ha descrito que MPL se pre-asocia con JAK2 en el retículo endoplásmico y el complejo MPL/ JAK2 madura a través de su tráfico en el aparato de Golgi por sucesivas glucosilaciones en residuos de asparagina (N-glicosilación), para expresarse en la superficie celular como un receptor parcialmente predimerizado, aunque también se señala que MPL existe en la superficie celular como un monómero o un dímero inestable. En conjunto, la asociación MPL/JAK2 incrementa el tráfico molecular de MPL desde la membrana celular, localiza y estabiliza el receptor en la superficie celular (Royer, Staerk, Costuleanu, Courtoy & Constantinescu, 2005).

En cuanto a la activación de MPL, el receptor murino adopta una conformación de dímero preformada parcial, que requiere una rotación para la activación, mientras que el receptor humano se mantiene en forma monomérica o una forma dimérica muy inestable por la presencia de una histidina en el aminoácido 499 al comienzo del dominio transmembranal. La dimerización de los receptores también se evita tanto en humanos como en murinos por el motivo JM citosólico RWQFP, que ejerce una función similar en ambos receptores, (Royer, et al., 2005), (Leroy, et al., 2015). La TPO induce y estabiliza una

conformación dimérica activa de MPL entre las varias conformaciones potenciales activas (Staerk, et al., 2011). Estos cambios conformacionales reorientan los dos dominios anfipáticos e induce la asociación con las moléculas JAK2 más cercanas, las cuales pueden transfosforilarse e iniciar la cascada de señalización (Pecquet, et al., 2012).

Las mutaciones de MPL son relativamente raras en las NMPC y se restringen sólo a los casos de TE y MFP (2% y 8% respectivamente). Estas mutaciones son de ganancia de función, es decir, inducen la activación independiente de ligando de JAK2 y de las vías de señalización “rio abajo” en ausencia de su ligando natural, la TPO. Hay dos “puntos calientes mutacionales” en el exón 10 de MPL; las que conducen a las mutaciones en las posiciones de aminoácidos W515 y S505, localizados en el dominio anfipático o citosólico y el dominio transmembrana, respectivamente. Hay varias sustituciones del aminoácido W515 en las NMPC, pero las dos más frecuentes son las mutaciones que sustituyen la guanina por timina en la posición 1544 (G1544T) y las sustituciones de las bases TG por AA (TG1543_1544AA) en el exón 10 de MPL y que resultan en la sustitución del aminoácido triptófano por leucina (W515L) o lisina (W515K), respectivamente, y se encuentran en aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes que albergan mutaciones de MPL. Adicionalmente, también se encuentran las mutaciones W515A y W515R; sin embargo, estas son de mucha menor frecuencia (Takei, et al., 2014). De hecho, todas las sustituciones del aminoácido W515, excepto W515C y W515P, conducen a la activación de MPL en ausencia de la TPO y activan JAK2 (Takei, et al., 2014). Las mutaciones W515 suelen ser heterocigotas, pero se pueden encontrar mutaciones homocigotas en los casos de MFP. La mutación S505N también se puede encontrar en la MFP, pero es mucho menos frecuente que las mutaciones W515. Mutaciones tanto en W515 como S505N pueden ser germinales y son responsables de una trombocitosis hereditaria (Jones & Cross, 2013).

2.4.- La epigenética en las neoplasias mieloproliferativas crónicas

Recientemente, se han descrito mutaciones adicionales en un pequeño porcentaje de pacientes con NMP en diferentes genes que por su función podemos clasificar en (Bellosillo & Rozman, 2016):

- Genes implicados en señalización intracelular: LNK, CBL
- Genes implicados en regulación epigenética: TET2, ASXL1, IDH1/IDH2, IKZF1, EZH2, DNMT3A
- Genes implicados en el procesamiento del ARN mensajero (o splicing): SF3B1, SRSF2, U2AF1

Las mutaciones en estos genes se detectan en un porcentaje limitado de pacientes (máximo 20%) y su papel diagnóstico y potencial valor pronóstico está todavía por determinarse. La epigenética se define como el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de los genes sin una modificación en la secuencia del ADN. Establece la relación entre las influencias genéticas y ambientales que determinan un fenotipo (Shih, et al., 2012).

La epigenética se refiere al estudio de los factores que, sin corresponder a elementos de la genética clásica juegan un papel muy importante en la genética moderna interaccionando con estos. Los factores genéticos que son determinados por el ambiente celular en lugar de por la herencia, intervienen en la determinación de la ontogenia (etapas de desarrollo de un organismo, desde la fecundación del cigoto en la reproducción sexual hasta su senescencia, pasando por la forma adulta) y que igualmente interviene en la regulación heredable de la expresión génica sin cambio en la secuencia de nucleótidos. Se puede decir que la epigenética es el conjunto de reacciones químicas y demás procesos que modifican la actividad del ADN, pero sin alterar su secuencia (Gianina, 2016).

2.5- Evolución clonal de las Neoplasias mieloproliferativas crónicas

Cuando comienza el desarrollo del cáncer, una sola célula sufre una mutación que determina que la célula se divida a una velocidad anormalmente rápida. La célula prolifera y da lugar a un clon de células, cada una de las cuales posee la misma mutación. Debido a que las células del clon se dividen más rápidamente de lo normal, pronto superan el desarrollo de otras células.

Las mutaciones adicionales que surgen en el clon pueden aumentar aún más la capacidad de esas células para proliferar y las células que poseen estas mutaciones adicionales pronto se vuelven dominantes en el clon. Finalmente, pueden ser superadas por células que contienen aún más mutaciones que estimulan la proliferación. En este proceso, denominado evolución clonal, las células tumorales adquieren más mutaciones que les permiten tornarse cada vez más agresivas en sus propiedades proliferativas. La velocidad de la evolución clonal depende de la frecuencia con que surgen las nuevas mutaciones. Cualquier defecto genético que permita que surjan más mutaciones acelerará la progresión del cáncer. Como se comentó anteriormente, las NMPC son un grupo de desórdenes de las células madre hematopoyéticas caracterizadas por una proliferación aberrante y una tendencia incrementada de transformación leucémica. Se ha demostrado que después de la aparición de las mutaciones *JAK2 V617F*, *CALR* y *MPL*, que son las más frecuentes en estos padecimientos, las segundas más recurrentes observadas afectan a genes implicados en la regulación epigenética (*TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2* e *IDH1/2*) (Lundberg, et al., 2014).

Se ha descubierto además, que mutaciones en *TET2* y *DNMT3A* constituyen eventos genéticos tempranos previos a la adquisición de la mutación *JAK2 V617F*, mientras que las alteraciones en *ASXL1*, *EZH2* e *IDH1/2* son posteriores a *JAK2 V617F* (Lundberg, et al., 2014). En general, se sabe que uno de los indicadores más importantes en el pronóstico de los pacientes con alguna NMPC es el número de

mutaciones somáticas que ocurren en adición a JAK2, CALR y MPL. De esta manera, la presencia de dos o más mutaciones representa un mal pronóstico en donde el riesgo de progresión y evolución a LMA es elevado y aún más si las mutaciones adicionales son en genes de regulación epigenética (Lundberg, et al., 2014).

2.6.- Familia de las DNA Metiltransferasas

Muchos genomas contienen pequeñas cantidades de bases metiladas como C5-metilcitocina (5mC), N4-metilcitosina (4mC) y N6-metiladenina (6mA). En los genomas eucariotas, la mayoría de las marcas de metilación están presentes como 5mC y regularmente se encuentran en los islotes CpG de las regiones promotoras en el DNA (Lyko , 2018).

El genoma humano codifica para 5 DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L. DNMT1, DNMT3A y DNMT3B son como tal C5-metilcitocinas, DNMTs que catalizan la adición de grupos metilo al DNA genómico (Lyko , 2018). En contraste, DNMT2 y DNMT3L son miembros no canónicos de la familia, que no poseen actividad catalítica DNMT; sin embargo, ambas proteínas poseen una secuencia conservada y parecida a las verdaderas enzimas DNMTs y representan adaptaciones en la evolución de los genes DNMTs (Lyko , 2018).

2.6.1 Regulación de la actividad de las DNMTs

La actividad de las DNMTs puede ser modulada por el número de interacciones moleculares. Por ejemplo, DNMT3L una versión truncada de DNMT3, que carece de actividad catalítica y por lo cual no es una DNMT activa que, sin embargo, es un importante cofactor para la actividad enzimática de DNMT3A. De esta manera dos moléculas de DNMT3L y dos moléculas de DNMT3A pueden formar un complejo heterotetramérico en el cual las moléculas de DNMT3A están en el centro. Esta

formación incrementa la afinidad del complejo por el DNA, lo que resulta en una metilación más efectiva del mismo (Lyko , 2018).

Además de la regulación mediada por las interacciones, existen otras formas por las cuales las DNMTs median su actividad; dentro de estas, podemos mencionar las modificaciones post-transduccionales que sufren las DNMTs, como metilaciones, desmetilaciones y fosforilaciones, entre las más frecuentes. Se encuentra también la regulación por splicing alternativo como ocurre el caso de DNMT3B y la regulación mediada por la pérdida y duplicación de genes que se refiere a los cambios en el número de copias de los genes DNMTs y que desempeña un importante papel en la adaptación de la actividad de estas enzimas para los requerimientos específicos de cada especie (Lyko, 2018).

2.6.2 Funciones de las DNMTs

Los patrones de metilación del DNA son considerados como características clave en la programación epigenética de la célula y comprender la relevancia biológica de este proceso y sus efectos en la expresión génica son uno de los grandes campos de estudio en la actualidad. Las enzimas DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 de mamíferos proporcionan la base para el concepto más conocido de programación epigenética (Lyko, 2018). En este contexto, el DNA no metilado es metilado de novo por función de las enzimas DNMT3A que tienen una actividad ubicua y no selectiva, mientras que el mantenimiento del patrón de metilación en el embrión en desarrollo es mantenido por las DNMT1; Como tales, DNMT3 y DNMT1 constituyen la base mecánica para el establecimiento y mantenimiento post-replicativo de la información epigenética (Lyko , 2018).

Numerosos análisis han apoyado el papel de las enzimas DNMT en el silenciamiento transcripcional, principalmente a través de su capacidad para metilar regiones

promotoras y cambiar los estados de condensación de la cromatina. Adicionalmente, también se sabe que estas proteínas pueden participar en la activación de la transcripción debido a que se ha identificado que un gran número de factores de transcripción se unen preferentemente a secuencias diana metiladas (Lyko, 2018).

2.7- mutaciones del gen DNMT3A y su impacto en la transformación fibrótica y leucémica en las NMPC

Es bien conocido que las NMPC evolucionan conforme progresa la enfermedad y pasan por determinadas etapas. En el caso de la LMC, se sabe que existen 3 etapas: fase temprana o crónica, fase acelerada (intermedia) y fase blástica o leucémica que es propiamente la LMA. Igualmente, un porcentaje variable de pacientes con TE o PV evolucionan a mielofibrosis. La evolución a mielofibrosis en la TE se observa en un 0.8-9.3 % de los pacientes a los 10 años del diagnóstico y en el caso de la PV la transformación a mielofibrosis ocurre en un 16% de los casos a los 10 años y de un 34% a los 15 años de evolución de la enfermedad, pueden además progresar finalmente a LMA (Alvarez, Bellosillo, & Martínez, 2009). El reciente descubrimiento de mutaciones en genes implicados en la regulación epigenética en las NMPC y la elevada frecuencia con que se presentan conforme estos padecimientos progresan y ocurre la transformación leucémica, ha puesto de manifiesto su posible papel en esta evolución. Específicamente, mutaciones en genes que regulan la metilación del DNA se han reportado con una frecuencia relativamente elevada tanto para las NMPC y los casos de transformación fibrótica y blástica, los cuales abarcan principalmente *TET2*, *IDH1*, *IDH2* y *DNMT3A*, (Shih, et al., 2012,).

Se ha reportado que las mutaciones somáticas en el gen DNMT3A están asociadas de forma recurrente con las neoplasias mieloides con una frecuencia que varía entre las diferentes entidades. En adultos con leucemia mieloide aguda (LMA), las

mutaciones de DNMT3A se encuentran en 14 - 34% de los casos; 5 - 15% de los casos de síndromes mielodisplásico (SMD), 10% de los pacientes con leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), 5 - 7% de los pacientes con mielofibrosis primaria, 12% de los casos con mastocitosis sistémica y aproximadamente el 18% de los casos de leucemia linfoblástica aguda de células T. Aproximadamente, 2/3 de las mutaciones de DNMT3A ocurren en el codón R882 y son del tipo **missense**, En este tipo de mutación hay un cambio en una de las bases del DNA de forma que el triplete codifica para un aminoácido diferente del que debería, es decir, en esa posición de la proteína habrá un aminoácido incorrecto, lo que puede alterar más o menos la función de la proteína dependiendo de su localización e importancia (Shivarov, Ivanova, & Naumova, 2014).

No está claro si DNMT3A funciona como un oncogén o un supresor tumoral y se sugiere que las mutaciones R882 actúan por un mecanismo de ganancia de función, mientras que el resto de las mutaciones son principalmente cambios de marco de lectura o codones de parada prematura dispersos por todo el gen, lo que sugiere una pérdida de función. Sin embargo, en todos los casos las mutaciones son heterocigotas, lo que implica que la presencia del alelo tipo silvestre o nativo es necesario y que la proteína mutada podría actuar de forma dominante como negativa. Esta noción está respaldada por estudios *in vitro* que muestran una disminución de la actividad catalítica de DNMT3A mutada (Milosevic & Kralovics, 2013).

Se ha reportado que las mutaciones de DNMT3A acontecen en aproximadamente 10% de los pacientes con NMPC con una prevalencia más alta en la MFP y pacientes que progresaban a LMA (15% aproximadamente) en comparación con los casos de TE y PV (3 y 7%, respectivamente). Los pacientes que albergan mutaciones de DNMT3A a menudo portan mutaciones en IDH1 / 2, TET2, ASXL1 o JAK2. No está

claro cómo las mutaciones en este gen contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Un estudio de delección condicional del gen DNMT3A en el sistema hematopoyético de ratón mostró que se afecta la capacidad de auto renovación de las células madre hematopoyéticas (HSC) a largo plazo, causando su expansión mientras que altera su diferenciación sin el desarrollo de un fenotipo maligno, como lo demuestra un modelo de trasplante en serie (Challen, et al., 2011). La hipometilación y la regulación positiva de genes involucrados en la pluripotencia de las HSC en este modelo sugiere que DNMT3A juega un papel importante en el silenciamiento de las HSC, permitiendo así la diferenciación. Sin embargo, no se han estudiado los efectos sobre la expresión génica en pacientes portadores de mutaciones en DNMT3A, (Milosevic & Kralovics, 2013).

3.- Justificación

Los criterios diagnósticos para las NMPC establecidos por la OMS sufren cambios de forma constante conforme se profundiza más en el conocimiento de tales padecimientos. El descubrimiento de la mutación JAK2 V617F en el año 2005 y la alta frecuencia con que se presenta en las neoplasias mieloproliferativas crónicas, revolucionó la comprensión molecular, criterios pronósticos y diagnósticos de estos cánceres hematológicos, lo que conllevó a la implementación de nuevos esquemas terapéuticos; sin embargo, como se describió antes, existen los casos de NMPC que son negativos para la mutación JAK2 V617F y que posteriormente se encontró que estaban en su mayoría representados por mutaciones en los genes CALR y MPL. Debido al reciente descubrimiento de estos últimos marcadores moleculares, especialmente CALR, y a que el diagnóstico todavía se basa más en criterios clínicos que moleculares, la implementación de técnicas de biología molecular para la detección de mutaciones en estos últimos genes para estos trastornos no ha cobrado la importancia que debería de tener, esto más particularmente en países que están en vías de desarrollo, como México.

Las limitantes que genera un análisis molecular parcial, en el caso de las NMPCs, repercute en un diagnóstico más pobre, no tan certero y sujeto a más error, que impacta en el pronóstico, evolución, tratamiento, mejora y calidad de vida de los afectados. El diagnóstico basado en criterios moleculares, representa actualmente el método más seguro y confiable para detectar y caracterizar una enfermedad; de esta manera, y a pesar de que la OMS ya implementó como criterios mayores la detección de mutaciones en los genes JAK2, CALR y MPL en el diagnóstico de estas neoplasias, en México todavía no se aplica con esa rigurosidad, especialmente para las mutaciones descritas más recientemente, (CALR y MPL).

Se tiene además que la gran mayoría de la información reportada en la literatura respecto a estas neoplasias corresponde a estudios realizados en poblaciones

europeas, asiáticas y norte americanas, y los estudios en poblaciones latinas son muy deficientes y escasos, entre los que se incluye México. En este contexto se justifica la necesidad de realizar más estudios a nivel molecular de las NMPC, en esta población, enfocados en determinar si la frecuencia y los tipos de mutaciones que se presentan en los principales marcadores moleculares, (JAK2, MPL y CALR), de este conjunto de enfermedades son similares o difieren de lo reportado en aquellas poblaciones.

El enfoque de los estudios a nivel molecular de una patología está orientado hacia una descripción más amplia y detallada de todas alteraciones que se producen en la célula cuando esta está presente, con la finalidad de caracterizarla mejor, y en última instancia comprender su origen y cómo evoluciona para poder tratarla en sus fases más tempranas o prevenir su aparición. El caracterizar más una enfermedad implica un mejor esquema pronóstico y diagnóstico basado en determinadas características, clínicas, histologías, fisiológicas, patológicas y moleculares; siendo este último el más importante por ser el que brinda información más certera y específica.

De esta forma para el caso de las NMPC la implementación paulatina de más marcadores moleculares permitirá mejorar cada vez más el pronóstico y diagnóstico de estas neoplasias, uno de los más importantes marcadores potenciales es DNMT3A un gen del grupo de regulación epigenética, que destaca por el hecho de que mutaciones en este gen se han reportado de forma frecuente en los estadios iniciales de aparición, así como en las etapas más avanzadas de evolución, (MF- Post PV, MF- post TE y leucemia mieloide aguda secundaria) de las NMPC y que implícitamente sugiere que presenta un importante rol tanto en la aparición, evolución y transformación de las mismas hacia entidades más “malignas” que son MF Y LMA.

Se estima que la pronta detección de mutaciones en estos genes repercutirá de forma favorable en la evolución de estos cánceres, con la posibilidad de tratarlos en sus fases más tempranas; sin embargo, actualmente se desconoce en su mayoría los mecanismos patológicos por lo que actúan estas mutaciones y su relación con los marcadores moleculares JAK2, CALR y MPL.

La coexistencia de mutaciones adicionales con mutaciones en los genes conductores JAK2, CALR y MPL para el caso de las NMPC es indicativo de la progresión de la enfermedad, evolución clonal y finalmente esta característica las convierte en sub entidades dentro del espectro donde estas se encuentran clasificadas, (PV, TE y MFP), por el hecho de que la presencia de estas mutaciones secundarias van a modificar las características patológicas y por lo tanto clínicas de las neoplasias y definirán nuevos casos de NMPC con características particulares y distintivas. La coexistencia de mutaciones de DNMT3A con la mutación JAK2 V167F, ya se reportado, aunque con una frecuencia muy baja, pero para el caso de los genes CALR y MPL, hasta el momento no se han reportado los casos de coexistencia mutacional con DNMT3A, más que nada por el hecho de los pocos estudios realizados a este respecto y de nueva cuenta ninguno llevado a cabo en poblaciones latinas. El énfasis de los estudios en distintas poblaciones se debe a la presencia de variaciones en las diferentes razas debidos a la presencia de polimorfismos genéticos, que pueden modificar la estructura o función de las proteínas que codifican o en alguna función regulatoria y finalmente repercutir en las características de enfermedades relacionadas directamente con mutaciones en estos genes, de ahí la importancia del estudio de los polimorfismos.

4.- Hipótesis

Mutaciones en el gen DNMT3A se asocian significativamente con mutaciones en los genes JAK2, CALR, y MPL para los casos de NMPCs en una muestra de la población mexicana.

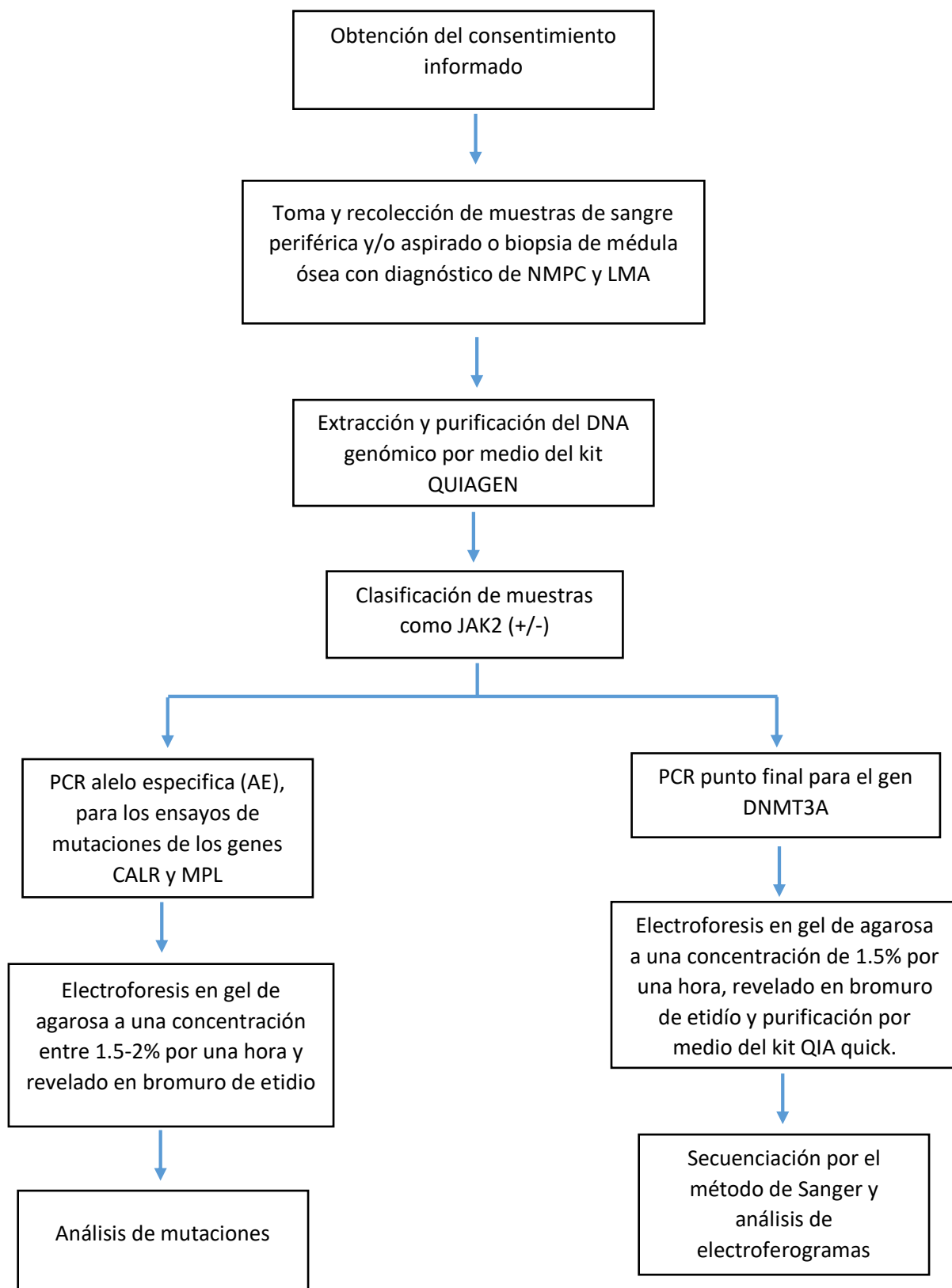
5.- Objetivo General

Analizar la frecuencia y los tipos de mutaciones que se presentan en los genes CALR, MPL y DNMT3A para los casos de neoplasias mieloproliferativas crónicas: Policitemia vera, (PV), Trombocitosis esencial, (TE) y Mielofibrosis primaria (MFP) y LMA en una muestra de la población mexicana

5.- Objetivos específicos

- Estandarizar el panel metodológico que permita la correcta identificación de las mutaciones de interés en los genes CALR, MPL y DNMT3A.
- Determinar si se presenta la co-existencia de mutaciones entre los genes CALR, MPL y DNMT3A
- Establecer si existen polimorfismos que sean característicos y exclusivos de la población de estudio en el exón 23 del gen DNMT3A.

6.- Estrategia



7.- Materiales y Métodos

7.1- Tipo y clasificación del estudio

Proyecto de investigación original de ciencia básica, en el que se plantea un estudio descriptivo, observacional, analítico, prospectivo y transversal.

7.2- Universo o población

Muestras de pacientes anónimos donadas por biobanco a Laboratorios Mendel con diagnóstico de alguna NMPC y con información de edad, sexo, diagnóstico y marcadores analizados.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó la fórmula para una población finita:

$$n = \frac{N \times Z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z_{\alpha}^2 \times p \times q} = 76$$

N= Tamaño de la población, que corresponde al número de pacientes con diagnóstico de alguna NMPC en el lapso de un año y que corresponde en promedio a 95 casos.

Z= Es el valor de la variable z para una confianza del 95% y para el cual z es igual a 1.96

D= Es la precisión y es el error máximo admisible en términos de proporción, para nuestro estudio tendrá un valor del 5% o lo que es igual 0.05.

P= probabilidad de éxito, o proporción esperada.

Q= probabilidad de fracaso, que es de 0.5

Nota: Se recabaron un total de 80 muestras; sin embargo, solo 49 cumplieron con los requisitos de selección.

Las muestras se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

Muestras de médula ósea o sangre periférica provenientes de pacientes con diagnóstico de alguna NMPC sin tratamiento previo y con consentimiento firmado del paciente.

Criterios de exclusión:

Muestras de médula ósea o sangre periférica provenientes de pacientes con diagnóstico de una NMPC con tratamiento quimioterapéutico o radiológico previo y muestras sin el consentimiento del paciente.

Criterios de eliminación:

Muestras en condiciones inadecuadas para el procesamiento como presencia de coágulos o poca cantidad de la misma (menos de 3 mL) y con un tiempo prolongado desde la toma hasta la extracción (máximo una semana).

7.3.- Metodología

Diseño de oligonucleótidos: Se diseñaron oligonucleótidos o Primers a partir de metodologías reportadas en la bibliográfica para la detección de las mutaciones más frecuentes presentes en los genes a estudiar y con ayuda de las secuencias de referencia de los mismos que se encuentran en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Además, se analizaron los oligonucleótidos diseñados con ayuda del programa Oligo Analyzer

(<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). La síntesis se solicitó a la compañía ELIM Biopharm.

Extracción de DNA

Se realiza la lisis celular mediante el uso de un detergente como SDS que fragmenta la membrana celular, la proteasa K que rompe la membrana nuclear y una RNasa para eliminar RNA contaminante. Una vez liberado el DNA se une a una columna de sílica por medio de centrifugación y se realizan varios lavados para eliminar los restos celulares proteicos con tiocianato de guanidina y azida de sodio. Finalmente, se eluye el DNA en agua libre de nucleasas para recuperarlo por centrifugación.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Este método utiliza la enzima HotStartTaq polimerasa (5U/ μ L) para multiplicar un templado de DNA o cDNA proveniente de la muestra a analizar y detectar mediante el uso de primers específicos correspondientes a las diferentes mutaciones seleccionadas. La mezcla se coloca a 94°C durante 10 minutos para activar la enzima y posteriormente de 25 a 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos para separar las cadenas de DNA, de 50 a 65°C durante 20 a 40 segundos que permite el alineamiento de los primers o iniciadores y la enzima, y a 72°C para que se lleve a cabo la polimerización del DNA. Finalmente se realiza una amplificación final a 72°C durante 7 - 10 minutos para agotar la actividad de la polimerasa.

Electroforesis en gel de agarosa: Los productos de PCR se corren en geles de agarosa al 1.5 – 2 % en un volumen de 40 ml, con un voltaje de entre 100-110 voltios y por un tiempo aproximado de 40-60 minutos. La visualización se realiza mediante tinción

con solución de bromuro de etidio al 1:100 por un tiempo aproximado de 7- 10 minutos y se visualiza con un trasluminador UV.

Purificación de productos de PCR: se utilizó el kit QIAquick PCR Purification kit (50) (QIAGEN) que se basa en un fundamento similar al de extracción de DNA.

Secuenciación y análisis de electroferogramas: Los productos de PCR de cada uno de los genes y para cada una de las muestras se secuenciaron por el método de Sanger en la empresa LANBAMA®. Los electroferogramas obtenidos fueron corregidos de manera manual. Las secuencias originadas de cada gen se compararon y alinearon con las secuencias de referencia del genoma de la base de datos NCBI, con ayuda de los programas BioEdit y CLC Sequence Viewer (QIAGEN®).

Análisis estadístico: pruebas estadísticas básicas como media, desviación y error estándar.

8.- Resultados

8.1.-Diseño de los cebadores

Tabla 3. Secuencia, longitud de amplificado y principales características de los cebadores

Cebadores	Secuencia	Nº de bases	Longitud de amplificado	Tm	%GC
CALR-F1	5'-GCA GGC AGC AGA GAA ACA AAT GAA GG-3'	26	357 pb	60.6°C	50%
CALR-F2	5'-GGC AGA GGA CAA <u>TTG TCG</u> GAG G-3'	22	272 pb	60°C	59.1%
CALR-R	5'-GGA GAG TGG AGG AGG GGA ACA A-3'	22	357 pb	60.4°C	59.1%
MPL-F	5'-AGT AGG GGC TGG CTG GAT-3'	18	356 pb	58.5°C	61.1%
MPL-R	5'-GTG GGC GTG TTA GAG TGT AAG G-3'	22	356 pb	57.5°C	54.5%
MPL-FL	5'-GGC CTG CTG CTG CTG <u>AAG TI</u> -3'	20	227 pb	61°C	60%
MPL-RK	5'-ACC TGT AGT GTG CAG GAA ACT <u>TCTI</u> -3'	25	170 pb	58.3°C	44%
DNMT3A-F	5'-TCC TGC TGT GTG GTT AGA CG-3'	20	546 pb	56.9°C	55%
DNMT3A-R	5'-ACA GAA AAC CCC TCT GAA AAG-3'	21	546 pb	52.8°C	42.9%

(Hun, et al., 2016), (Takei, et al., 2014), (Shivarov, et al., 2014)

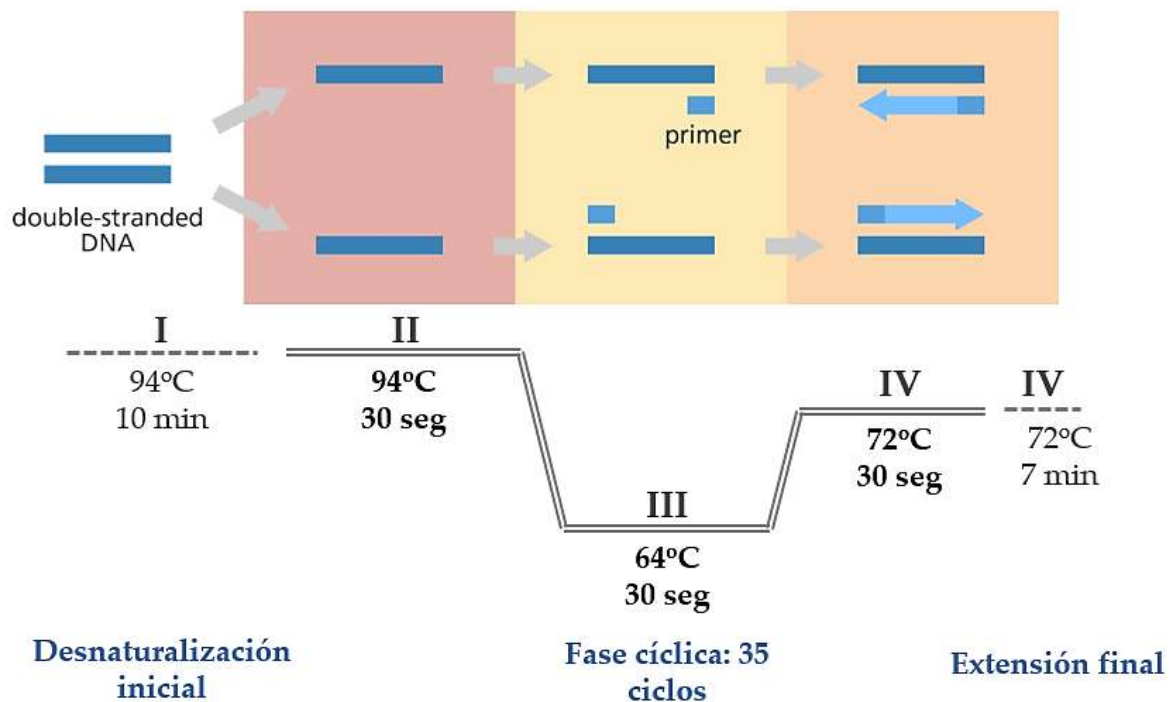
En el análisis de mutaciones que ya son conocidas es posible diseñar cebadores alelo-específicos (con un cambio de una o más bases, correspondiente a la mutación), para que únicamente se unan, y consecuentemente, sean amplificados aquellos alelos que presenten una determinada mutación en su secuencia. Así, en la propia reacción de PCR, se amplificaron los alelos mutados. Los cebadores CALR-F2, MPL-FL y MPL-RK son alelo específicos, las bases resaltadas en color rojo y subrayadas se unen específicamente a las mutaciones CALR tipo 2, MPL W515L y MPL W515K, pero no a las secuencias nativas. Mientras que las bases rojas no subrayadas son cambios de bases respecto a la secuencia nativa, que se hacen de forma intencional, con la finalidad de aumentar más la especificidad de unión de los cebadores a las regiones mutadas (mis matches).

8.2.- Diseño del programa de PCR

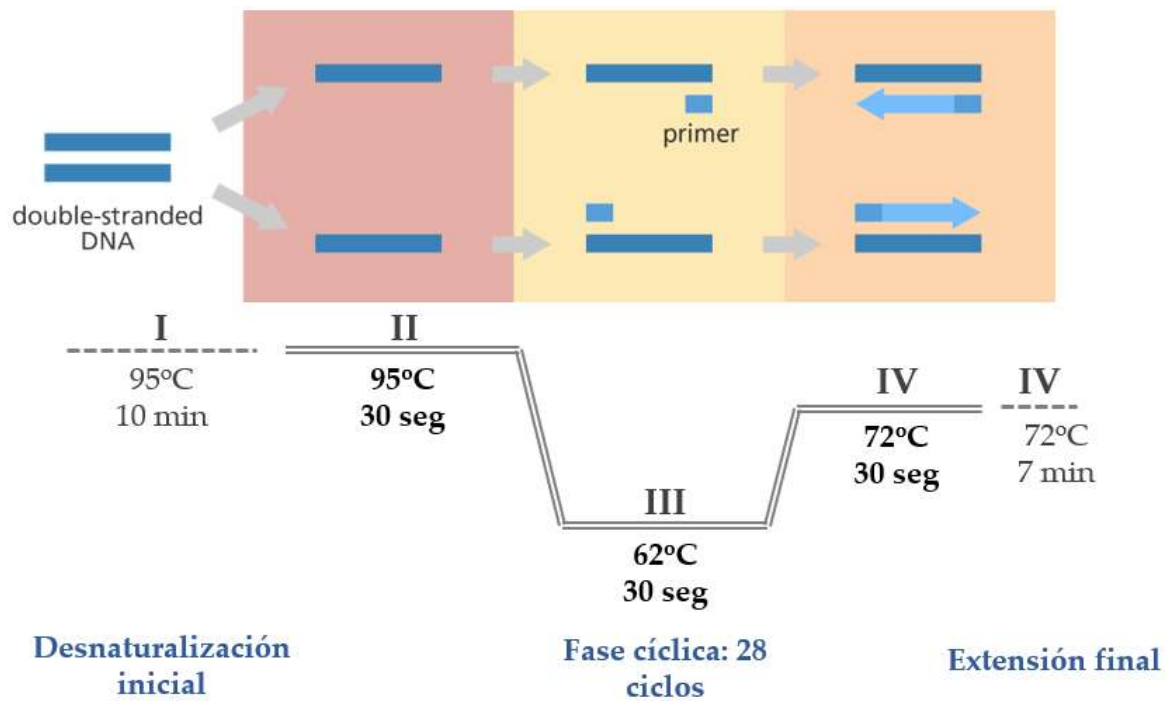
Con base en las características de los cebadores y en la revisión bibliográfica, se establecieron los siguientes esquemas de PCR, para los genes *CALR*, *MPL* y *DNMT3A*. El programa consiste de 5 etapas que son:

- I. Desnaturalización inicial
- II. Segunda etapa de desnaturalización
- III. Alineamiento
- IV. Extensión
- V. Extensión final

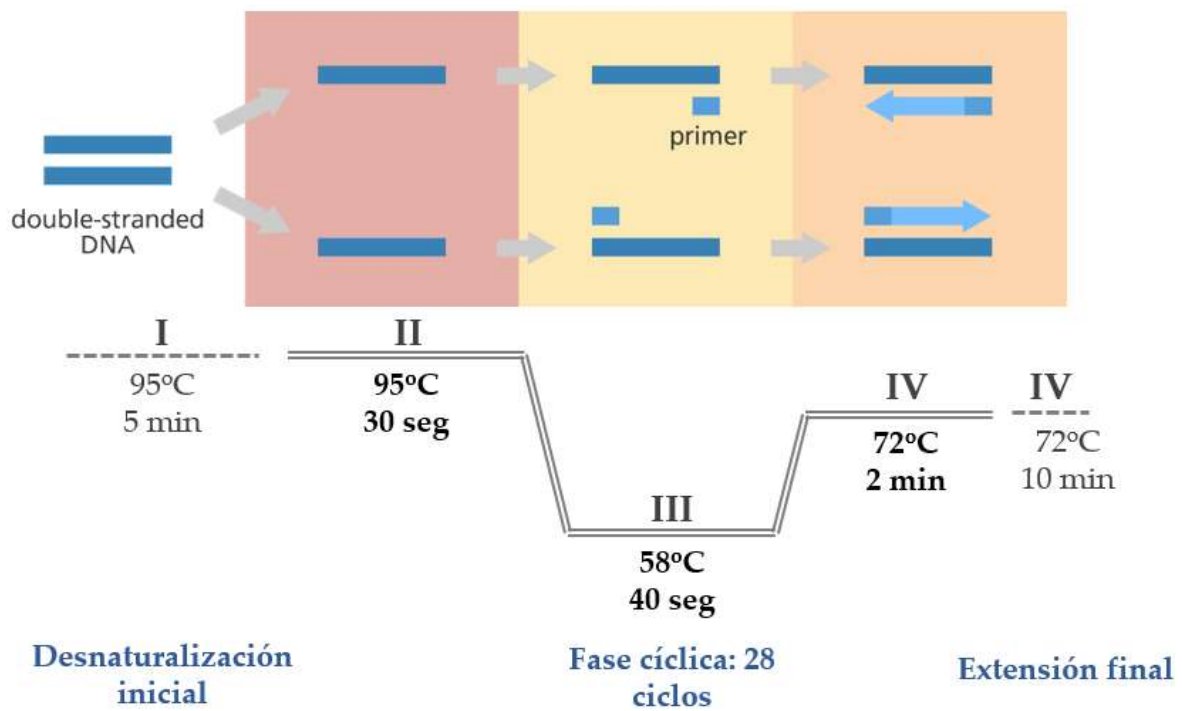
CALR



MPL



DNMT3A



8.3.- Análisis de la funcionalidad de los cebadores

Figura 1.

CALR



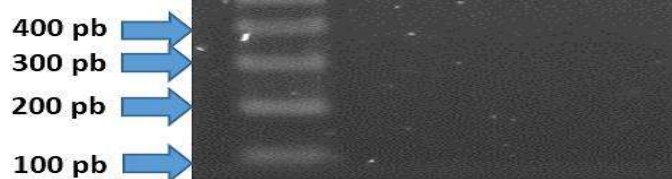
Figura 2.

MPL



Figura 3.

DNMT3A



Figuras 1, 2 y 3. Prueba de la funcionalidad de los cebadores para la amplificación de los exones 9, 10 y 23 de los genes CALR, MPL y DNMT3A respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron con la combinación de los cebadores directo, reverso y alelo-específico en una misma mezcla de reacción, para los casos de los genes CALR y MPL, excepto para DNMT3A en el que no se emplearon cebadores alelo específico y solo fue la combinación de los cebadores directo y reverso. En todos los casos los productos se cargaron en un gel de agarosa al 1.5 % de concentración, en el siguiente orden: marcador de peso molecular (MP), dos controles negativos (C-), que corresponden a pacientes sanos sin ningún tipo de mutación, y por ultimo un control NTC, el cual es un control que no contiene el DNA blanco y es necesario para detectar la presencia de DNA contaminante. En la figura 1, ensayo de CALR, la banda de amplificación del exón 9 está en 357 pb y como se esperaba las bandas para las mutaciones tipo I, (305 pb) y tipo II (272 pb) no aparecieron en el caso de un paciente sano. De forma similar para el ensayo de MPL, figura 2, la banda de amplificación del exón 10 está en 356 pb y las bandas para las mutaciones W515K, (170 pb) y W515L, (227 pb) no se presentaron para un paciente sano. Por último, en el caso de DNMT3A solo está presente la banda de amplificación del exón 23 de 546 pb.

8.4.- Resultados de secuenciación para los genes CALR, MPL y DNMT3A
Se muestran los resultados de la secuenciación y acoplamiento para los genes CALR, MPL y DNMT3A que confirman la funcionalidad de los cebadores en la amplificación de las regiones de interés de los genes señalados.

Acoplamiento CALR, exón 9

GAGAAACAAATGAAGGACAAACAGGACGAGGAGCAGAGGCTTAAGGAGGAGGAAGAAGAC	60 pb
GAGAAACAAATGAAGGACAAACAGGACGAGGAGCAGAGGCTTAAGGAGGAGGAAGAAGAC	
AAGAAACGCAAAGAGGAGGAGGAGGCAGAGGACAAGGAGGATGATGAGGACAAAGATGAG	120 pb
AAGAAACGCAAAGAGGAGGAGGAGGCAGAGGACAAGGAGGATGATGAGGACAAAGATGAG	
GATGAGGAGGATGAGGAGGACAAGGAGGAAGATGAGGAGGAAGATGTCCCCGCGCCAGGCC	180 pb
GATGAGGAGGATGAGGAGGACAAGGAGGAAGATGAGGAGGAAGATGTCCCCGCGCCAGGCC	
AAGGACGAGCTGTAGAGAGGCCTGCCTCCAGGGCTGGACTGAGGCCTGAGCGCTCCTGCC	240 pb
AAGGACGAGCTGTAGAGAGGCCTGCCTCCAGGGCTGGACTGAGGCCTGAGCGCTCCTGCC	
GCAGAGCTGGCCGCGCCAAATAATGTCTCTGTGAGACTCGAGAACTTTCATTTTTTTTCCA	300 pb
GCAGAGCTGGCCGCGCCAAATAATGTCTCTGTGAGACTCGAGAACTTTCATTTTTTTTCCA	
GGCTGGTTCGGATTTGGGGTGGATTTTGGTTTTGTTCCCCTCCTCCACTCTCC	357 pb
GGCTGGTTCGGATTTGGGGTGGATTTTGGTTTTGTTCCCCTCCTCCACTCTCC	

	Secuencia nativa
	Resultado de secuenciación

Acoplamiento MPL, exón 10

AGTAGGGGCTGGCTGGATGAGGGCGGGGCTCCGGCCCGGGTGGGCCGAAGTCTGACCCTT AGTAGGGGCTGGCTGGATGAGGGCGGGGCTCCGGCCCGGGTGGGCCGAAGTCTGACCCTT	60 pb
TTTGTCTCCTAGCCTGGATCTCCTTGGTGACCGCTCTGCATCTAGTGCTGGGCCTCAGCG TTTGTCTCCTAGCCTGGATCTCCTTGGTGACCGCTCTGCATCTAGTGCTGGGCCTCAGCG	120 pb
CCGTCCTGGGCCTGCTGCTGCTGAGGTGGCAGTTTCCTGCACACTACAGGTACCGCCCCC CCGTCCTGGGCCTGCTGCTGCTGAGGTGGCAGTTTCCTGCACACTACAGGTACCGCCCCC	180 pb
GCCAGGCAGGAGACTGGCGGTGGACCAGGTGGAGCCGAAGGCCTGTAAACAGGCATTCTT GCCAGGCAGGAGACTGGCGGTGGACCAGGTGGAGCCGAAGGCCTGTAAACAGGCATTCTT	240 pb
GGTTCGCTCTGTGACCCCAGATCTCCGTCCACCGCCCGTGCGCACCTACGGCTTCGCCAC GGTTCGCTCTGTGACCCCAGATCTCCGTCCACCGCCCGTGCGCACCTACGGCTTCGCCAC	300 pb
TTCTGCACGTCACCTCTGGGACTCGCCGCGGCTCCTTACACTCTAACACGCCCCAC TTCTGCACGTCACCTCTGGGACTCGCCGCGGCTCCTTACACTCTAACACGCCCCAC	356 pb



Secuencia nativa



Resultado de secuenciación

TCCTGCTGTGTGGTTAGACGGCTTCGGGCAGCCTGGTCTGGCCAGCACTCACCTGCCC	60 pb
TCCTGCTGTGTGGTTAGACGGCTTCGGGCAGCCTGGTCTGGCCAGCACTCACCTGCCC	
TCTCTGCCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCACTATACTGACGTCTCAA	120 pb
TCTCTGCCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCACTATACTGACGTCTCAA	
CATGAGCCGCTTGGCGAGGCAGAGACTGCTGGGCCGGTCATGGAGCGTGCCAGTCATCCG	180 pb
CATGAGCCGCTTGGCGAGGCAGAGACTGCTGGGCCGGTCATGGAGCGTGCCAGTCATCCG	
CCACCTCTTCGCTCCGCTGAAGGAGTATTTTGC GTGTGTGTAAGGGACATGGGGGCAAAC	240 pb
CCACCTCTTCGCTCCGCTGAAGGAGTATTTTGC GTGTGTGTAAGGGACATGGGGGCAAAC	
TGAGGTAGCGACACAAAGTTAAACAAACAAACAAAAACACAAAACATAATAAACACCA	300 pb
TGAGGTAGCGACACAAAGTTAAACAAACAAACAAAAACACAAAACATAATAAACACCA	
AGAACATGAGGATGGAGAGAAGTATCAGCACCCAGAAGAGAAAAGGAATTTAAACAAA	360 pb
AGAACATGAGGATGGAGAGAAGTATCAGCACCCAGAAGAGAAAAGGAATTTAAACAAA	
AACCACAGAGGCGGAAATACCGGAGGGCTTTGCCTTGCGAAAAGGGTTGGACATCATCTC	420 pb
AACCACAGAGGCGGAAATACCGGAGGGCTTTGCCTTGCGAAAAGGGTTGGACATCATCTC	
CTGATTTTTCAATGTTATTCTTCAGTCCTATTTAAAAACAAAACCAAGCTCCCTTCCCTT	480 pb
CTGATTTTTCAATGTTATTCTTCAGTCCTATTTAAAAACAAAACCAAGCTCCCTTCCCTT	
CCTCCCCCTTCCCTTTTTTTTTTCGGTCAGACCTTTTATTTTCTACTCTTTTCAGAGGGGTT	540 pb
CCTCCCCCTTCCCTTTTTTTTTTCGGTCAGACCTTTTATTTTCTACTCTTTTCAGAGGGGTT	

Página 42 | 79

8.5.- Muestras

Se obtuvieron un total de 49 muestras en el lapso de un año, que cumplieron los requisitos de selección establecidos, todas con diagnóstico presuntivo de NMPC y de LMA. Para el grupo de las NMPC el promedio de edad fue de 55 años, con un leve predominio del sexo femenino, (24 mujeres contra 22 hombres), el principal criterio de clasificación para el grupo de las neoplasias mielo proliferativas crónicas fue la presencia o ausencia de la mutación *JAK2 V617F*; de esta manera, 35 fueron *JAK2 V617F* - y 11 *JAK2 V617F+*, todas las muestras presentan una clave única de identificación y algunas de las mismas tienen estudios adicionales de cariotipo y del cromosoma filadelfia (BCR-ABL), para descartar una probable leucemia mieloide crónica. La mayoría de los diagnósticos fueron para TE, seguido de PV y no se presentó ningún caso de MFP, por ser la más rara y poco frecuente; en algunos casos, el diagnóstico del médico venía de una forma más general, sin especificar el subtipo y aparece únicamente como NMPC.

Como punto importante se tiene que no fue posible obtener muestras reportadas como MF - post PV o TE; en otras palabras, muestras de mielo fibrosis resultantes de la evolución de casos previos de PV y TE, así como tampoco de LMA secundaria, (LMA surgida de la evolución de alguna NMPC previa); referente a estas últimas se obtuvieron un total de 3 muestras reportadas como presuntivas de LMA, pertenecientes a dos hombres y una mujer, con una media de edad del grupo de 58 años. En las siguientes tablas se presentan todas las muestras obtenidas, su clasificación, clave de identificación, diagnóstico y estudios adicionales; se hace la aclaración de que, por cuestiones de confidencialidad, no se han puesto datos de edad y género.

Tabla 4.- Recopilación de las muestras *JAK2 V617F* -, se indica clave de muestra, diagnostico presuntivo y estudios adicionales de cariotipo y del gen de fusión BCR-ABL, para algunas de las mismas

Clave de muestra	Presunto diagnóstico	Estudios adicionales	Clave muestra	Presunto diagnóstico	Estudios adicionales
1.- A1BLO-0718	PV	-	19.- 153BLO-19	PV	-
2.- A6BM-0518	TE	-	20.- J10BLO-1218	TE	BCR-ABL (-)
3.- B1BLO-0518	TE	BCR-ABL (-)	21.- A5BM-1019	TE	-
4.- B1BLO-1217	NMPC	-	22.- 115BLO-19	PV	-
5.- B2BLO-0518	NMPC	-	23.- 190BLO-19	TE	-
6.- B6BLO-0918	TE	-	24.- J2BM-0919	TE	-
7.- C4BLO-0518	TE	-	25.- D5BLO-0319	TE	-
8.- C7BLO-0518	TE	-	26.- F5BLO-0319	NMPC	-
9.- E1BM-0618	TE	trans(6/12); BCR-ABL (-)	27.- I8BLO-0219	TE	-
10.- E3BLO-0318	PV	-	28.- B1BM-0419	TE	cariotipo normal; BCR-ABL (-)
11.- E3BLO-0618	TE	BCR-ABL (-)	29.- E6BLO-0119	TE	-
12.- F1BM-0618	TE	BCR-ABL (-)	30.- E9BM-0419	TE	BCR-ABL (-), cariotipo normal
13.- G2BLO-0818	TE	BCR-ABL (-)	31.- F10BM-0319	PV	-
14.- G3BLO-0418	PV	-	32.- G10BLO-0519	TE	-
15.- H9BM-1018	TE	-	33.- I4BLO-0519	TE	cariotipo normal; BCR-ABL (-)
16.- H10BLO-0618	PV	-	34.- J9BM-0518	TE	BCR-ABL (-)
17.- I3BM-0218	TE	-	35.- J2BLO-0818	PV	-
18.- I5BLO-0618	PV	BCR-ABL (-)			

Tabla 5.- Recopilación de las muestras *JAK2 V617F +*, se indica clave de muestra, diagnostico presuntivo y estudios adicionales de cariotipo y del gen de fusión BCR-ABL, para algunas de las mismas

Clave muestra	Presunto diagnóstico	Estudios adicionales
1.- A3BLO-0518	PV	-
2.- B3BLO-1218	TE	
3.- C10BLO-1118	PV	BCR-ABL (-)
4.- D7BLO-0318	NMPC	BCR-ABL (-)
5.- F6BLO-0319	NMPC	
6.- E7BM-0319	TE	
7.- E6BLO-0319	TE	BCR-ABL-
8.- A8BM-0219	NMPC	Cariotipo normal
9.- E10BLO-0419	NMPC	BCR-ABL-
10.- C6BLO-0519	PV	-
11.- J4BM-0819	PV	-

Tabla 6.- Recopilación de las muestras presuntivas de LMA, se indica clave de muestra, diagnostico presuntivo y estudios adicionales

Clave muestra	Presunto diagnóstico	Estudios adicionales
1.- B1B-1019	LMA	-
2.- C2B-1019	LMA	-
3.- M3B-1019	LMA	-

8. 6. - Análisis de las mutaciones tipo I y II del exón 9 de CALR

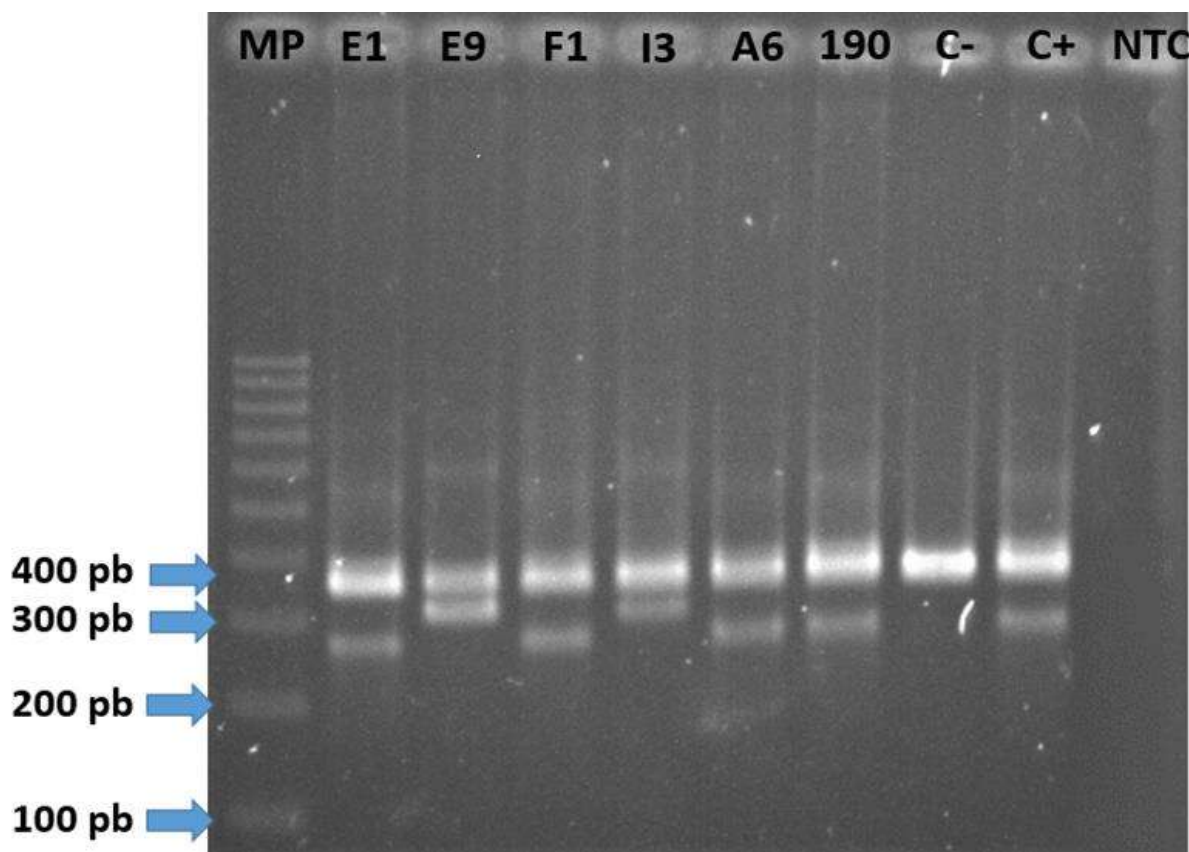


Figura 4. Análisis electroforético de todas las muestras positivas para las mutaciones tipo I y II de CALR.. Las bandas de 357 pb corresponden a la amplificación del exón 9 nativo de CALR. Las muestras I3BM – 0218 y E9BM – 0419 resultaron positivas para la mutación tipo I de CALR o la delección de 52 pares de bases, que aparece representada como las bandas adicionales situadas en 305 pb.

Las muestras E1BM – 0618, F1BM – 0618, A6BM – 0518, 190BLO - 19 e incluido el control positivo I8BLO – 0219, resultaron positivas para la mutación tipo II o la inserción de 5 pb, (TTGTC), que es la que reconoce el cebador alelo específico, CALR-F2, generando las bandas que aparecen en 272 pb. Como se puede observar en la imagen, ambas mutaciones tipo I y II son heterocigotas.

Tabla 7. - Resultados de los análisis para la detección de las mutaciones tipo I y II de CALR de las muestras *JAK2 V617F* -

Muestras <i>JAK2 V617F</i> -	Mutación tipo I de CALR	Mutación tipo II de CALR
I8BLO - 0219	-	positiva
D5BLO - 0319	X	X
F5BLO -0319	X	X
B1BM – 0419	X	X
E6BLO – 0119	X	x
E9BM – 0419	positiva	-
F10BM – 0319	X	X
G10BLO – 0519	X	X
I4BLO - 0519	X	X
A1BLO – 0718	X	X
A6BM – 0518	-	positiva
B1BLO – 1217	X	X
B1BLO – 0518	X	X
B2BLO - 0518	X	X
B6BLO – 0918	X	X
C4BLO – 0518	X	X
C7BLO – 0518	X	X
E1BM – 0618	-	positiva
E3BLO – 0318	X	X
E3BLO – 0618	X	X
F1BM – 0618	-	positiva
G2BLO – 0818	X	X
G3BLO - 0418	X	X
H9BM – 1018	X	X
H10BLO – 0618	X	X
I3BM – 0218	positiva	-
I5BLO – 0618	X	X
J2BLO – 0818	X	X
J9BM – 0518	X	X
A5BM – 1019	X	X
J2BM – 0919	X	X
J10BLO – 1218	X	X
115BLO – 19	X	X
153BLO – 19	X	X
190BLO - 19	-	positiva

Nota: la X en este y los demás cuadros indica un resultado negativo o ausencia de la mutación buscada

Tabla 8. - Resultados de los análisis para la detección de las mutaciones tipo I y II de CALR de las muestras *JAK2 V617F* +

Muestras <i>JAK2 V617F</i> +	Mutación tipo I de CALR	Mutación tipo II de CALR
E7BM - 0319	X	X
E6BLO -0319	X	X
F6BLO - 0319	X	X
A3BLO – 0518	X	X
B3BLO – 1218	X	X
C10BLO – 1118	X	X
D7BLO – 0318	x	x

Tabla 9. – Características de las muestras positivas a las mutaciones tipo I y II de CALR

Muestras CALR positivas	Mutación tipo I o II de CALR	Sexo	Edad	Diagnóstico	Datos adicionales
I8BLO - 0219	tipo II	femenino	30 años	TE	BCR-ABL (-)
E9BM – 0419	tipo I	femenino	70 años	TE	BCR-ABL (-) Cariotipo normal
A6BM – 0518	tipo II	femenino	57 años	TE	-
E1BM – 0618	tipo II	femenino	56 años	TE	Trans (6/12); BCR-ABL (-)
F1BM – 0618	tipo II	femenino	76 años	TE	BCR-ABL (-)
I3BM – 0218	Tipo I	masculino	58 años	TE	-
190BLO - 19	Tipo II	masculino	43 años	TE	-

8. 7.- Discusión de los resultados de las mutaciones de CALR

Las muestras analizadas para las mutaciones tipo I y II del exón 9 de CALR fueron seleccionadas previamente de un conjunto de muestras clasificadas como JAK2V617F positivas y negativas, de las cuales se incluyeron 7 y 35 muestras, respectivamente, de cada grupo. El grupo JAK2V617F (+) estaba conformado por 5 hombres y 2 mujeres con una media de edad de 75 años, que como se preveía resulto negativo a las mutaciones de CALR y concuerda con lo reportado en la literatura de una coexistencia muy baja, (inferior al 1%) entre las mutaciones tipo I y II de CALR con la mutación JAK2V617F, (Araki & Komatsu, 2017). Por otra parte, el grupo JAK2V617F (-) estaba conformado por 16 hombres y 19 mujeres con una media de edad de 49.4 años de los cuales 7 resultaron positivos a mutaciones de CALR, que representa el 20% de este conjunto. De estos 7 pacientes (5 mujeres y 2 hombres), 5 fueron positivos para la mutación tipo II y 2 para la tipo I, el promedio de edad de este grupo CALR positivo fue de 55.7 años, en el que se encontraron dos pacientes relativamente jóvenes de 30 y 43 años. Todos estos pacientes positivos a mutaciones de CALR tenían un diagnóstico presuntivo de trombocitosis esencial y la muestra E1BM-0618 presentaba adicionalmente la anormalidad citogenética trans(6/12) que es considerada rara y se reporta que puede ocurrir tanto en trastornos mieloides y linfoides. Es importante mencionar que estos pacientes no llegaron con un diagnóstico confirmado de NMPC y por eso solo se maneja como presuntivo; debido a ello, el porcentaje de casos positivos a mutaciones de calreticulina no fue tan elevado, pero sigue entrando en los intervalos descritos en la literatura, (Rumi & Cazzola, 2017), de 20-25% de mutaciones de CALR en los casos de TE. Como se verá más adelante, el porcentaje de CALR mutados en el grupo JAK2V617F (-), asciende a 21.21%, debido a la presencia de dos mutados en el gen MPL. Las mutaciones de calreticulina fueron todas heterocigotas y se presentaron en pacientes más jóvenes

en comparación con aquellos que portan la mutación JAK2V617F, con una mayor prevalencia de la tipo II en los casos de TE, recordando que esta mutación retiene aproximadamente la mitad de los aminoácidos con carga negativa del dominio ácido C-terminal de CALR en comparación con la tipo I que los elimina casi todos y que por ello se puede considerar menos destructiva y de menor impacto que la tipo I. Todo esto concuerda con lo descrito en la literatura de una mayor prevalencia de la mutación tipo I en la mielofibrosis, que es una patología más maligna en relación con la trombocitosis dentro del espectro de las NMPC. La única discrepancia en nuestro estudio fue una mayor frecuencia de mutaciones en este gen en el sexo femenino que difiere de lo reportado para CALR, que apunta a una mayor incidencia en hombres.

8. 8. - Análisis de las mutaciones W515L/K del exón 10 de MPL

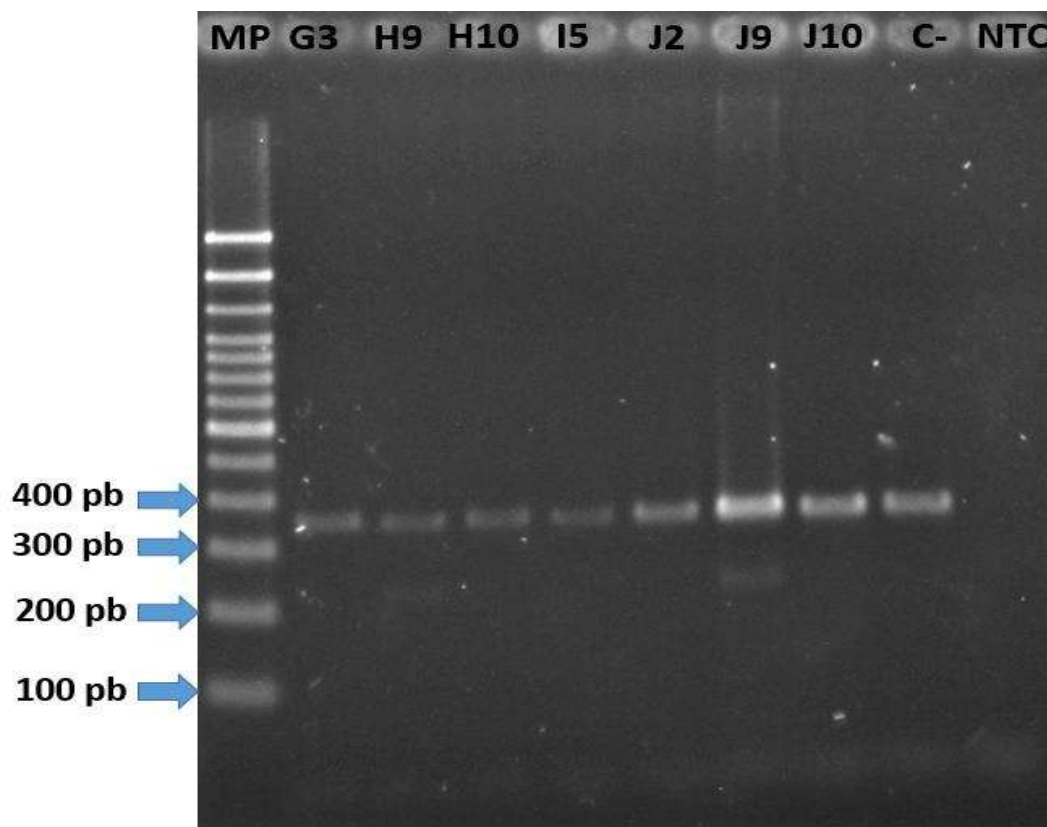


Figura 5. Análisis electroforético de las muestras *JAK2 V617F* – y *CALR* –, para las mutaciones W515K y W515L de MPL. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo con la combinación de los 4 cebadores: MPL-F, (directo), MPL-R, (reverso) MPL-RK, (cebador alelo específico para la mutación W515K) y MPL-FL, (cebador alelo específico para la mutación W515L). Las bandas de 356 pb corresponden a la amplificación del exón 10 nativo de MPL. Las muestras H9BM – 1018 y J9BM – 0518 resultaron positivas para la mutación W515L de MPL que aparece representada como las bandas adicionales situadas en 227 pb.

En este ensayo no es posible determinar si las mutaciones son homo o heterocigotas, debido a que no se presentan diferencias de tamaño respecto a las secuencias nativas y a las mutadas, dado que las mutaciones son del tipo “missense” y solo se produce la sustitución de una base por otra.

Tabla 10. - Resultados de los análisis para las mutaciones W515K y W515L de MPL de las muestras *JAK2 V617F* - y *CALR* -

Muestras <i>JAK2 V617F</i> – y <i>CALR</i> -	Mutación MPL W515K	Mutación MPL W515L
D5BLO - 0319	X	X
F5BLO -0319	X	X
B1BM – 0419	X	X
E6BLO – 0119	x	x
F10BM – 0319	X	X
G10BLO – 0519	X	X
I4BLO - 0519	X	X
A1BLO – 0718	X	X
B1BLO – 1217	X	X
B1BLO – 0518	X	X
B2BLO - 0518	X	X
B6BLO – 0918	X	X
C4BLO – 0518	X	X
C7BLO – 0518	X	X
E3BLO – 0318	X	X
E3BLO – 0618	X	X
G2BLO – 0818	X	X
G3BLO - 0418	X	X
H9BM – 1018	-	positiva
H10BLO – 0618	X	X
I5BLO – 0618	X	X
J2BLO – 0818	X	X
J9BM – 0518	-	positiva
A5BM – 1019	X	X
J2BM – 0919	X	X
J10BLO – 1218	X	X
115BLO – 19	X	X
153BLO – 19	X	X

Tabla 11. – Características de las muestras positivas a las mutaciones tipo I y II de CALR

Muestras MPL positivas	Tipo de mutación	Sexo	Edad	Diagnóstico	Datos adicionales
H9BM – 1018	W515L	femenino	88 años	TE	-
J9BM – 0518	W515L	femenino	54 años	TE	BCR-ABL (-) Cariotipo normal

8. 9.- Discusión de los resultados de las mutaciones de MPL

Todas las muestras seleccionadas para los ensayos de las mutaciones W515L/K del gen MPL fueron únicamente aquellas pertenecientes al grupo JAK2V617F (-) y CALR (-), esto con base en el hecho de que la coexistencia de mutaciones entre los genes JAK2, MPL y CALR es muy baja, por no decir prácticamente inexistente y se prevé que el análisis de muestras JAK2V617F (+) y CALR (+), resultará negativo a mutaciones del gen MPL, como ya se pudo observar en el caso de los ensayos de CALR. Se contó con un total de 28 muestras que cumplieron los requisitos antes especificados, de las cuales 13 fueron de hombres y 15 mujeres con un promedio de edad en el grupo de 50.3 años, de este conjunto sólo 2 muestras resultaron positivas para la mutación W515L que representa el 7.143% aproximadamente y no se detectó la mutación W515K; este porcentaje está en concordancia con lo reportado en la literatura, (Pecquet, et al., 2012), de una frecuencia de 2 – 8% para las mutaciones de MPL en los casos de TE y MFP.

Los dos pacientes positivos a la mutación W515L fueron del sexo femenino con edades de 88 y 54 años, ambas llegaron con un diagnóstico presuntivo de trombocitosis esencial. Se resalta que en la literatura no se describe una mayor frecuencia de la mutación W515L respecto a la W515K, pero si ambas constituyen aproximadamente 3 cuartas partes de los casos de mutaciones del gen MPL en las NMPC, como ya se ha descrito en la literatura, (Varghese, et al., 2017).

8. 10.- Imágenes de referencia para las mutaciones R882 del exón 23 de DNMT3A

Las siguientes imágenes de referencia muestran cómo se ven los electroferogramas para las mutaciones R882 del exón 23 de DNMT3A:

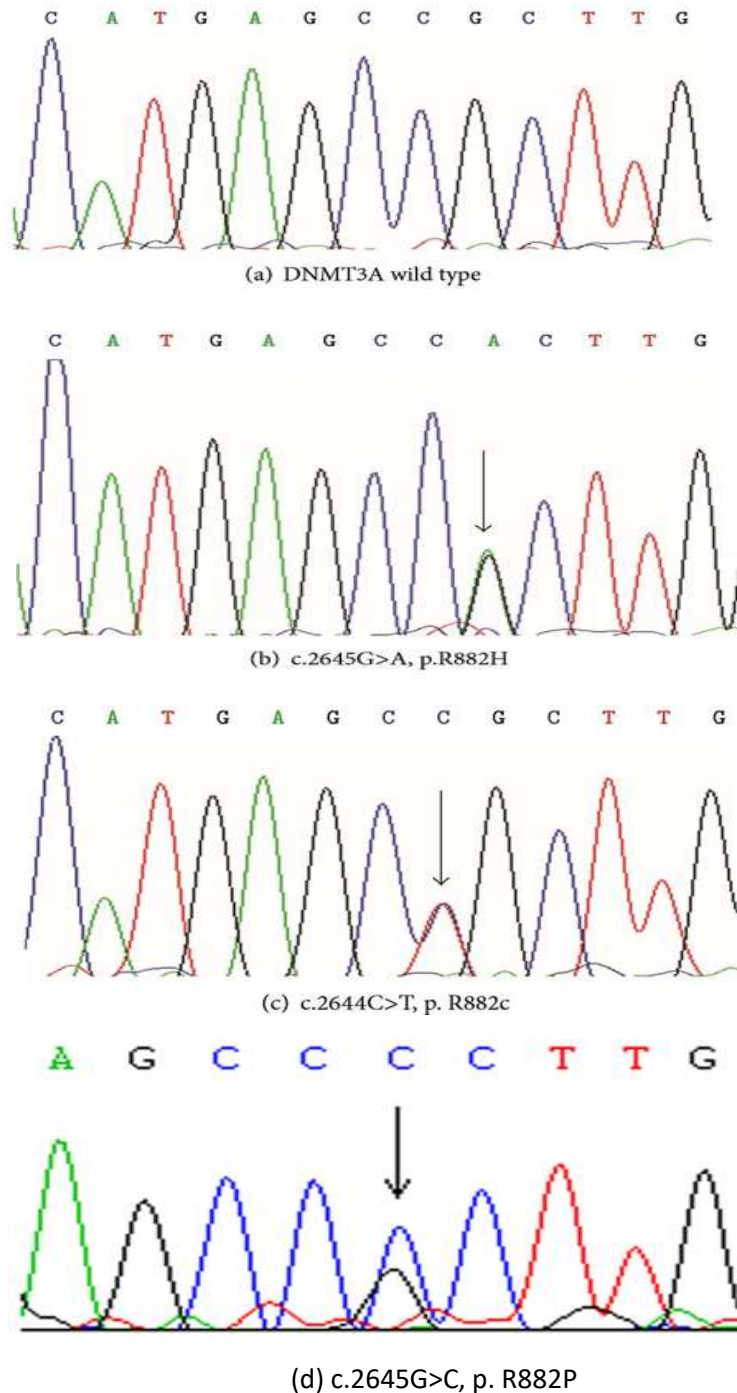


Figura 6. Imágenes de referencia que muestran los cambios de bases más frecuentes en el exón 23 de DNMT3A, responsables de la mutación R882 en el dominio metil transferasa de la enzima homónima.

a) secuencia nativa DNMT3A que muestra el codón para la arginina R (CGC).

b) mutación c.2645G>A, remplazo de la guanina de la posición 2645 por adenina, que genera el cambio del aminoácido arginina por histidina, p. R882H.

c) mutación c.2644C>T, remplazo de la citosina de la posición 2644 por timina, que genera el cambio del aminoácido arginina por cisteína, p. R882C.

d) mutación c.2645G>C, remplazo de la guanina de la posición 2645 por citosina, que genera el cambio del aminoácido arginina por prolina, p. R882P.

8. 11.- Análisis de mutaciones del exón 23 de DNMT3A, para las muestras positivas a las mutaciones tipo I y II de CALR

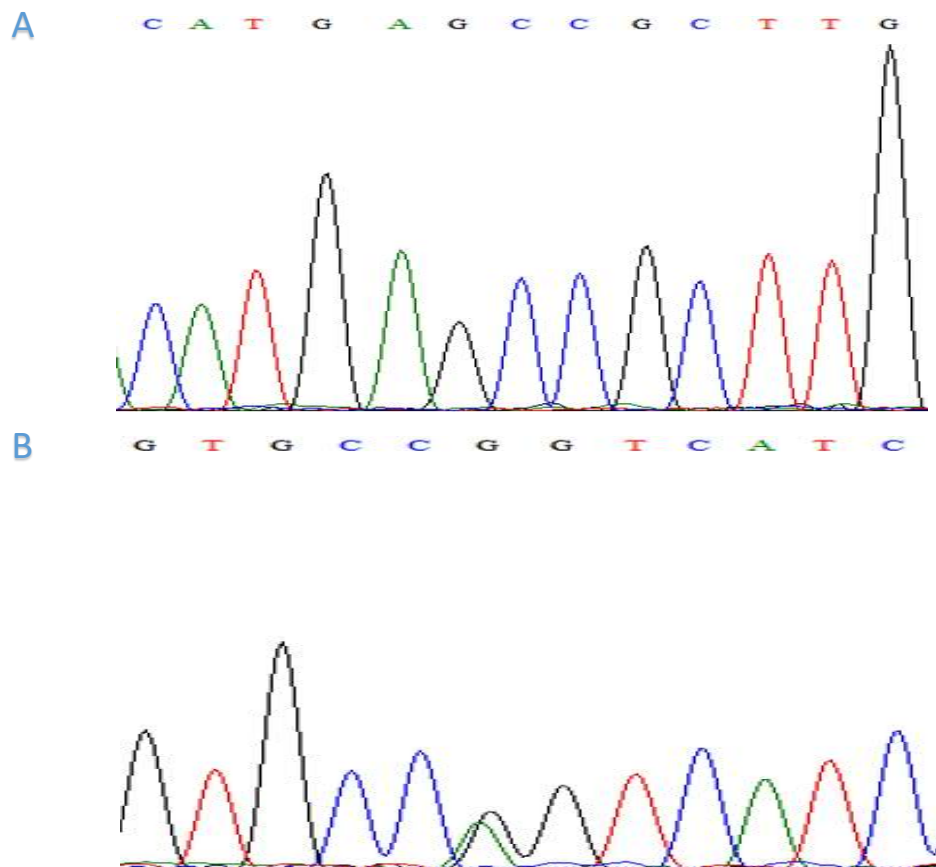


Figura 7. Electroferogramas de regiones del exón 23 de DNMT3A. **A)** electroferograma representativo de los análisis de todas las muestras seleccionadas para la detección de las mutaciones R882 en el gen DNMT3A, se presenta la región del exón 23 del gen, donde se localiza el codón CGC que codifica para la arginina y donde se presentan las mutaciones R882 y que como se observa en la imagen, ninguna muestra resulto positiva a las mismas.

B) Electroferograma de la muestra F1BM – 0618, que fue positiva para la mutación tipo 2 de CALR, en el que se muestra la región del exón 23 del gen DNMT3A donde se encontró una mutación sinónima, (no altera el aminoácido codificado), que provoca el cambio de una adenina por una guanina, en la posición 2688, (2688 A>G), pero no modifica el aminoácido codificado, en este caso prolina, P896P.

Tabla 12. – Resultados de los análisis para las mutaciones R882 del gen DNMT3 en los grupos de muestras: *CALR* +, *MPL* +, *JAK2 V617F* +, muestras triple negativas y con diagnóstico presuntivo de LMA

Muestras <i>CALR</i> +	Tipo de mutación en el gen <i>CALR</i>	Mutaciones R882 del exón 23 de <i>DNMT3A</i>	Mutaciones diferentes de la R882 en el exón 23
I8BLO - 0219	Tipo II	X	X
E9BM – 0419	Tipo I	X	X
A6BM – 0518	Tipo II	X	X
E1BM – 0618	Tipo II	X	x
F1BM – 0618	Tipo II	X	Se encontró una mutación sinónima: c.2688 A>G, p. P896P no reportada en la literatura.
I3BM – 0218	Tipo I	X	X
190BLO - 19	Tipo II	X	X
Muestras <i>MPL</i> +	Tipo de mutación en el gen <i>MPL</i>	Mutaciones R882 del exón 23 de <i>DNMT3A</i>	Mutaciones diferentes de la R882 en el exón 23
H9BM – 1018	W515L	X	X
J9BM – 0518	W515L	X	X
Muestras <i>JAK2 V617F</i> +		Mutaciones R882 del exón 23 de <i>DNMT3A</i>	Mutaciones diferentes de la R882 en el exón 23
F6BLO - 0319		X	X
E6BLO - 0319		X	X
E7BM - 0319		X	X
A8BM - 0219		X	X
E10BLO - 0419		X	X
C6BLO - 0519		X	X
J4BM - 0819		X	X
Muestras triple negativas con diagnóstico de NMPC		Mutaciones R882 del exón 23 de <i>DNMT3A</i>	Mutaciones diferentes de la R882 en el exón 23
F5BLO – 0319		X	X
D5BLO – 0319		X	X
A1BLO - 0718		X	X
B1BLO - 0518		X	X
B1BM - 0419		X	X
E6BLO - 0119		X	X

I4BLO -0519		X	X
Muestras presuntivas de LMA		Mutaciones R882 del exón 23 de DNMT3A	Mutaciones diferentes de la R882 en el exón 23
B1B-F		X	X
C2B-F		X	X
M3B-F		X	X

8. 12.- Discusion de los resutados de los analisis de las mutaciones del exón 23 de DNMT3A

Se secuenciaron y analizaron por el método de Sanger un total de 26 muestras para las mutaciones R882 del exón 23 de DNMT3A repartidas en 5 diferentes grupos que fueron: muestras CALR (+), MPL (+), JAK2V617F (+), muestras triple negativas y muestras con presunto diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA). Como ya se describió el grupo CALR (+), estaba conformado por 5 mujeres y 2 hombres con una media de edad de 55.7 años, los pertenecientes al conjunto MPL (+) fueron dos mujeres con edades de 88 y 54 años, todos los pacientes pertenecientes a estos dos grupos llegaron con un diagnóstico presuntivo de trombocitosis esencial. Los pacientes JAK2V617F (+) estuvieron conformados por 2 hombres y 5 mujeres con una media de edad de 72.3 años, todos con diagnóstico de trombocitosis esencial, policitemia vera o NMPC sin especificar subtipo; el grupo triple negativo integrado de 3 hombres y 4 mujeres, media de edad de 54.86 años igualmente presentaba en su mayoría diagnósticos de TE, uno de PV y uno de NMPC sin especificar subtipo y finalmente, el último grupo del que se desconocen los datos de edad y género, llegaron únicamente con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide aguda (LMA). Con base en los análisis de las muestras se confirma que todas resultaron negativas a las mutaciones R882 del exón 23 de DNMT3A; como ya se mencionó, la mutación R882 de DNMT3A es la más frecuente en los casos de las mutaciones de este gen y

se presenta de forma mayoritaria en los casos de LMA y LMA secundaria o resultado de la evolución de las NMPC, y en referencia a estas la tasa más alta de mutaciones de DNMT3A es para los pacientes con MFP particularmente los que son MF-post TE y MF-post PV (mielofibrosis que surgió de la evolución de una TE o PV), seguido de los casos de PV y por último los de TE. De esta manera, es posible explicar nuestros resultados, dado que la mayoría de los pacientes analizados llegaron con un diagnóstico de TE, sumado al hecho de que todos los diagnósticos fueron de novo y por lo tanto en estadios bien definidos de las NMPC, sin reportes de evolución previa (MF-post TE, MF-post PV y LMA secundaria), en los cuales se reporta la frecuencia mayor de mutaciones de DNMT3A. Por lo tanto, basados en los resultados de nuestro estudio podemos concluir que las mutaciones R882 no se presentan y por lo tanto no coexisten con las mutaciones tipo I y II de CALR, ni con las mutaciones W515L/K de MPL en los casos de PV y TE. Sin embargo, en el caso de la muestra F1BM-0618, CALR II (+) se encontró una mutación adicional del tipo sinónima no reportada de DNMT3A (c.2688 A>G, p. P896P) y que por lo tanto no altera el aminoácido que codifica en la secuencia nativa (prolina). Para los casos JAK2 V617F (+) se ha reportado, (Nangalia, et al., 2015), que las mutaciones de DNMT3A pueden ser previas a la adquisición de esta mutación, lo que es indicativo de su importancia en el origen de estas neoplasias y en la modificación del fenotipo de las NMPC y se ha descrito además que existe una coexistencia baja entre las mismas, (alrededor del 1-2%), (Nangalia, et al., 2015). Sin embargo, en nuestro análisis no se presentó, debido a la poca cantidad de muestras; para los casos triple negativos tampoco se detectó la mutación R882, que se estima estos pacientes no presentaban ninguna neoplasia mieloproliferativa crónica dado los resultados negativos para las mutaciones en los principales marcadores moleculares que las definen (JAK2, CALR y MPL) pero que llegaron con un diagnóstico presuntivo de las mismas y finalmente,

también los pacientes con sospecha de LMA resultaron negativos a las mutaciones R882 de DNMT3A.

9.- Discusión general

Como conclusión de todo lo que se ha discutido hasta el momento tenemos que el diseño de los cebadores y la programación de las condiciones de la PCR para los genes CALR, MPL y DNMT3A, resultó funcional tanto para la amplificación de los exones de interés como en la identificación de las mutaciones tipo I y II de CALR y W515L/K de MPL, basadas en los cebadores alelo específicos. En cuanto a la población estudiada, 46 pacientes llegaron con un diagnóstico de NMPC, de los cuales 35 eran *JAK2 V617F* – y 11 *JAK2 V617F* + y tres con diagnóstico presuntivo de LMA, la gran mayoría de los mismos con una edad superior a los 50 años y una dominancia del sexo femenino.

Para el caso de los análisis de CALR, 7 muestras resultaron positiva a las mutaciones tipo I y II, que representa el 20% del conjunto *JAK2 V617F* –. De estos 7 pacientes (5 mujeres y 2 hombres), 5 fueron positivos para la mutación tipo II y 2 para la tipo I, el promedio de edad de este grupo CALR positivo fue de 55.7 años, en el que se encontraron dos pacientes relativamente jóvenes de 30 y 43 años. Todos estos pacientes positivos a mutaciones de CALR tenían un diagnóstico presuntivo de trombocitosis esencial y la muestra E1BM-0618 presentaba adicionalmente la anormalidad citogenética trans (6/12) que es considerada rara y se reporta que puede ocurrir tanto en trastornos mieloides y linfoides. Es importante mencionar que estos pacientes no llegaron con un diagnóstico confirmado de NMPC y por eso solo se maneja como presuntivo; debido a ello, el porcentaje de casos positivos a mutaciones de calreticulina no fue tan elevado, pero sigue entrando en los intervalos

descritos en la literatura de 20-25% de mutaciones de *CALR* en los casos de TE (Rumi & Cazzola, 2017).

Las mutaciones de calreticulina fueron todas heterocigotas y se presentaron en pacientes más jóvenes en comparación con aquellos que portan la mutación *JAK2V617F*, con una mayor prevalencia de la tipo II en los casos de TE, recordando que esta mutación retiene aproximadamente la mitad de los aminoácidos con carga negativa del dominio ácido C-terminal de *CALR* en comparación con la tipo I que los elimina casi todos y que por ello se puede considerar menos destructiva y de menor impacto que la tipo I. Todo esto concuerda con lo descrito en la literatura, (Bellosillo & Rozman, 2016), de una mayor prevalencia de la mutación tipo I en la mielofibrosis, que es una patología más maligna en relación con la trombocitosis dentro del espectro de las NMPC. La única discrepancia en nuestro estudio fue una mayor frecuencia de mutaciones en este gen en el sexo femenino que difiere de lo reportado para *CALR*, que apunta a una mayor incidencia en hombres.

En los análisis de MPL se contó con un total de 28 muestras (*JAK2 V617F* –), de las cuales 13 fueron de hombres y 15 mujeres con un promedio de edad en el grupo de 50.3 años; de este conjunto, solo 2 muestras resultaron positivas para la mutación W515L que representa el 7.143% aproximadamente y no se detectó la mutación W515K; este porcentaje está en concordancia con lo reportado en la literatura, (Graaf & Metcalf, 2011), de una frecuencia de 2 – 8% para las mutaciones de MPL en los casos de TE y MFP. Los dos pacientes positivos a la mutación W515L fueron del sexo femenino con edades de 88 y 54 años, ambas llegaron con un diagnóstico presuntivo de trombocitosis esencial. Se resalta que en la literatura, (Graaf & Metcalf, 2011), no se describe una mayor frecuencia de la mutación W515L respecto a la W515K, pero si ambas constituyen aproximadamente 3 cuartas partes de los

casos de mutaciones del gen MPL en las NMPC, como ya se ha descrito en la literatura, (Tefferi, & Pardanami, 2015).

Para *DNMT3A* se secuenciaron y analizaron por el método de Sanger un total de 26 muestras para las mutaciones R882 del exón 23 de DNMT3A repartidas en 5 diferentes grupos que fueron: muestras CALR (+), MPL (+), JAK2V617F (+), muestras triple negativas y muestras con presunto diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA). Como ya se describió el grupo CALR (+), estaba conformado por 5 mujeres y 2 hombres con una media de edad de 55.7 años; los pertenecientes al conjunto MPL (+) fueron dos mujeres con edades de 88 y 54 años, todos los pacientes pertenecientes a estos dos grupos llegaron con un diagnóstico presuntivo de trombocitosis esencial. Los pacientes JAK2V617F (+) estuvieron conformados por 2 hombres y 5 mujeres con una media de edad de 72.3 años, todos con diagnóstico de trombocitosis esencial, policitemia vera o NMPC, sin especificar subtipo; el grupo triple negativo integrado de 3 hombres y 4 mujeres, con media de edad de 54.86 años, igualmente presentaba en su mayoría diagnósticos de TE, uno de PV y uno de NMPC sin especificar subtipo y finalmente, el último grupo del que se desconocen los datos de edad y género, llegaron únicamente con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide aguda (LMA). Con base en los análisis de las muestras se confirma que todas resultaron negativas a las mutaciones R882 del exón 23 de DNMT3A; como ya se mencionó, la mutación R882 de DNMT3A es la más frecuente en los casos de las mutaciones de este gen y se presenta de forma mayoritaria en los casos de LMA y LMA secundaria o resultado de la evolución de las NMPC y en referencia a estas la tasa más alta de mutaciones de DNMT3A es para los pacientes con MFP particularmente los que son MF-post TE y MF-post PV (mielofibrosis que surgió de la evolución de una TE o PV), seguido de los casos de PV y por último los de TE. De esta

manera, es posible explicar nuestros resultados, dado que la mayoría de los pacientes analizados llegaron con un diagnóstico de TE, sumado al hecho de que todos los diagnósticos fueron de novo y por lo tanto, en estadios bien definidos de las NMPC, sin reportes de evolución previa, (MF-post TE, MF-post PV y LMA secundaria), en los cuales se reporta la frecuencia mayor de mutaciones de DNMT3A. Entonces, basados en los resultados de nuestro estudio podemos concluir que las mutaciones R882 no se presentan y por lo tanto no coexisten con las mutaciones tipo I y II de CALR, ni con las mutaciones W515L/K de MPL en los casos de PV y TE. Sin embargo, en el caso de la muestra F1BM-0618, CALR II (+) se encontró una mutación adicional del tipo sinónima no reportada de DNMT3A (c.2688 A>G, p. P896P) y que no altera el aminoácido que codifica en la secuencia nativa (prolina). Para los casos JAK2 V617F (+) se ha reportado que las mutaciones de DNMT3A pueden ser previas a la adquisición de esta mutación, lo que es indicativo de su importancia en el origen de estas neoplasias y en la modificación del fenotipo de las NMPC y se ha descrito además que existe una coexistencia baja entre las mismas (alrededor del 1-2%) (Nangalia, et al., 2015). Sin embargo, en nuestro análisis no se presentó, debido a la poca cantidad de muestras; para los casos triple negativos tampoco se detectó la mutación R882, que se estima estos pacientes no presentaban ninguna neoplasia mieloproliferativa crónica dado los resultados negativos para las mutaciones en los principales marcadores moleculares que las definen (JAK2, CALR y MPL) pero que llegaron con un diagnóstico presuntivo de las mismas y finalmente, también los pacientes con sospecha de LMA resultaron negativos a las mutaciones R882 de DNMT3A.

10.- Resumen de resultados

Tabla 13. – Resumen de resultados de las muestras positivas a mutaciones de CALR, MPL y DNMT3A, todas pertenecientes al grupo JAK2 V617F -

Muestras JAK2 V617F -					
Muestras CALR +	Diagnóstico	Sexo y edad	Tipo de mutación de CALR	Mutaciones del exón 23 de DNMT3A	Estudios adicionales
I8BLO - 0219	TE	Femenino 30 años	tipo II	negativo	BCR-ABL (-)
E9BM – 0419	TE	Femenino 70 años	tipo I	negativo	BCR-ABL (-) Cariotipo normal
A6BM – 0518	TE	Femenino 57 años	tipo II	negativo	-
E1BM – 0618	TE	Femenino 56 años	tipo II	negativo	Trans (6/12); BCR-ABL (-)
F1BM – 0618	TE	Femenino 76 años	tipo II	mutación sinónima: c.2688 A>G, p. P896P	BCR-ABL (-)
I3BM – 0218	TE	Masculino 58 años	Tipo I	negativo	-
190BLO - 19	TE	Masculino 43 años	Tipo II	negativo	-
Muestras MPL positivas	Diagnóstico	Sexo y edad	Tipo de mutación de MPL	negativo	Datos adicionales
H9BM – 1018	TE	Femenino 88 años	W515L	negativo	-
J9BM – 0518	TE	Femenino 54 años	W515L	negativo	BCR-ABL (-) Cariotipo normal

11.- Conclusión

Finalmente, se concluye que la frecuencia de las mutaciones más características de los genes CALR, MPL y DNMT3A en las NMPC en esta muestra de la población mexicana coincide con lo reportado en la literatura para otras poblaciones y no se cumplió la hipótesis de la coexistencia de mutaciones entre los genes JAK2, CALR y MPL con las mutaciones R882 de DNMT3A, pero cabe especificar que no se contó con muestras MF-post TE, MF-post PV y LMA secundaria.

12.- Perspectiva

Como perspectiva, para futuros estudiantes, se planea realizar un seguimiento más exhaustivo de la evolución de los pacientes para así identificar los casos que sean preferentemente MF-post TE, MF-post PV y de leucemia mieloide aguda secundaria, así como también en los estadios iniciales de la aparición de las NMPC.

Esto permitirá poner en contraste el estatus mutacional de DNMT3A en cuanto a la progresión de estas neoplasias y detectar el orden de aparición de los principales marcadores moleculares que caracterizan a las neoplasias mieloproliferativas crónicas y cómo influye esto en el fenotipo de estos cánceres.

Se plantea también el análisis de mutaciones de más genes del grupo de regulación epigenética entre los que destacan TET2 e IDH1/2 para un análisis más completo de todo el espectro mutacional de las NMPC.

13.- Bibliografía

- Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J. D., . . . Casetti, I. (2013). Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *The new england journal of medicine*, 369(25), 2379-2390.
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature*; 19(2), 81-92.
- Melo, J. V., Hughes, T. P., & Apperley, J. F. (2003). Chronic Myeloid Leukemia. *Hematology* 17(1), 132-152.
- Mondet, J., Park, J.-H., Menard, A., Marzac, C., Carillo, S., Pourcelot, E., . . . Bulabois, C.-E. (2015). Endogenous megakaryocytic colonies underline association between megakaryocytes and calreticulin mutations in essential thrombocythemia. *Haematologica*, 100(5), 1176-1178.
- Quintás-Cardama, A., & Cortes, J. (2008). Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *blood*; 113(8), 1619-1630.
- Rumi, E., & Cazzola, M. (2017). Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical. *Blood*; 129(6), 680-692.
- Alvarez, L. A., Bellosillo, B., & Martínez, A. L. (2009). Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *British journal of haematology*; 146(5), 504-509.
- Araki, M., & Komatsu, N. (2017). Novel molecular mechanism of cellular transformation by a mutant molecular chaperone in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Science*, 108(10), 1907-1912.
- Araki, M., Yang, Y., Masubuchi, N., Hironaka, Y., Takei, H., Morishita, S., . . . Komatsu, N. (2016). Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 127(10), 1307-1316.
- Bedard, K., Szavo, E., Michalak, M., & Opas, M. (2005). Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *International Review of Cytology*, 245, 91-121.
- Bellosillo, B., & Rozman, M. (22 de julio de 2016). *Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas*. Obtenido de http://www.sehh.es/images/stories/recursos/2017/09/08/DOCGUIAGEMFINDEF2_octubre_infinitem.pdf
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019-5032.
- Cazzola, M., & Kralovics, R. (2014). From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123(24), 3714-3719.

- Challen, G. A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J. S., . . . Godley, L. A. (2011). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature Genetics*, 44(1), 23-31.
- Chih-Cheng , C., Jyh-Pyng , G., Chou, H.-J., You, J.-Y., Huang, C.-E., Chen, Y.-Y., . . . Lu, C.-H. (2014). Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Annals of Hematology*, 93(12), 2029-2036.
- Furtado, L. V., Weigelin, H. C., Johnson, E., & Betz, B. L. (2013). Detection of MPL Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy. *Elsevier*; 15(6), 810-818.
- Gianina Valerio , D. (2016). *Epigenetic Regulation of Hematopoiesis and Acute Leukemia*. La Jolla, USA.
- Graaf , C. A., & Metcalf, D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle*, 10(10), 1582-1589.
- Guglielmelli, P., Nangalia, J., Green, A. R., & Vannucchi, A. M. (2014). CALR MUTATIONS IN MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS: HIDDEN BEHIND THE RETICULUM. *American Journal of Hematology*, 89(5), 453-456.
- Heller, P. G. (2015). Biología molecular de las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas: 10 años después del JAK2. *HEMATOLOGIA*; 19(NA), 40-44.
- Heller, P., Kornblihtt, L., & Larripa, I. (2017). Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Clásicas BCR-ABL negativas. *SOCIEDAD ARGENTINA DE HEMATOLOGÍA*, 318-362. Obtenido de Sociedad Argentina de Hematología: <http://sah.org.ar/docs/2017/010-Neoplasias%20mieloproliferativas%20cr%C3%B3nicas%20cl%C3%A1sicas%20BCR-ABL%20negativas.pdf>
- Hitchcock , I. S., & Kaushansky, K. (2014). Thrombopoietin from beginning to end. *Thrombopoietin from beginning to end*, 165(2), 259-268.
- Holz-Schietinger, C., Matje, D. M., & Reich, N. O. (2012). Mutations in DNA Methyltransferase (DNMT3A) Observed in Acute Myeloid Leukemia Patients Disrupt Processive Methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 30941-30951.
- Ji Hun, J., Hwan Tae, L., Ja Young, S., Yiel Hea, S., Kyung Hee, K., Moon Jin, K., . . . Jun Shik, h. (2016). Screening PCR Versus Sanger Sequencing: Detection of CALR Mutations in Patients With Thrombocytosis. *Annals of Laboratory medicine*, 36(4), 291-299.
- Jones , A. V., & Cross, N. C. (2013). Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Therapeutic Advances in Hematology*, 4(4), 237-253.
- Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and. *Blood Cancer Journal*, 6(7), 441-451.
- Lavi, N. (2014). Calreticulin Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 5(4), 745- 753.

Leroy, E., Defour, J.-P., Sato, T., Dass, S., Gryshkova, V., Myat Marlar, S., . . . Smith, S. O. (2015). His499 Regulates Dimerization and Prevents Oncogenic Activation by Asparagine Mutations of the Human Thrombopoietin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 291(6), 2974-2987.

Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., . . . Skoda, R. C. (2014). Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123(14), 2220-2228.

M. Scott, L., Tong, W., L. Levine, R., Scott, M., Beer, P., Stratton, M., . . . McMullin, m. F. (2007). JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *The new england journal of medicine*, 356(5), 459-468.

McKenzie, S. (2000). *Hematologia clinica*. Mexico: El manual moderno.

McLornan, D., Percy, M., & McMullin, M. (2006). JAK2 V617F: A Single Mutation in the Myeloproliferative Group of Disorders. *The Ulster Medical Journal*, 75(2), 112-119.

Melo, J. V., & Barnes, D. J. (2007). Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human. *Nature reviews Cancer*; 7(6), 441–453.

Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I., & Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum . *Biochemical Journal*, 417(3), 651-666.

Milosevic , J. D., & Kralovics, R. (2013). Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol*, 97(2), 183–197 .

Nangalia, J., Massie, C., Baxter, E., Nice, F., Gundem, G., Wedge, D., . . . Aziz, A. (2013). Somatic CALR Mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The new england journal of medicine*, 369(25), 2391-2405.

Nangalia, J., Nice, F. L., Wedge, D. C., Godfrey, A. L., Grinfeld, J., Thakker, C., . . . Sewell, D. (2015). DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica*, 100(11), 438-442.

Pecquet, C., Diaconu, C. C., Staerk, J., Girardot, M., Marty, C., Royer, Y., . . . Vainchenker, W. (2012). Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood*, 119(20), :4625–4635.

Peedicayil, J. (2006). Epigenetic therapy - a new development in pharmacology. *INDIAN J MED RES*, 17-24.

Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C. D., Jensen, C. T., Antonchuk, J., Mansson, R., . . . Jacobsen, S. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 1(6), 671-684.

Quintás-Cardama , A., & Cortes, J. (2008). Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood*, 113(8), 1619-1630.

- Royer, Y., Staerk, J., Costuleanu, M., Courtoy, P. J., & Constantinescu, S. N. (2005). Janus Kinases Affect Thrombopoietin Receptor Cell Surface Localization and Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 27251-27261.
- Savage, D. G., Szydlo, R. M., & Goldman, J. (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-years period. *BR. J Haemol*; 96(5), 111-116.
- Sawyers, C. L. (1999). Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 340(17), 1330-1340.
- Schlenk, R. F., Döhner, K., Krauter, J., Fröhling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., . . . Schlegelberger, B. (2008). Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 358(18), 1909-1918.
- Seo, A., Ben-Harosh, M., Sirin, M., Stei, J., Dgany, O., Kaplulushnik, J., . . . Lee, M. K. (2017). Bone marrow failure unresponsive to bone marrow transplant is caused by mutations in thrombopoietin. *Blood*, 130(7), 875-880.
- Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P., & Levine, R. L. (2012,). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature* 12(9), 599-612.
- Shivarov, V., Ivanova, M., & Naumova, E. (2014). Rapid Detection of DNMT3A R882 Mutations in Hematologic Malignancies Using a Novel Bead-Based Suspension Assay with BNA(NC) Probes. *Ploa One*, 9,(6), 1-8.
- Spivak, J. L. (2010). Thrombocytosis, Polycythemia Vera, and JAK2 Mutations: The Phenotypic Mimicry of Chronic Myeloproliferation. *Annals of Internal Medicine*, 152(5), 300-306.
- Staer, J., Lacout, C., Sato, T., Smith, S. O., Vainchenker, W., & Constantinescu, S. N. (2006). An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents a utonomous activation of the thrombopoietin receptor. *BLOOD*, 107(5), 1864-1871.
- Staerk, J., Defour, J.-P., Pecquet, C., Leroy, E., Antoine-Poirel, H., Brett, I., . . . Constantinescu, S. (2011). Orientation-specific signalling by thrombopoietin receptor dimers. *The EMBO Journal*, 30(21), 4398-4413.
- Stefanska, B. (2015). Epigenetics and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*; 172, 2701-2704.
- Sun, C., Zhou, X., Zou, S.-J., Guo, H.-F., Li, J.-Y., & Qiao, c. (2016). Clinical Manifestation of Calreticulin Gene Mutations in Essential Thrombocythemia without Janus Kinase 2 and MPL Mutations: A Chinese Cohort Clinical Study. *Chinese Medical Journal*; 129(15), 1778-1783.
- Sun, C., Zhang, S., & Li, J. (2014). Calreticulin gene mutations in myeloproliferative neoplasms without Janus kinase 2 mutations. *Leukemia & Lymphoma*, 56(6), 1593-1598.

Takei, H., Morishita, S., Araki, M., Edahiro, Y., Sunami, Y., Hironaka, Y., . . . Komatsu, N. (2014). Detection of MPLW515L/K mutations and determination of allele frequencies with a single-tube PCR assay. *Plos one*, 9(8), 1-8.

Tefferi, , A., & Pardanami, A. (2015). Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. *JAMA oncology*, 1(1), 97-105.

Varghese, L. N., Defour, J.-P., Pecquet, C., & Constantinescu, S. N. (2017). The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin. *Frontiers in Endocrinology*, 8(59), 1-13.

velazquez, F., Angel, M., Torrano, R., Garrido, E., & ruiz, R. (15 de julio de 2015). LA CALRETICULINA ES UN COMPONENTE CENTRAL EN LA REGULACIÓN DE DIFERENTES PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS EN LA CÉLULA. *REB*, 34(3), 72-80.

Wenji, L., & yu, Z. (2015). Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Stem Cell Investig*, 2(16), 515-523.

