



Neoplasias Mieloproliferativas: Desafíos y soluciones en diagnóstico y pronóstico molecular

*Paola Andrea Acevedo Toro
Msc Ciencias básicas biomédicas
Docente de Hematología- Escuela de Microbiología
Coordinadora grupo Hematopatología Molecular (HEMO)
Universidad de Antioquia*



COLABIOCLI
Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica



Colegio Nacional de Bacteriología



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**
1803

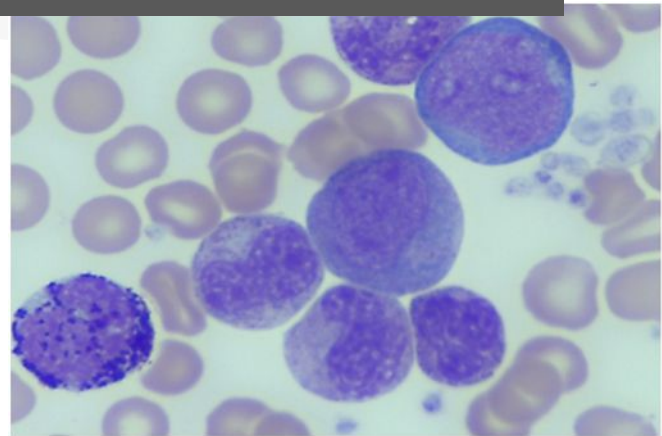
Contenido

I. Contextualización NMP

II. LMC

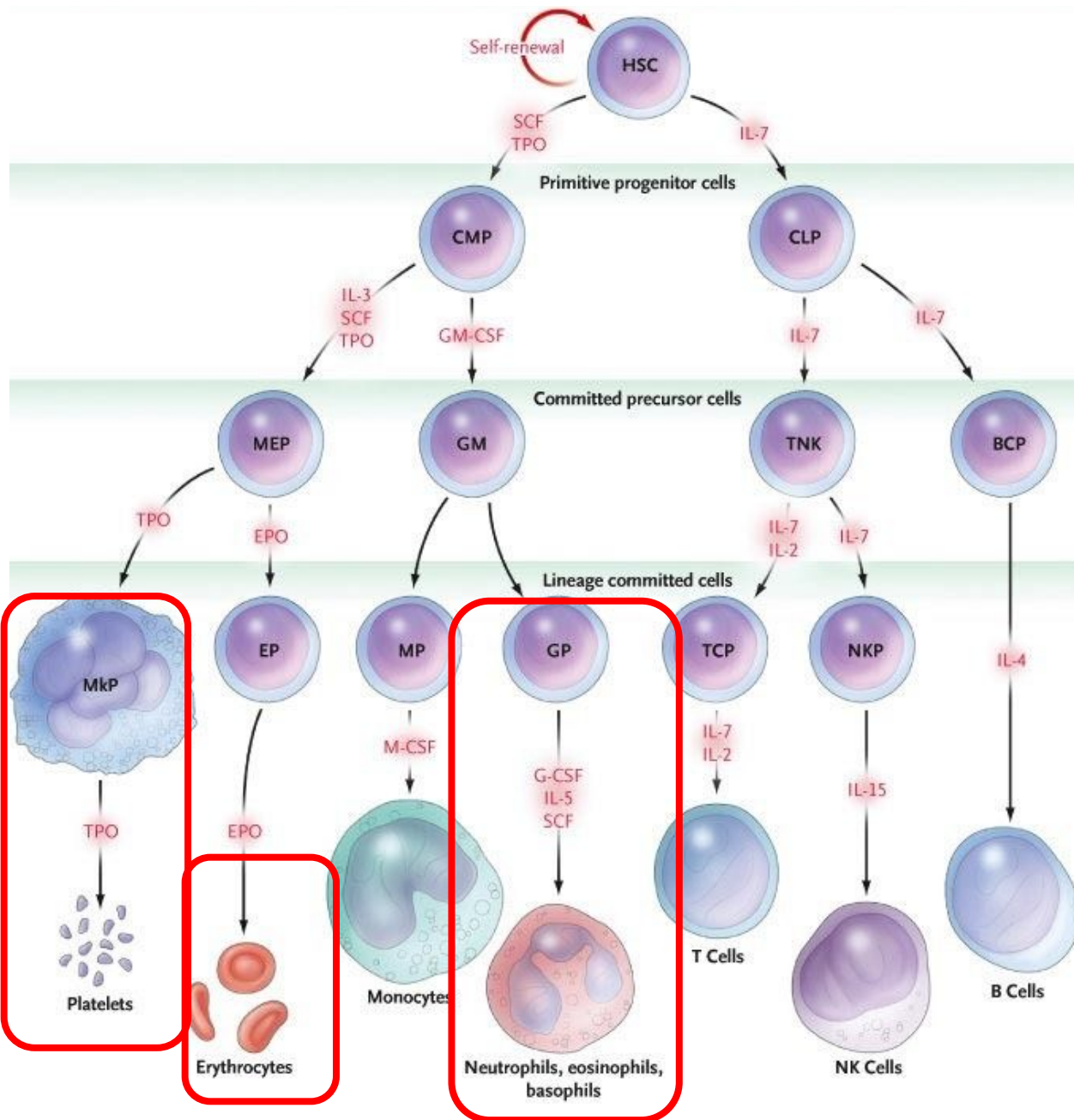
III. NMP *BCR::ABL* Neg

III. Relevancia de los hallazgos moleculares

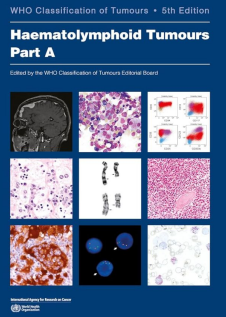


Contextualización NMP

- Desórdenes clonales de la CMH.
- Proliferación de uno o más linajes mieloides (granulocítico, eritroide y megacariocítico)
- Activación constitutiva de receptores.
- Se presentan en adultos con picos de incidencia entre la 5ª y 7ª década de la vida



OMS 2008 / 2016 / 2022



Mastocitosis

Deja de ser considerada
NMP características
únicas (Enf. cutánea
indolente a sistémica
agresiva).

Mutaciones

Adicionales a JAK2: MPL,
CALR clonalidad,
importancia en Dx y Px
CSF3R asociada a LNC

Cambios en niveles de Hb
(subdiagnosticada 2008) y
utilidad
de la morfología M.O

Policitemia

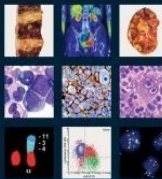
- $\neq$ entre TE verdadera y preMFP. CM estandarizados para mejorar la reproducibilidad interobservador (76 a 88%)
- Se Incluye la LMMJ

Morfología

Se elimina la Fase
Acelerada

LMC

WHO Classification of Tumours of
Haematopoietic and Lymphoid Tissues



Haematolymphoid Tumours Part A

Edited by the WHO Classification of Tumours Editorial Board

NMP

Leucemia Mieloide crónica

Policitemia Vera

Trombocitemia esencial

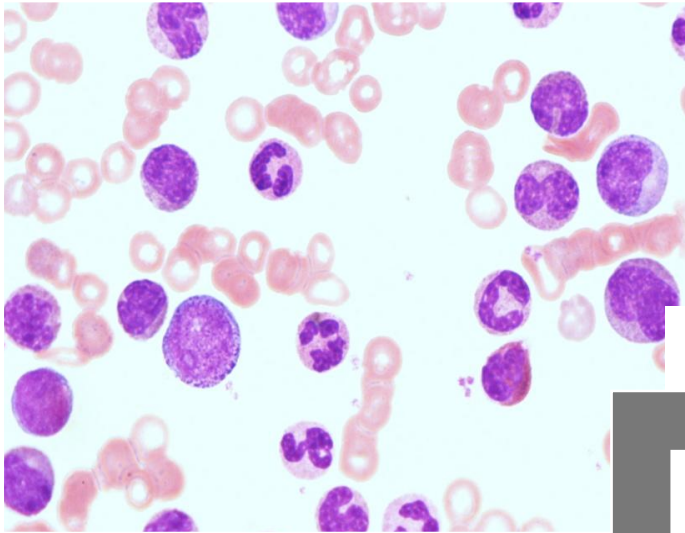
Mielofibrosis primaria

Leucemia Neutrofílica Crónica

Leucemia eosinofílica crónica

Leucemia Mielomonocítica Juvenil

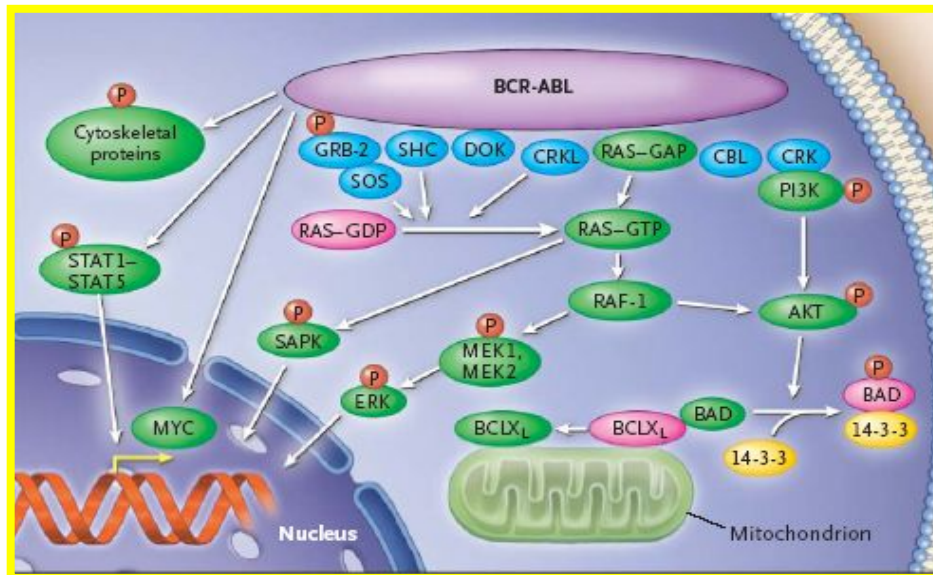
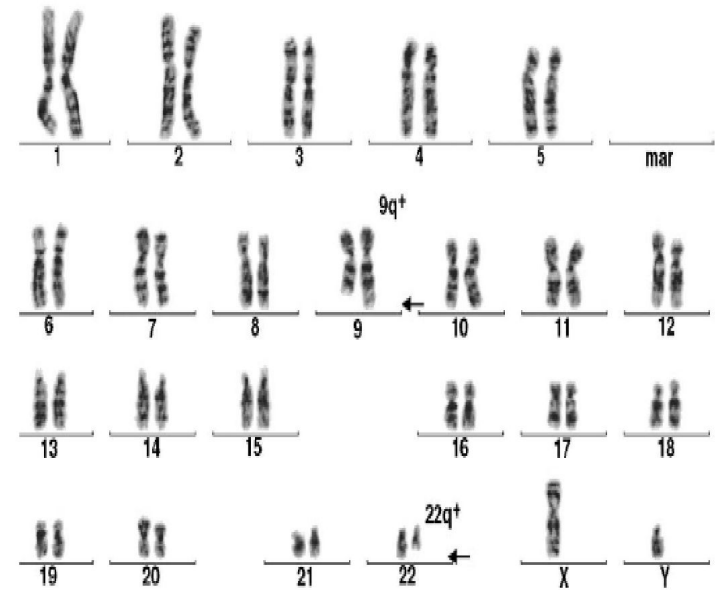
Neoplasias mieloproliferativas sin
especificar



LMC

- Proliferación de células granulocíticas en estados avanzados de maduración
- Edad adulta: 50 años
- Anomalía adquirida: t 9;22 /BCR::ABL, aumento actividad protooncogenes -ROS

LMC – Marcador Clonal



LMC – Fase Crónica

Examen Fase	Hemograma	Extendido de Sangre Periférica	Aspirado de Médula ósea
Crónica	– Leucocitosis. – Trombocitosis o recuento de plaquetas normal. – Anemia.	– Leucocitosis. – Todos los estados granulocíticos, en especial mielocitos y polimorfonucleares. – Basofilia (<20%). – Eosinofilia. – Monocitos <3% – Recuento de blastos generalmente < 2%. – Micromegacariocitos o plaquetas anormales.	– Hipercelular con aumento de la proliferación de granulocitos y disminución de precursores eritroides. – Recuento de blastos generalmente menor al 5%, pero pueden verse hasta un 9%. – Número variable de megacariocitos, algunos con tamaño reducido y núcleo hipolobulado.
	– Aumento persistente del recuento de leucocitos. – Trombocitosis o trombocitopenia que no se relacionan con la terapia. – Anemia.	– >20% de basófilos – 10 – 19% de mieloblastos – Puede verse displasia granulocítica como pseudo Pelger-Huët.	– Hipercelular – 10-19% mieloblastos. – Se observa mielodisplasia.

LMC – Fase Blástica

Examen Fase	Hemograma	Extendido de Sangre Periférica	Aspirado de Médula ósea
Blástica	- Anemia. - Trombocitopenia.	- Más del 20% de blastos, pueden ser linfoides o mieloides.	- $\geq 20\%$ blastos en el recuento de células nucleadas. - Pueden observarse cúmulos de blastos.

Características en Fase Crónica Asociadas a Progresión

-Puntuación alta en ELTS

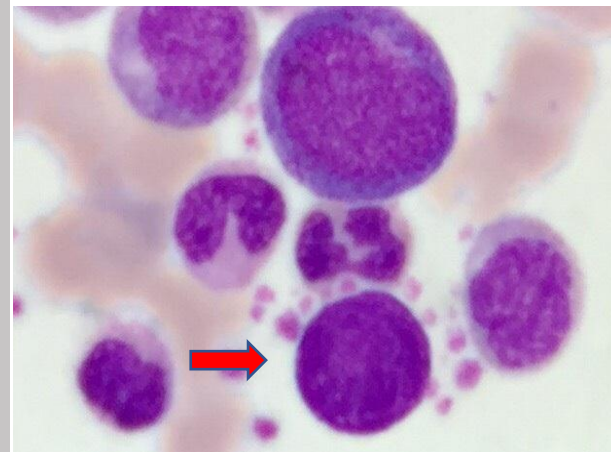
-10–19% de blastos en sangre periférica y/o médula ósea

· $\geq 20\%$ de basófilos en la sangre periférica

-Anomalías cromosómicas adicionales a Ph+: reordenamientos 3q26.2, monosomía 7, isocromosoma 17q y cariotipo complejo, +8, reordenamientos 11q23, +19, +21, Ph+ adicional

- Grupos de pequeños megacariocitos (incluidos micromegacariocitos).

-Rx a los ITK's ó mutaciones en el dominio kinasa



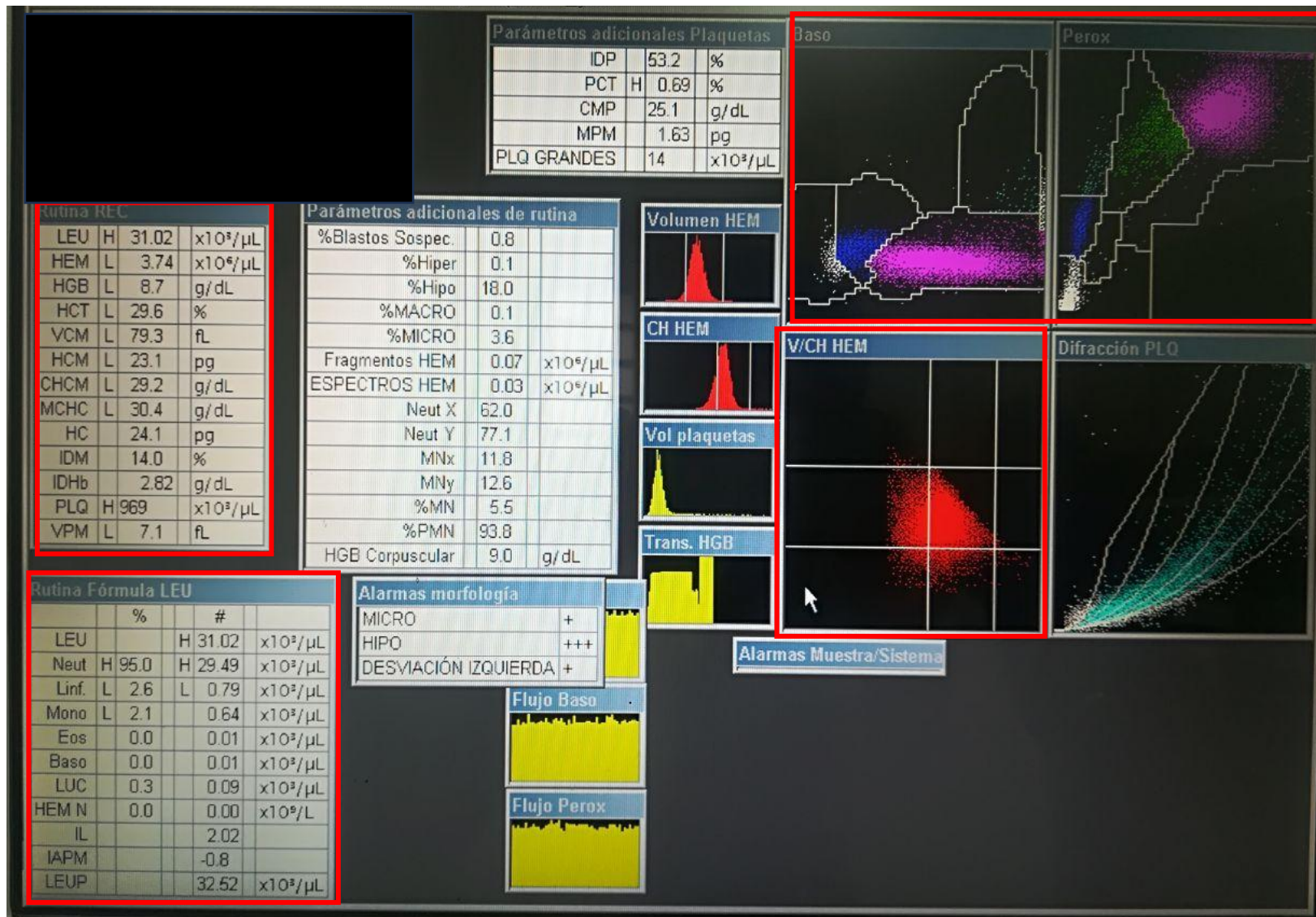
*.... Analicemos el primer
caso*



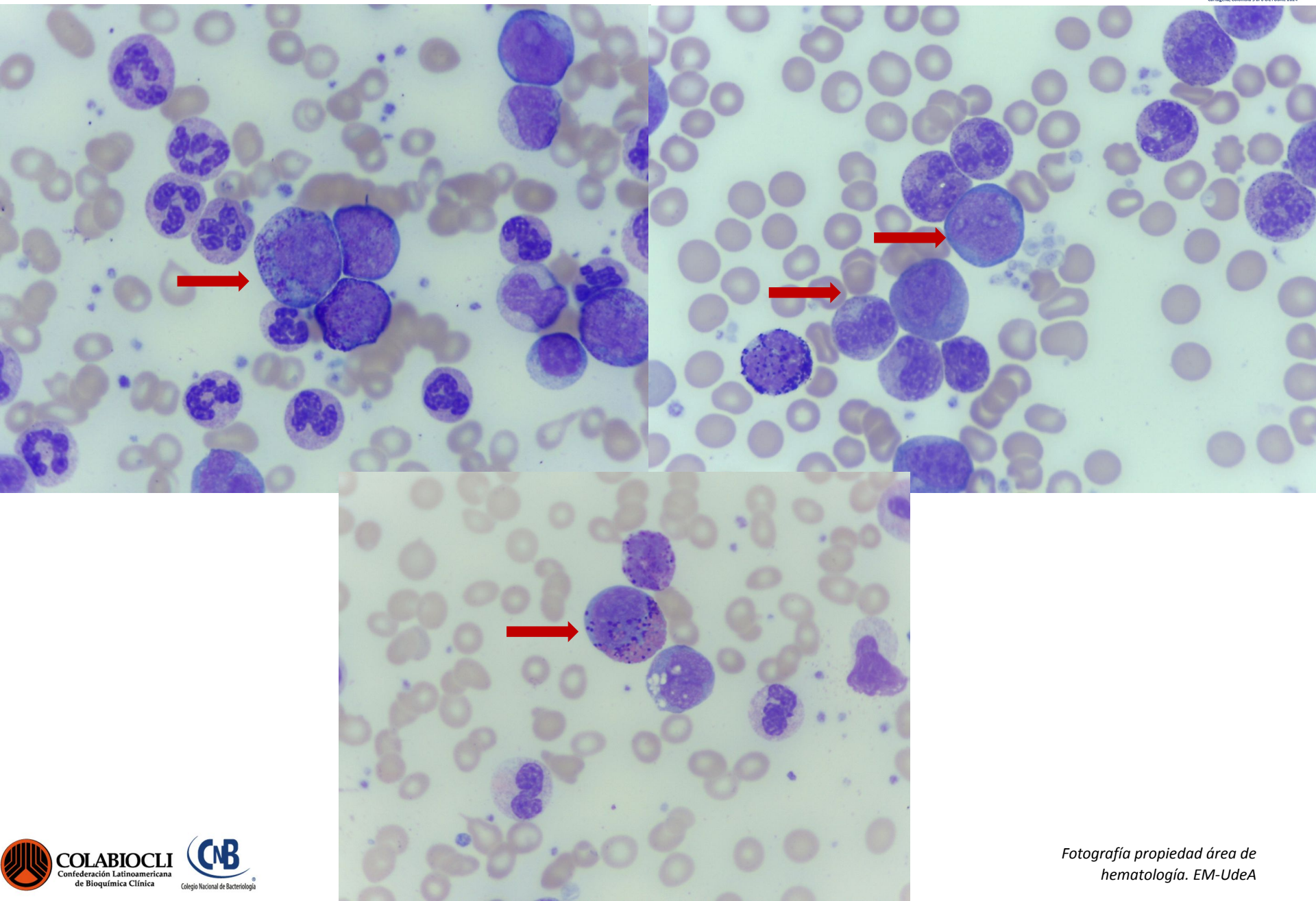
Caso clínico

**Paciente masculino de 54 años de edad,
presenta al examen físico palidez en piel y
mucosas, astenia, perdida de peso,
sudoración nocturna y sensación de
pesadez en hipocondrio izquierdo**

Caso clínico



Caso clínico





Caso clínico - Diferencial

Formula diferencial	(%)	Valor de Referencia (%)
Bandas neutrófilas	8	0 – 6
PN Neutrófilos	34	35 – 71
PN Eosinófilos	4	0 – 4
PN Basófilos	9	0 – 2
Linfocitos	4	24 – 44
Monocitos	-	1 - 10
Mielocito neutrófilo	14	
Metamielocito neutrófilo	10	
Mielocito Eosinófilo	3	
Promielocito	10	
Blasto	4	

Morfología de leucocitos :
Leucocitosis a expensas de células mieloides en estados avanzados de maduración. Pseudo Pelger Huet, células con granulaciones mixtas. PNN hipersegmentados.

Morfología Plaquetas: trombocitosis confirmadas, presencias de macroplaquetas y algunos megatrombocitos.



Caso clínico -Aspirado medular

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

MÉDULA ÓSEA: La muestra es de calidad adecuada, con una celularidad de aproximadamente el 100%. La serie granulocítica se observa aumentada en todas las fases de maduración, la eritroide está disminuida y se identifican megacariocitos pequeños e hipolobulados.

Con la coloración de rutina no se identifican infiltrados celulares atípicos.

Este caso se complementa con citometría de flujo y mielograma evaluados en esta Institución. Los hallazgos favorecen una neoplasia mieloproliferativa crónica tipo leucemia mieloide crónica, a correlacionar con prueba molecular para el rearreglo BCR-ABL1.

- P.N.Neutrófilos: 35 (%)
- Bandas N: 7(%)
- Mielocitos N: 16 (%)
- Eosinófilos: 8(%)
- Monocitos: 6(%)
- Linfocitos: 7(%)
- Eritroblastos: 5 (%)
- Metameilocitos N: 10 (%)
- PN.Basófilos: 2(%)

Otras células: no se observan.

Relación mieloeritroide M/E: aumentada.

Análisis: se observa representación de las 3 líneas celulares hematopoyéticas. Línea megacariocítica presente con algunos megacariocitos hipolobulados, línea eritroide disminuida, línea granulocítica aumentada en todos sus estadios de maduración, linfocitos disminuidos, maduros.

Aspirado medular con aumento de granulocitos en todos sus estadios de maduración, sin aumento de blastos ni de PN Basófilos.

Este caso se complementa con citometría de flujo y biopsia de médula ósea evaluados en esta Institución.

Caso clínico - cariotipo

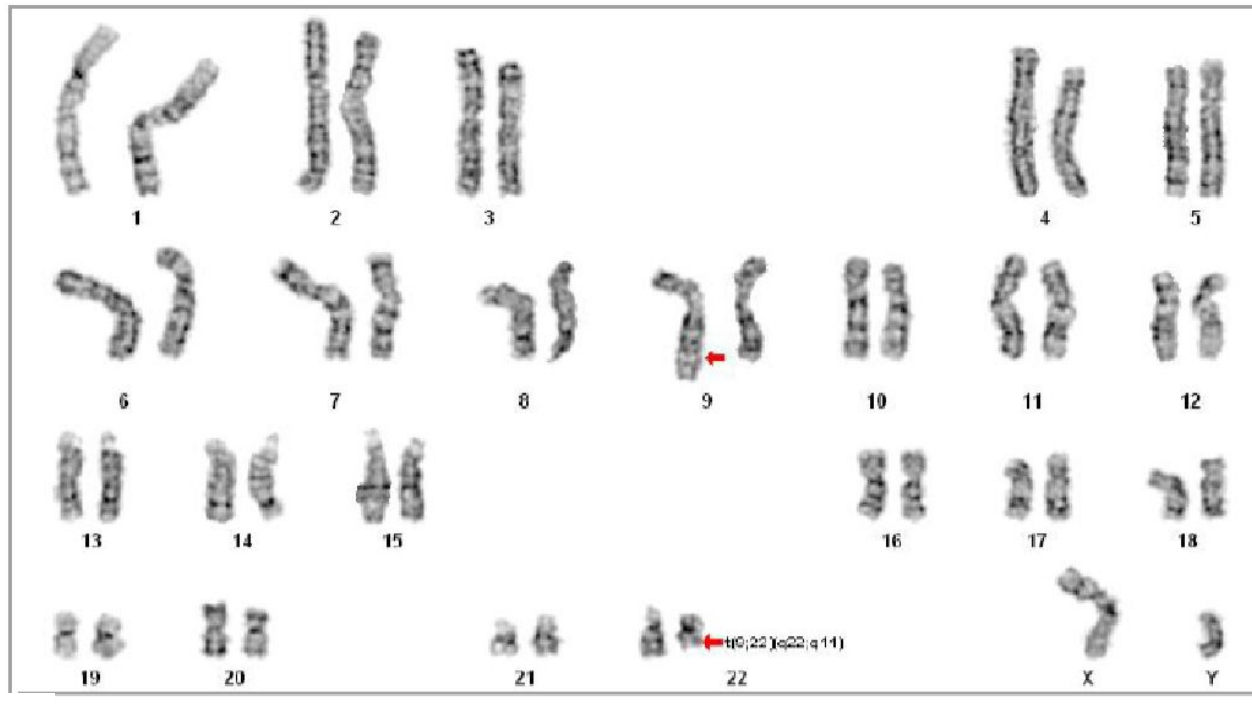
Impresión Diagnóstica: LMC.

Resultado Cariotipo (ISCN*):

mos 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[8]/47,XY,t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[14]/47,XY,t(9;22)(q34;q11.2),+8[3]

INTERPRETACION: el análisis citogenético del tejido remitido, con la técnica de bandas utilizada, reveló mosaicismo cromosómico con 3 líneas celulares: 8 metafases presentan cromosoma Philadelphia, 14 tienen doble Philadelphia y 3 metafases con Philadelphia y un cromosoma 8 extra. Ver fotografías anexas.

OBSERVACIONES Y/O RECOMENDACIONES: la orientación clínica de este cariotipo corresponde al Médico remitente.



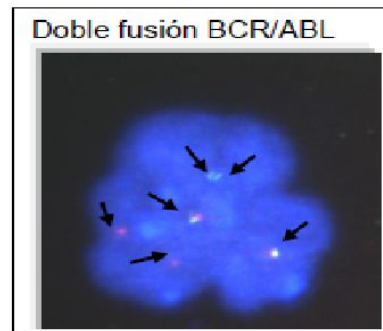
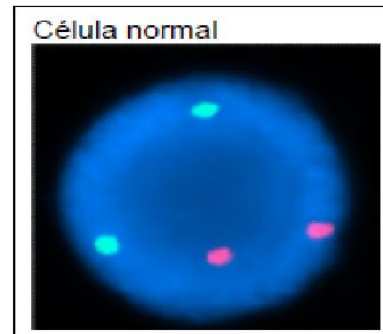
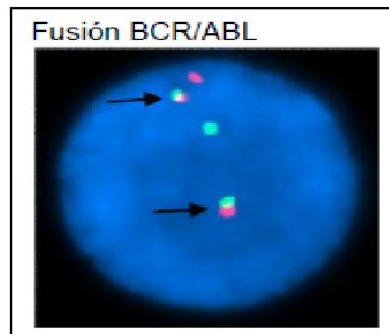


Caso clínico - FISH

RESULTADOS:

nuc ish(BCR, ABL)x3(BCR con ABL x2)[90/108]/nuc ish(BCRx3,ABLx2)(BCR con ABLx2)[6/108]/nuc ish(BCR,ABL)x2[12/108]

INTERPRETACION: en 108 células analizadas, se observaron 3 patrones de hibridación: 90 células con fusión positiva BCR/ABL; 6 células con fusión doble positiva y las 12 células restantes son normales. Ver fotografías en el anexo.



Locus gen BCR 22q11



Locus gen ABL1 9q34



Fusión BCR/ABL 1

Cortesía Genemed

Caso clínico - QPCR

Impresión Diagnóstica: LMC

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA:

Tipo de muestra: Médula ósea

Condiciones de la muestra: Buena Anticoagulante: EDTA Volumen: 3.5 ml

Fecha y hora de toma de la muestra: No informa

Fecha y hora de recepción de la muestra: 30/03/2015, 3:40 pm

RESULTADO: Se detectó el gen de fusión p210^{BCR-ABL}

%BCR-ABL/ABL	Copias de ABL (ver control de calidad*)	Copias de BCR-ABL
152%	513.744	784.211

Nota: el punto se utiliza como separador de miles.

*CONTROL DE CALIDAD

Copias de ABL (>10.000): indica que la calidad del RNA y su amplificación fueron óptimas, dando como resultado una prueba confiable.

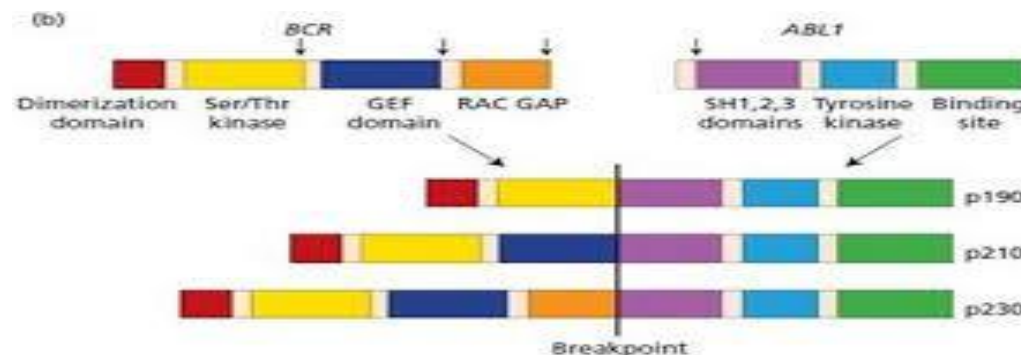


Imagen tomada de <https://www.google.com.co/>

Cortesía Genemed

LMC – Respuesta al tratamiento

Response to treatment	Definition
Complete hematological response, CHR	- WBC < $10 \times 10^9/L$; Basophils < 5% - No myelocytes, promyelocytes, myeloblasts in the differential; Platelet count < 450 $\times 10^9/L$; Spleen nonpalpable
Complete cytogenetic response, CCyR	Ph+ cells = 0
Partial cytogenetic response, PCyR	Ph+ cells = 1-35%
Minor cytogenetic response, MinorCyR	Ph+ cells 36-65%
Minimal cytogenetic response, MiniCyR	Ph+ cells 66-95%
No cytogenetic response, NoCyR	Ph+ cells >95%
Major cytogenetic response, MCyR	Ph+ cells $\leq 95\%$
Major molecular response, MMR	BCR::ABL1 $\leq 0.1\%$ (IS)
MR ^{4.0}	BCR::ABL1 $\leq 0.01\%$ (IS) or undetected disease in cDNA with > 10,000 ABL1 transcripts
MR ^{4.5}	BCR::ABL1 $\leq 0.0032\%$ (IS) or undetected disease in cDNA with > 32,000 ABL1 transcripts
MR ^{5.0}	BCR::ABL1 $\leq 0.001\%$ (IS) or undetected disease in cDNA with > 100,000 ABL1 transcripts

Respuesta Molecular Profunda

Leucemia no detectada molecularmente

LMC – Respuesta al tratamiento



Tiempo	Respuesta óptima	Peligro	Falla
Inicio	No aplica	Alto riesgo No logro de CyR	No aplica
3 meses	BCR-ABL1 $\leq$ 10% o cromosoma Filadelfia <35%	BCR-ABL1 > 10% Cromosoma Filadelfia 36-95%	No logro de CHR Cromosoma Filadelfia >95%
Seis meses	BCR-ABL1 $\leq$ 1% ó Cromosoma Filadelfia 0 (CCyR)	BCR-ABL1 1-10% ó Cromosoma Filadelfia 1-35 % (PCyR)	BCR-ABL1 >10% Cromosoma Filadelfia >35%
Doce meses	BCR-ABL1 $\leq$ 0.1% (MMR)	BCR-ABL1 0.1-1%	BCR-ABL1 >1% Cromosoma Filadelfia >1%
En cualquier momento	BCR-ABL1 $\leq$ 0.1%	BCR-ABL1 > 0.1 – 1% Perdida de RMM	BCR-ABL1 > 1%, mutaciones de RX, alto riesgo Alteraciones citogenéticas

Y. Wang et al. Blood Reviews 65 (2024) 101196

Hochhaus et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. Leukemia (2020) 34:966–984

WHO Classification of Tumours • 5th Edition

Haematolymphoid Tumours Part A

Edited by the WHO Classification of Tumours Editorial Board

NMP

Leucemia Mieloide crónica

Policitemia Vera

Trombocitemia esencial

Mielofibrosis primaria

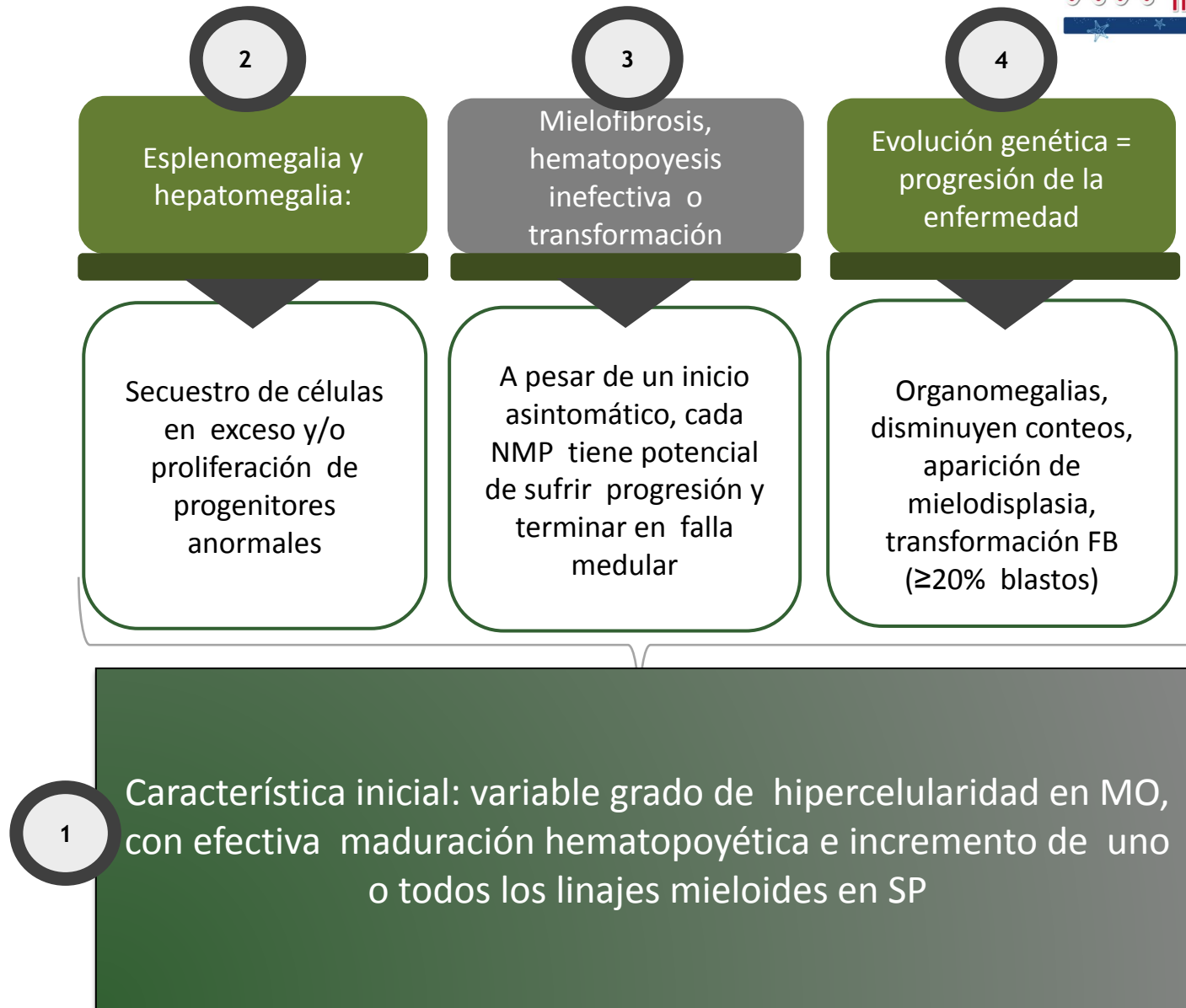
Leucemia Neutrófila Crónica

Leucemia eosinófila crónica

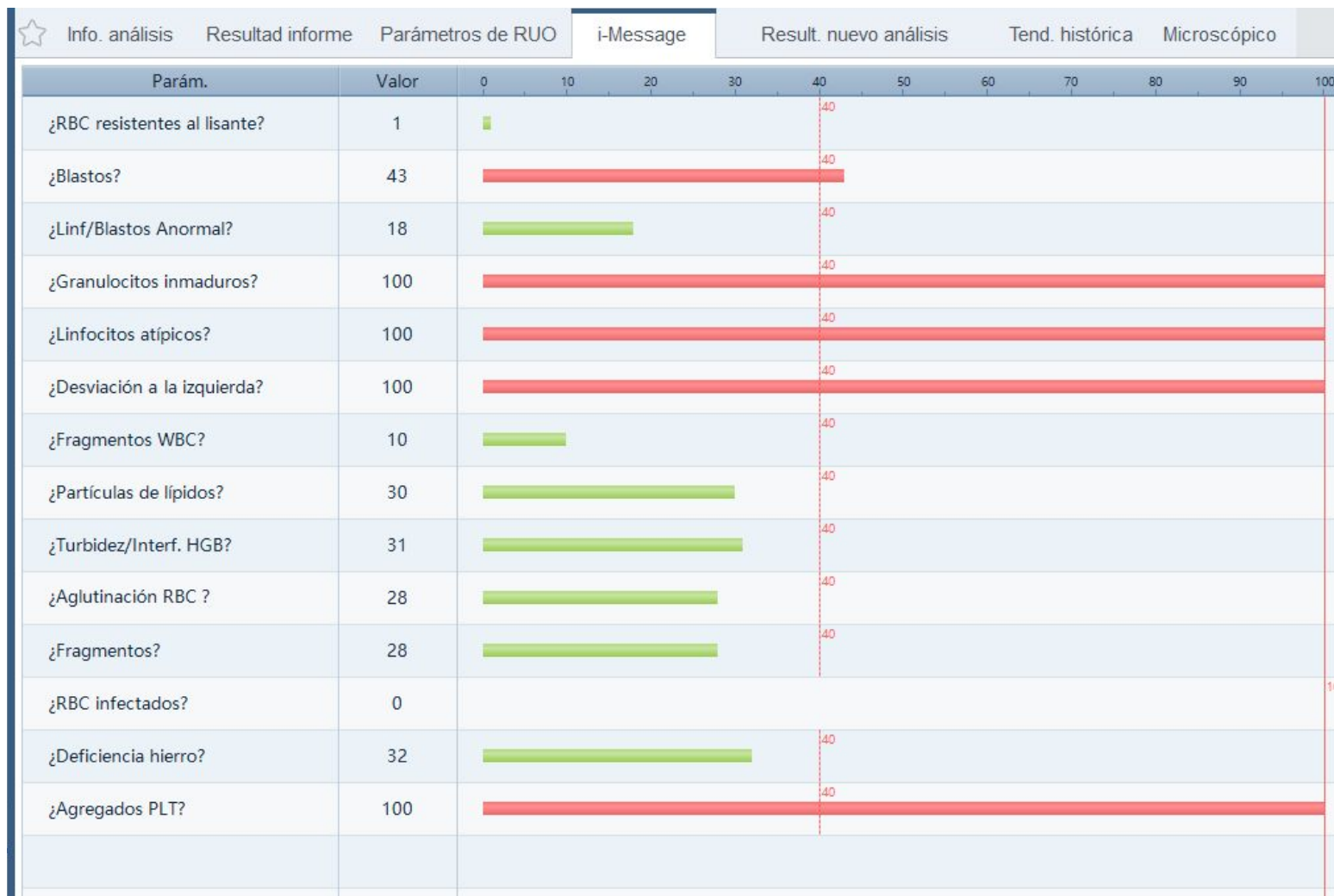
Leucemia Mielomonocítica Juvenil

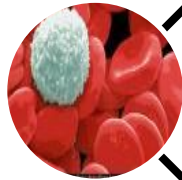
Neoplasias mieloproliferativas sin
especificar

***NMP BCR::ABL –
clásicas***



Y todo comenzó con una alarma





En presencia de anormalidades en el conteo celular que excede los IBR's establecidos y acompañado de leucoeritroblastosis

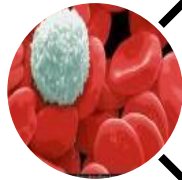


En presencia de características clínicas como:

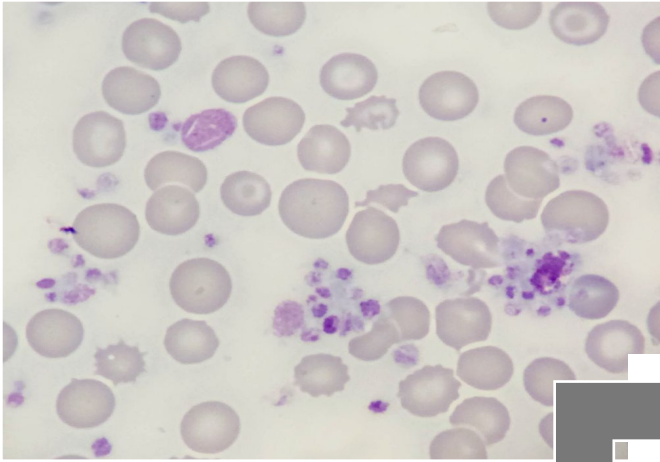
una NMP BCR-ABI -?



Esplenomegalia palpable, anemia, prurito, trombosis inusual,

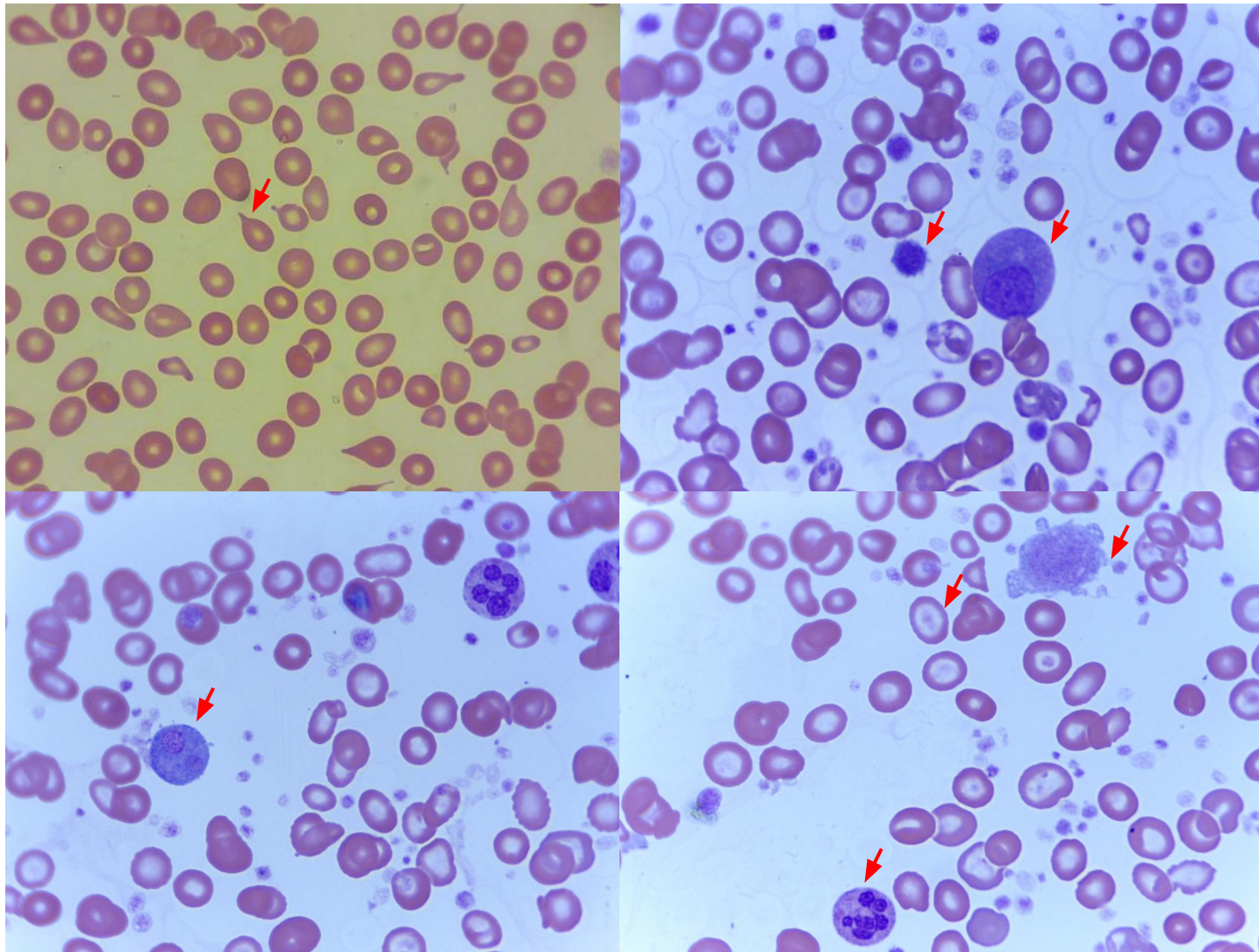


Fibrosis medular y hematopoyesis extramedular

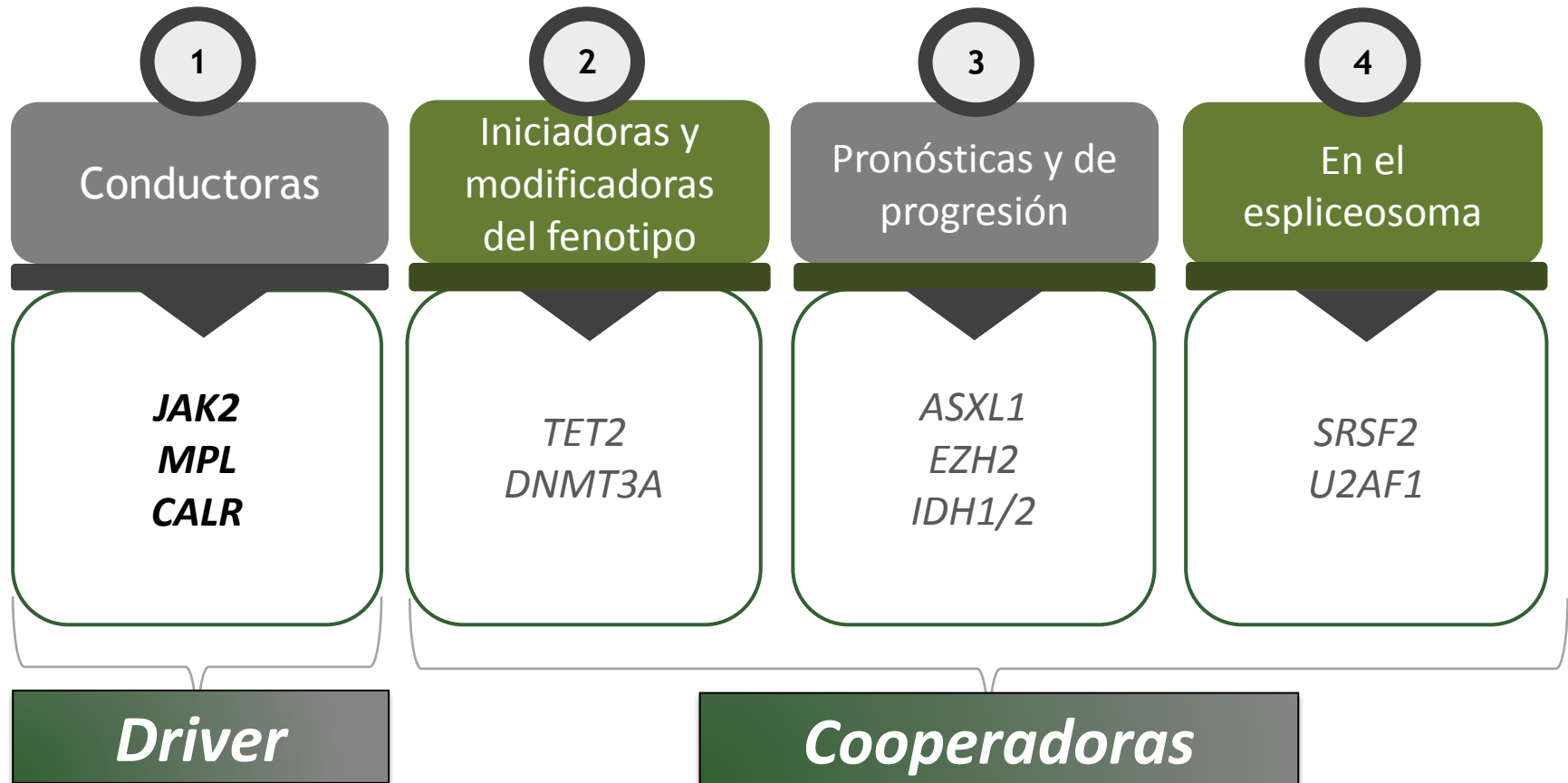


Sangre periférica

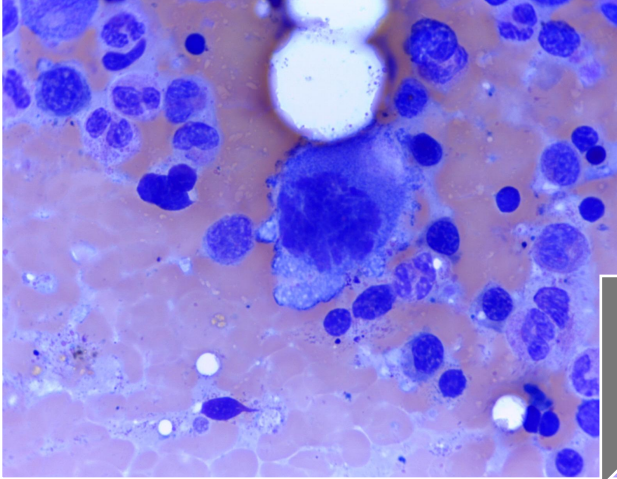
- Eritrocitos en lágrima (dacriocitos), macrocitos ovals sin déficit de B12 o folato y leucoeritroblastosis
- Leucocitosis, con o sin blastos, células mieloides inmaduras y grados variables de eosinofilia y basofilia-
- Alteraciones cuantitativas y cualitativas de las plaquetas: trombocitosis inexplicable, plaquetas gigantes, fragmentos de megacariocitos



Mutaciones



Sadigh S, Kim AS. Molecular Pathology of Myeloid Neoplasms: Molecular Pattern Recognition. Vol. 44, Clinics in Laboratory Medicine.; 2024. p. 339–53.



Policitemia

- Aumento glóbulos rojos y plaquetas independientes de EPO y trombopoyetina.
- Aumento de leucocitos
- Hipersensibilidad a IL3, EPO, GM-CSF
- Edad: 60 años predominio masculino

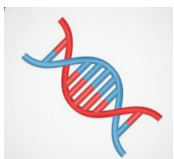
Manifestaciones Clínicas y Criterios OMS 2022

Signos y signos: plétora,
hipertensión portal, trombosis,
disnea, **prurito acuagénico**,
inyección conjuntival,
hepatoesplenomegalia, parestesias

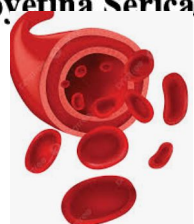
Molecular: 95% mutación gen JAK2
V617F (quinasas), 5% exón 12.

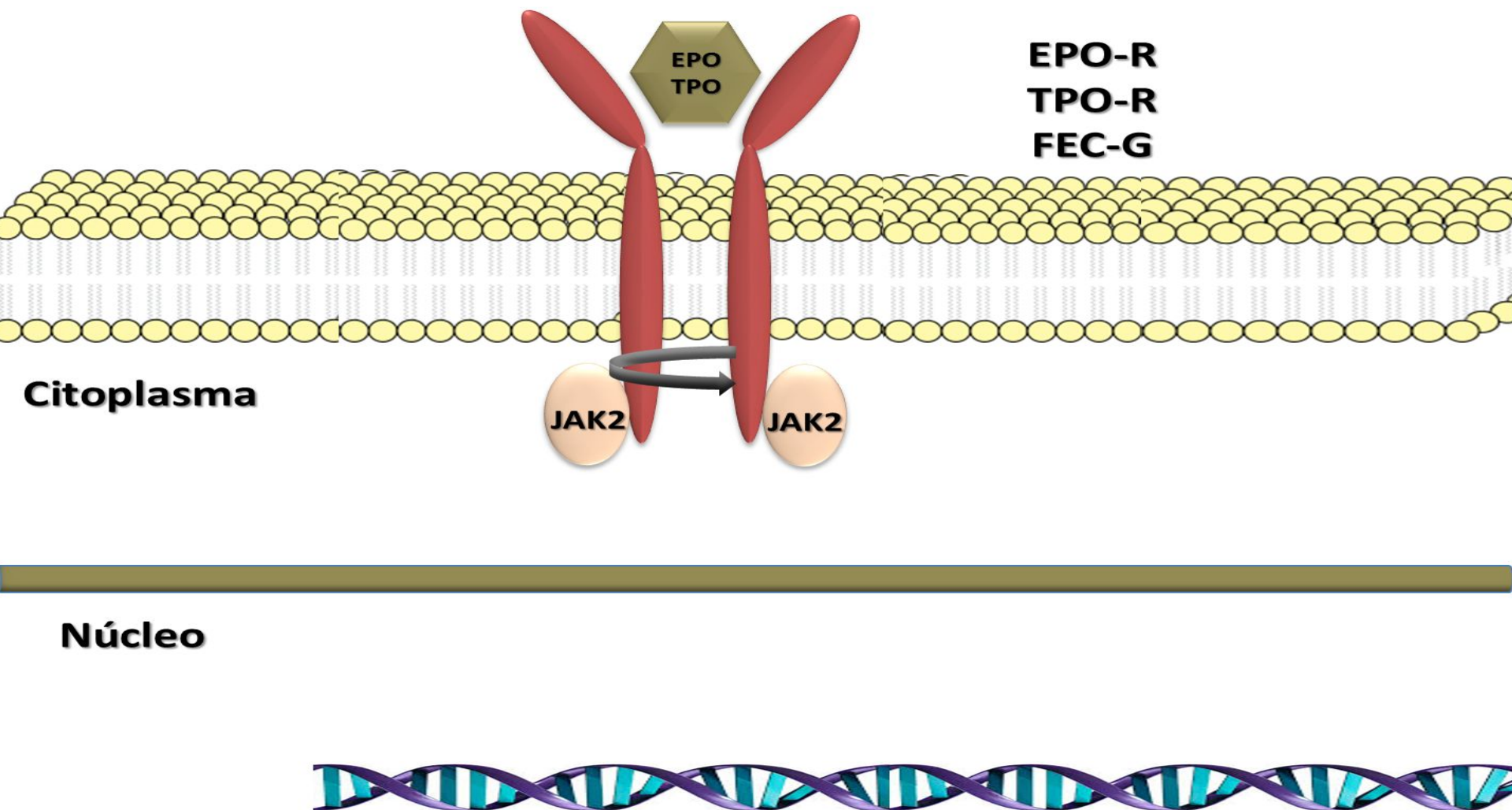
Otras anormalidades: +8, +9,
del(20q), del(13q), del(9p)

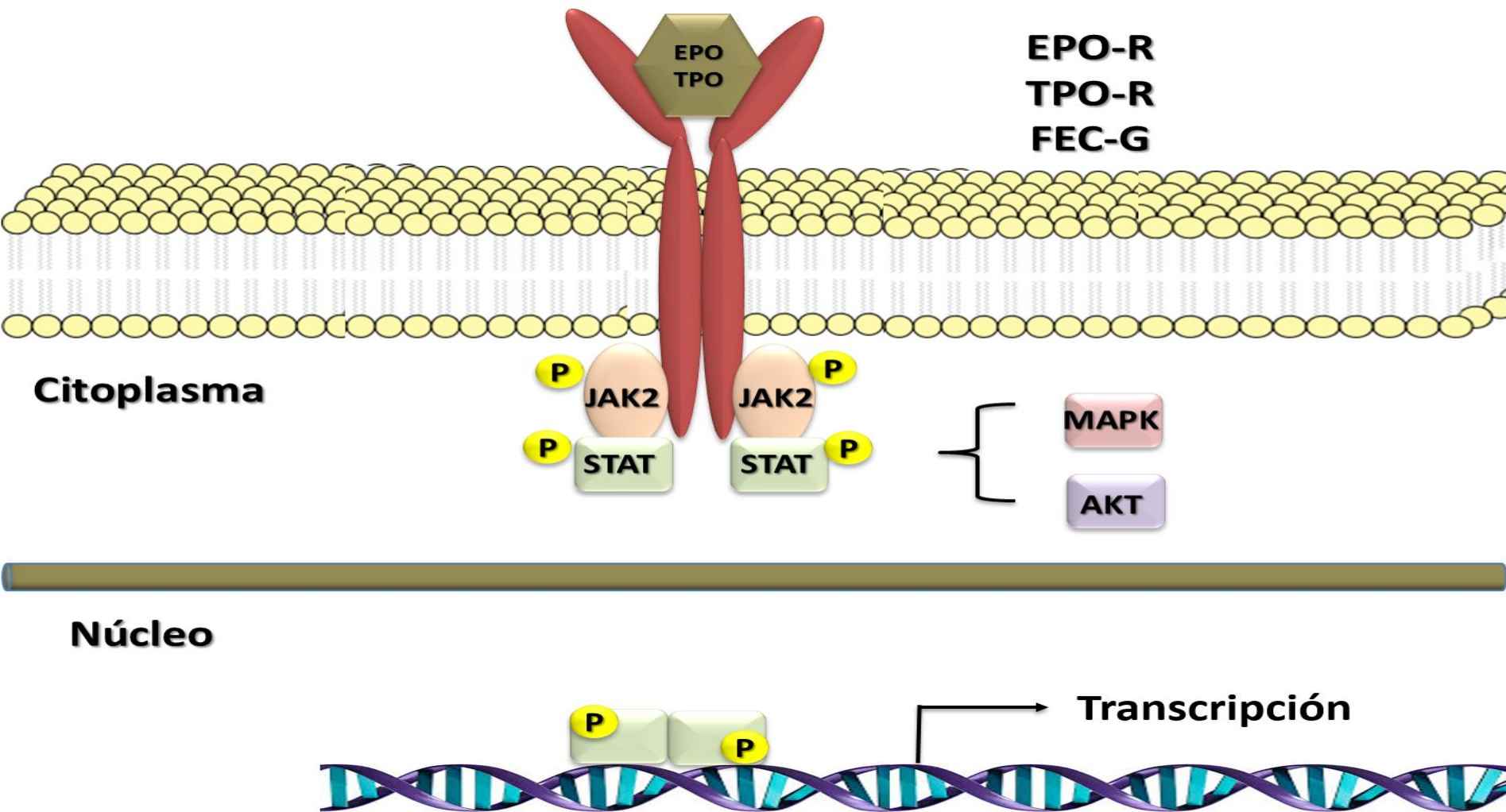
Criterios Mayores

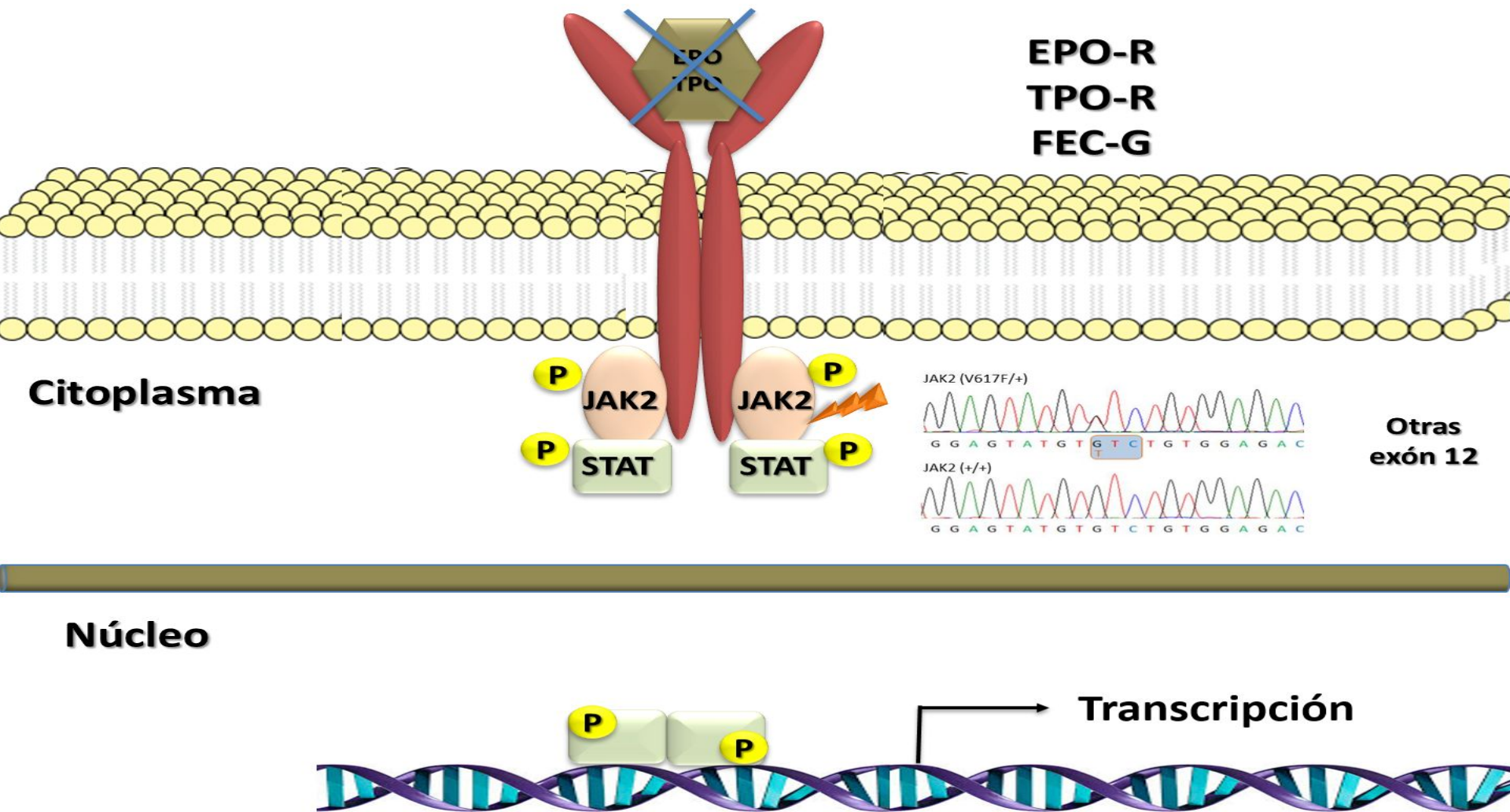
1. Concentración de Hemoglobina Elevada 	Hombres: > 16.5 g/dL Mujeres: > 16.0 g/dL O Hematocrito Elevado: Hombres: > 49% Mujeres: > 48%
2. Biopsia de Médula Ósea 	Hiper celularidad ajustada por edad con crecimiento de trilineaje (panmielosis). Proliferación eritroide, granulocítica y megacariocítica prominente. Megacariocitos pleomórficos y maduros (variación en tamaño).
3. Mutación JAK2 	Presencia de la mutación JAK2 V617F o mutación en el exón 12 de JAK2 .

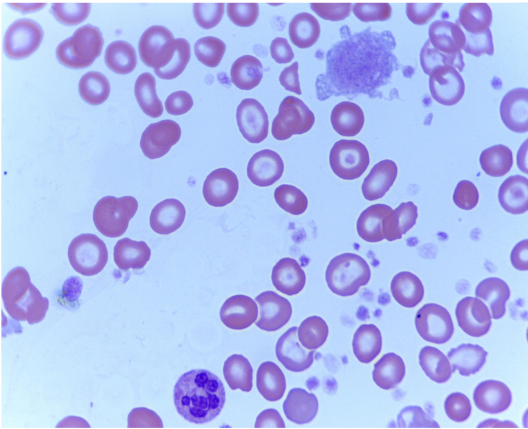
⊕ Criterio Menor

Nivel de Eritropoyetina Sérica Subnormal 	Niveles de eritropoyetina sérica por debajo de lo normal.
--	---









Trombocitemia esencial

-Aumento persistente de plaquetas, hiperplasia megacariocítica

-Edad: 60 años, predominio mujeres

M.O: normo ó ligeramente hiperplásica, megacariocitos gigantes displásicos.

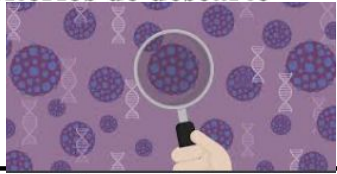
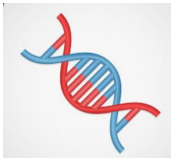
Genética: JAK2 40-50% de pacientes, CALR Y MPL

Dx diferencial: NMPC, SMD (trombocitosis), trombocitosis reactiva

Manifestaciones Clínicas y Criterios OMS 2022

Síntomas y signos: Síndrome vascular, tríada: **color rojo en piel, calor y dolor**, que aparecen en forma de crisis debidos a la **inflamación arteriolar** mediada por las plaquetas y por la trombosis.

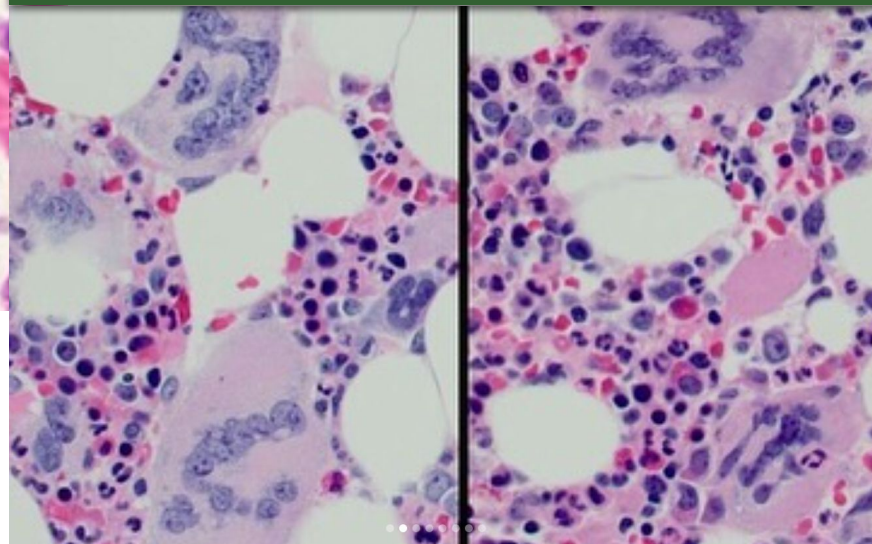
- Esplenomegalia, gangrena, infarto cerebral y cardiaco.

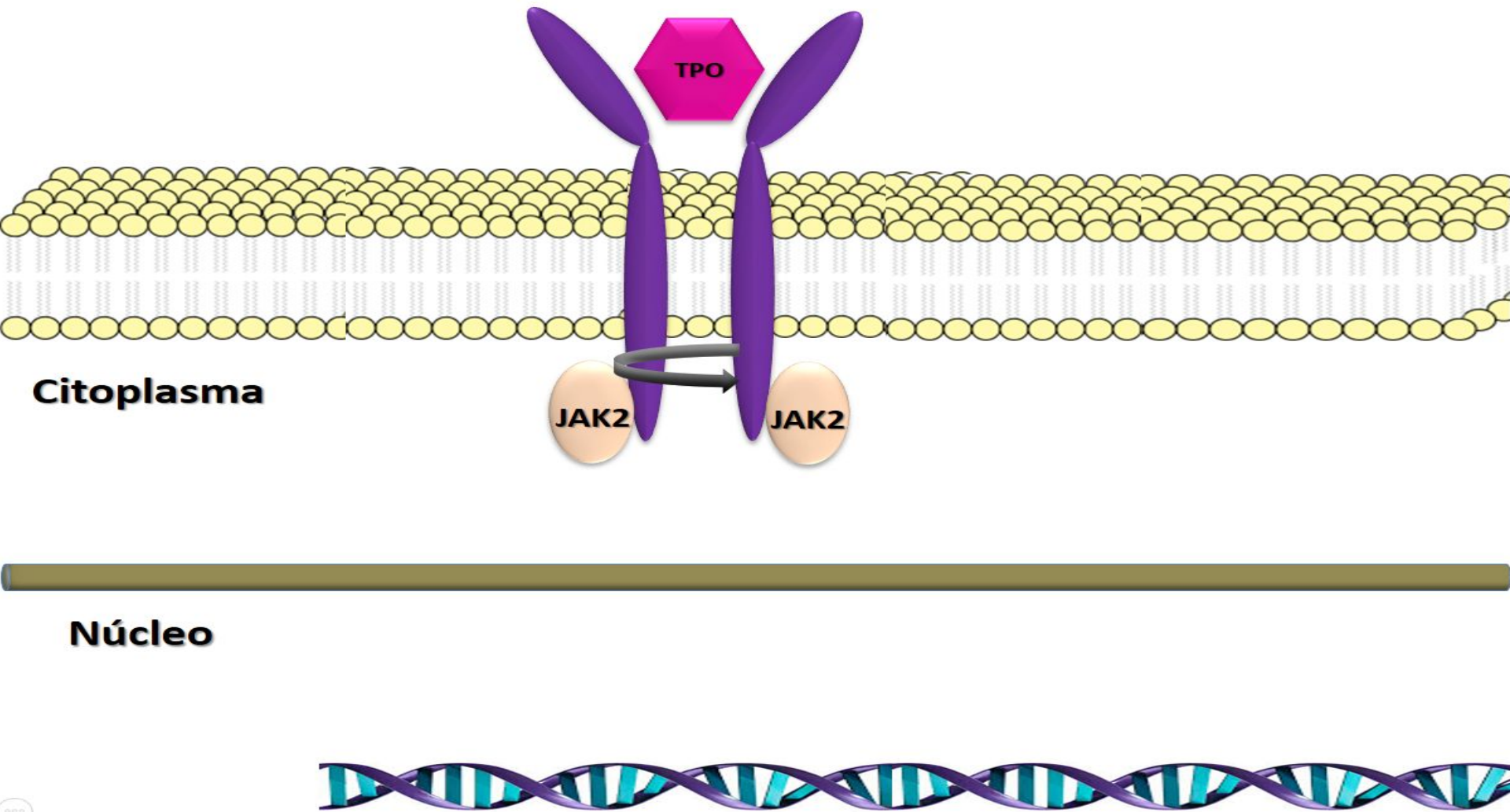
Criterios Mayores	
1. Recuento de plaquetas 	$\geq 450 \times 10^9/L$
2. Biopsia de Médula Ósea 	Proliferación principalmente del linaje megacariocito. Aumento en megacariocitos maduros con núcleos hiperlobulados. Sin desviación a la izquierda granulocítica. Escaso aumento en fibras de reticulina (grado 1).
3. Criterios de descarte 	No se cumplen los criterios para LMC BCR::ABL, PV, MFP u otras neoplasias mieloides.
4. Mutación 	Presencia de mutación en JAK2, CALR, o MPL
Criterio Menor	
Marcador Clonal 	Presencia de un marcador clonal o la exclusión de trombocitosis reactiva.

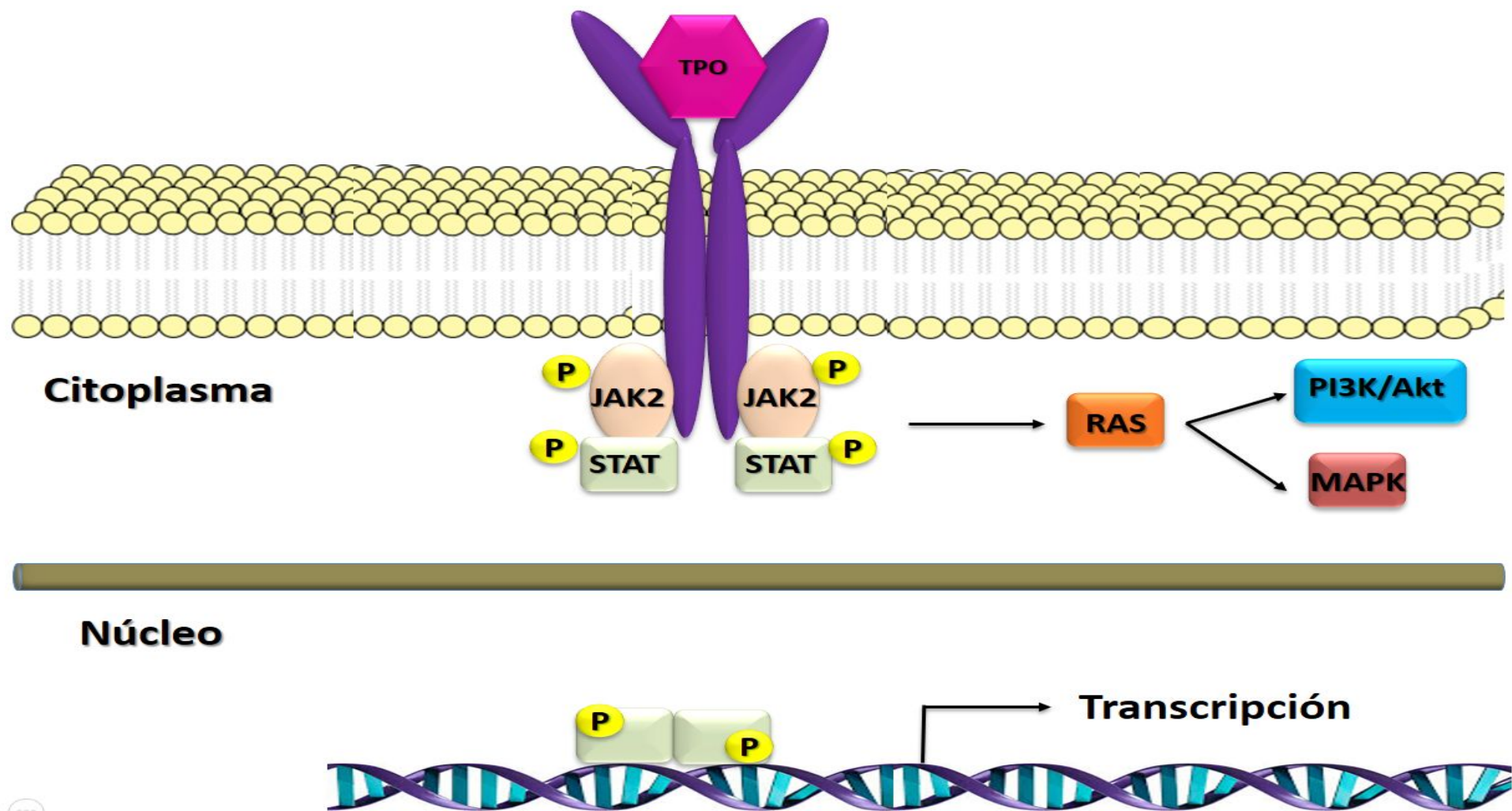
Megacariocitos Cuernos de Ciervo

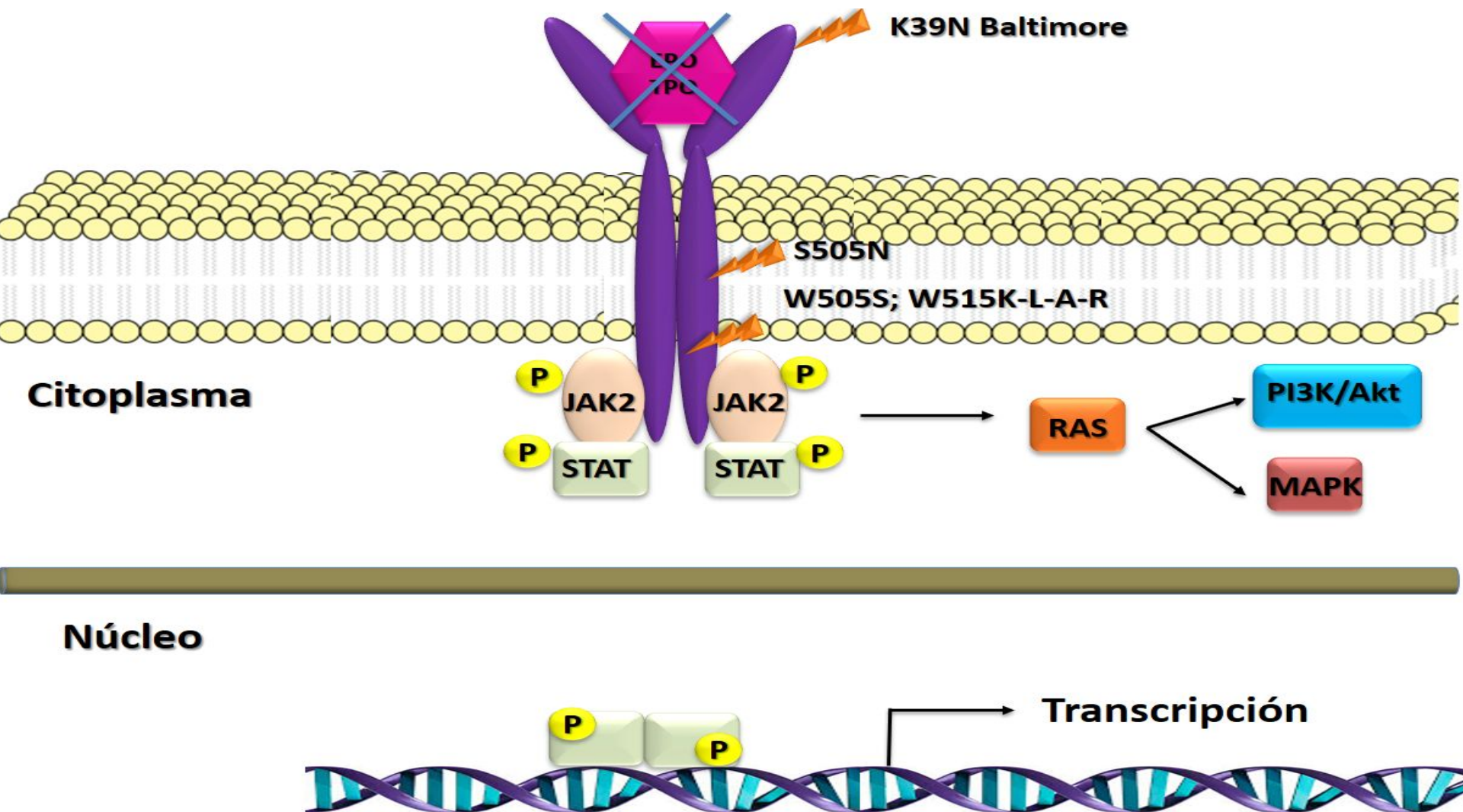


Riesgo a desarrollar MF y LMA

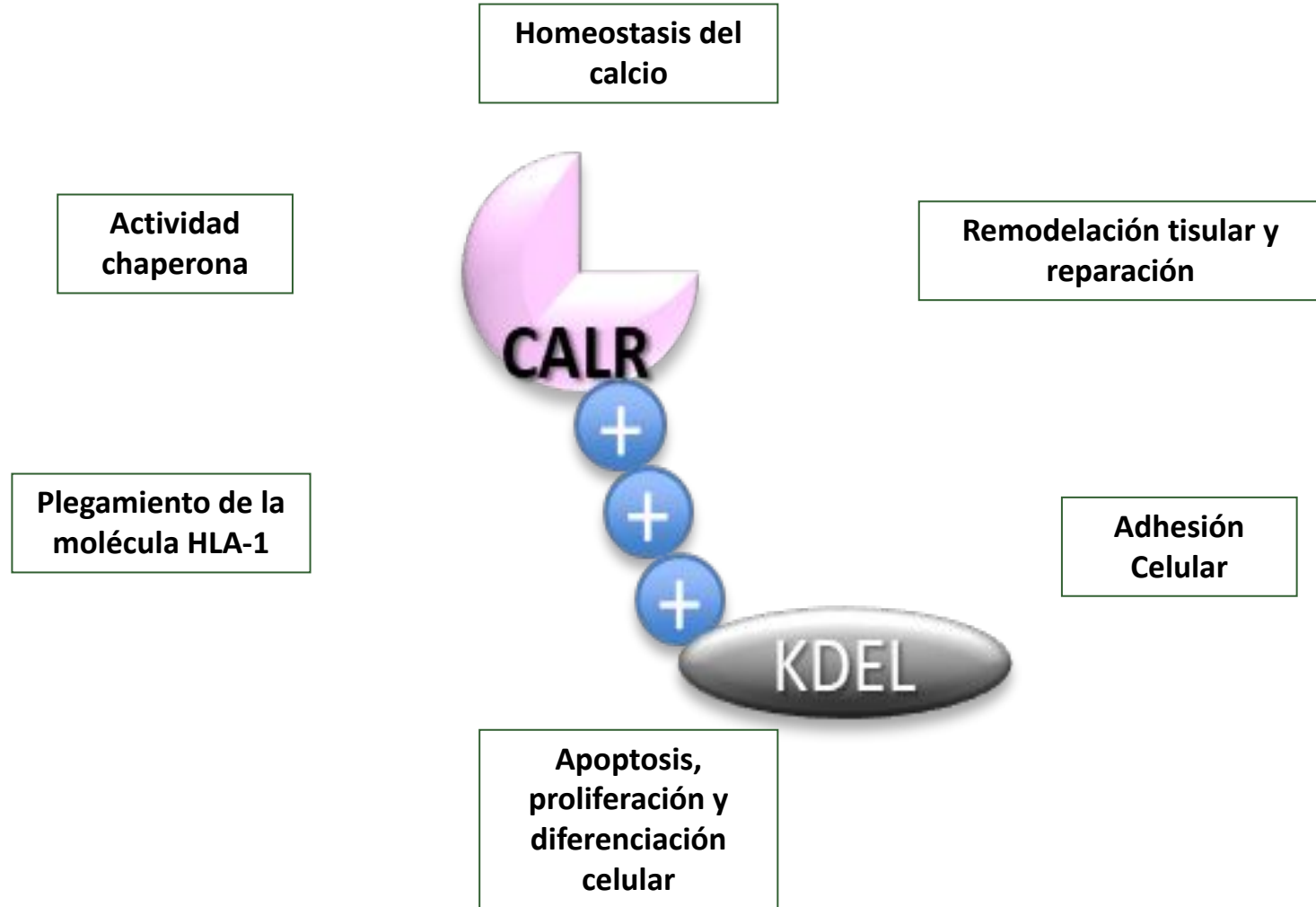




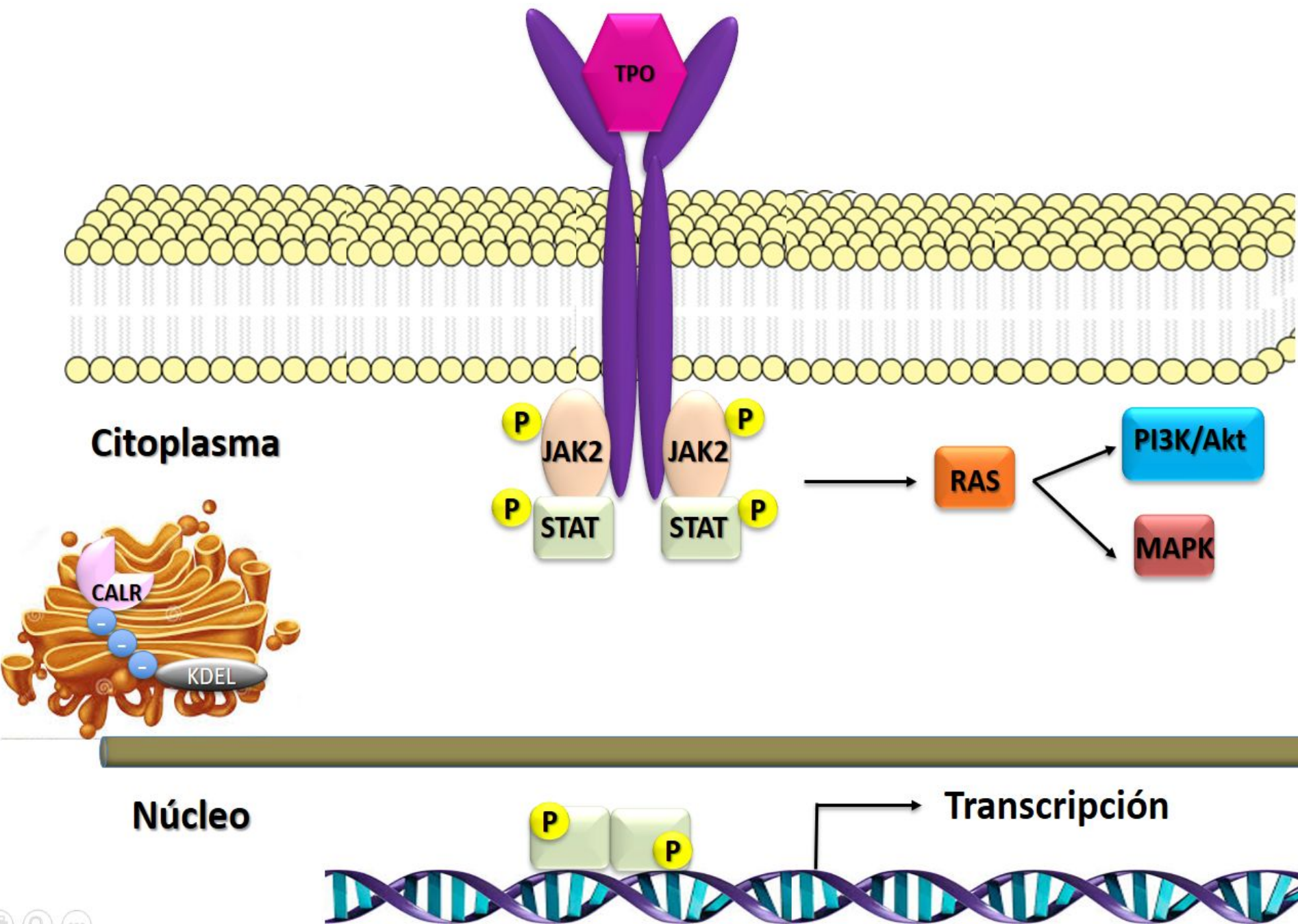


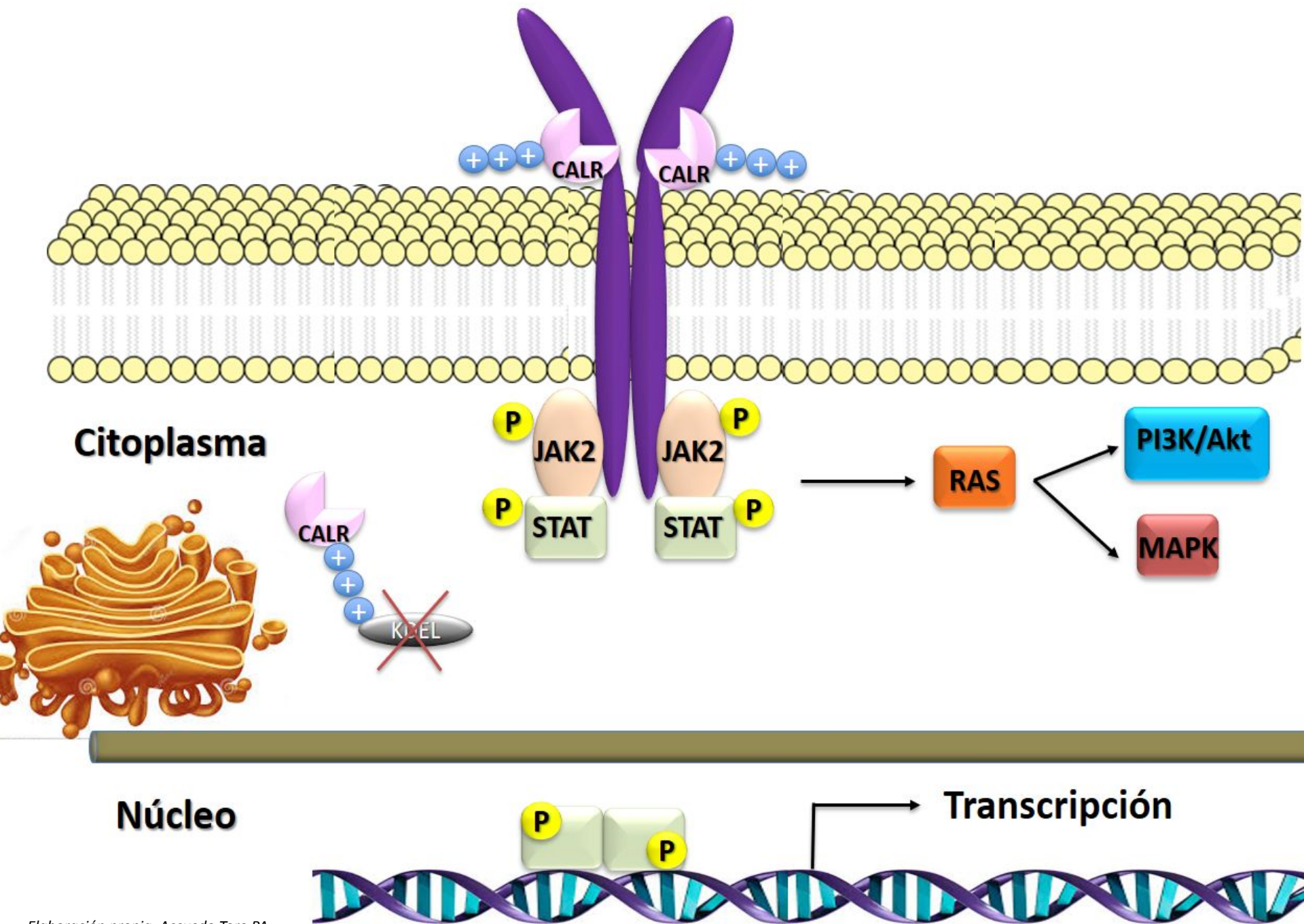


Calreticulina (CALR)



Elaboración propia. Acevedo Toro PA.







¿Pero qué tan relevantes son estas
mutaciones en los algoritmos
diagnósticos y pronósticos?

Genotipo vs Fenotipo en TE

	ET-CALR mutation	ET-JAK2 mutation
Age	Younger <50	Older >50
Gender	Male	Female
Platelets ($\times 10^9/L$)	Higher >800	Lower <800
Haemoglobin (g/L)	Lower <140	Higher >140
Leucocytes ($\times 10^9/L$)	Lower (<8.5)	Higher(>8.5)
Thrombosis risk	Lower	Higher
Survival	Longer	Worse prognosis

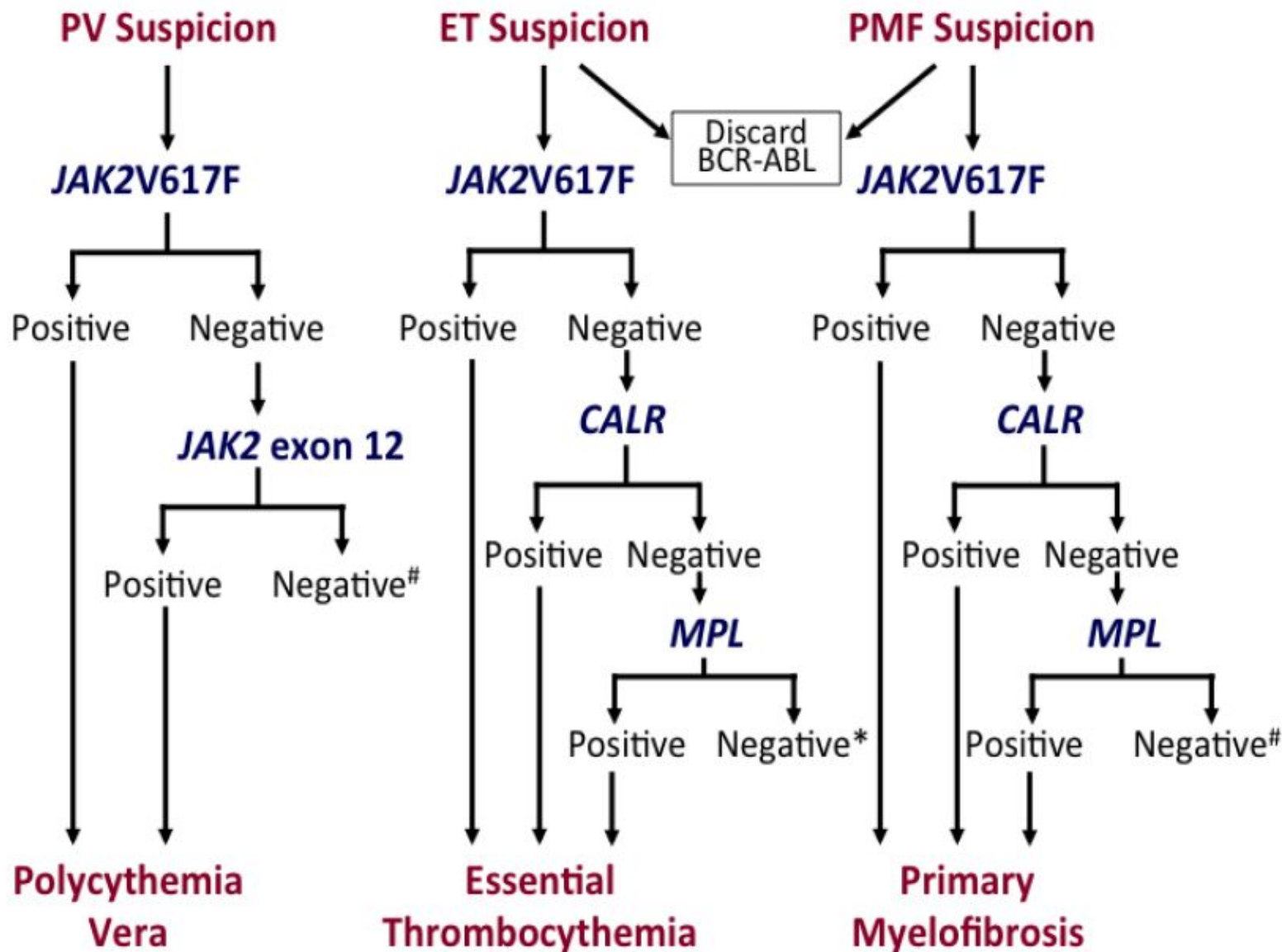
MF: Modelo Pronóstico con base en Estudios Moleculares y Genéticos

	MIPSS	GIPSS
Age > 6	1.5	2
Constitutional Symptoms	0.5	No
Hemoglobin < 10 g/dL	0.5	No
Platelets < $200 \times 10^9/L$	1.0	No
Triple Negative	1.5	2
<i>JAK2</i> or <i>MPL</i> Mutation	0.5	2
<i>ASXL1</i> Mutation	0.5	1
<i>SRSF2</i> Mutation	0.5	1
CALR Type 2, Type 2–Like	No	2
Unfavorable Cytogenetics*	No	3 for very high risk; 2 for high risk

MIPSS: Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System

GPSS: Genetics-Based Prognostic Scoring System.

Algoritmo para el análisis de mutaciones



*Analicemos los siguientes
casos*



Caso clínico

Antecedentes

Mujer de 50 años, quien acude a control de su enfermedad.

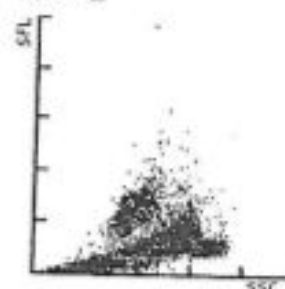
Examen físico: refiere sensación de quemazón y enrojecimiento en miembros inferiores.

Positiva
Diff. Morfo.
Cont.

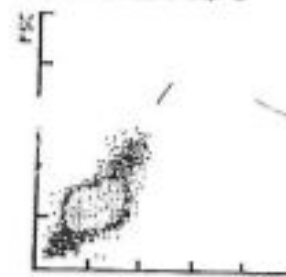
→ WBC	77.63 *	[10 ³ /uL]
→ RBC	4.32 *	[10 ⁶ /uL]
HGB	7.3 -	[g/dL]
HCT	30.9 *	[%]
MCV	71.5 *	[fL]
MCH	16.9 *	[pg]
MCHC	23.6 *	[g/dL]
→ PLT	1571 *	[10 ³ /uL]
RDW-SD	90.5 *	[fL]
RDW-CV	33.7 *	[%]
MPV	10.6 *	[fL]
NEUT	—	[10 ³ /uL]
LYMPH	3.19 *	[10 ³ /uL]
MONO	1.10 *	[10 ³ /uL]
EO	—	[10 ³ /uL]
BASO	0.57 *	[10 ³ /uL]
NRBC		[10 ³ /uL]

—	[10 ³ /uL]
4.1 *	[%]
1.4 *	[%]
0.7 *	[%]
	[/100WBC]

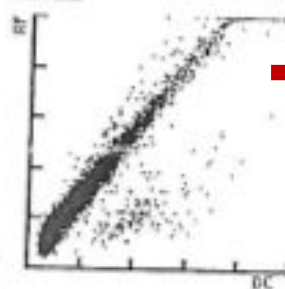
DIFF



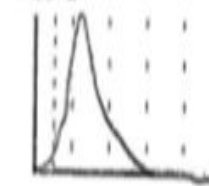
WBC/BASO



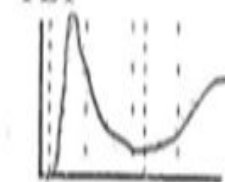
IMI



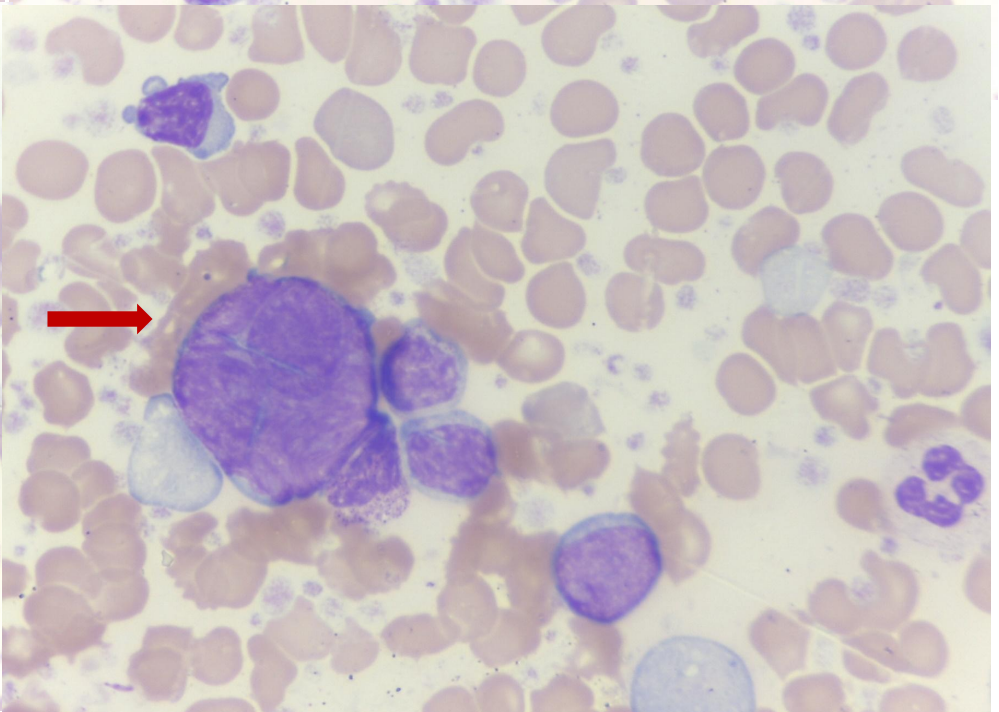
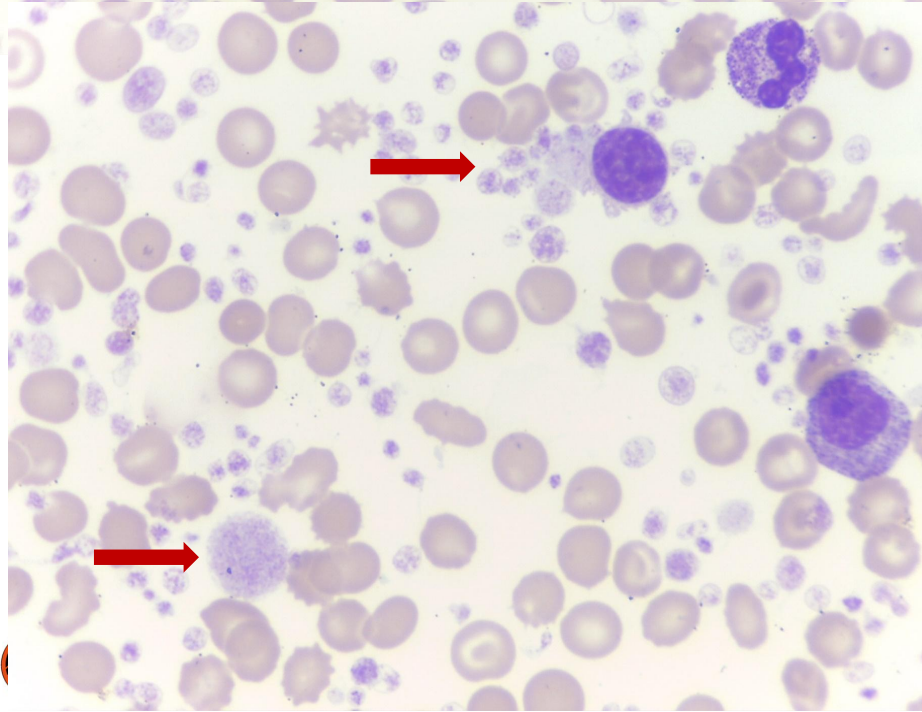
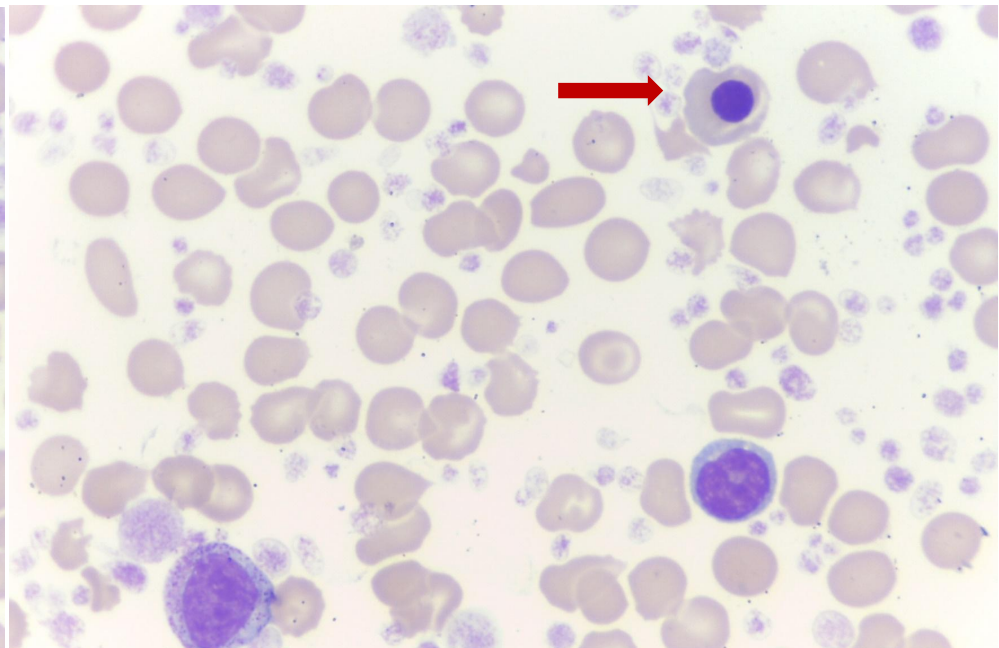
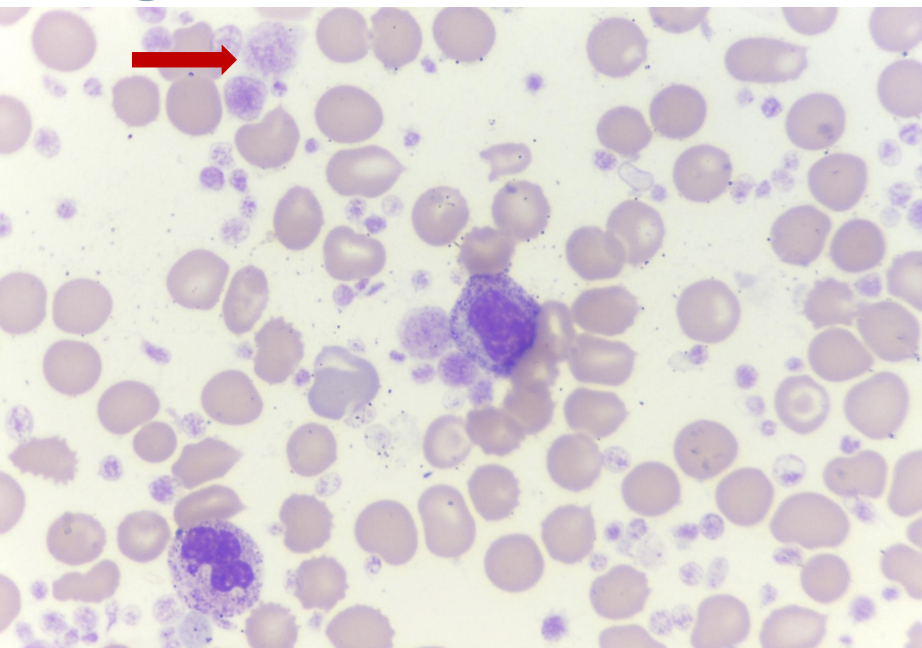
RBC



PLT



● Caso clínico



Formula diferencial	(%)
PNEosinófilos	-
PNNeutrofilos	22
Basófilos	-
Linfocitos	12
Promielocitos	4
Blasto	5
Bandas	22
Metamielocitos N	20
Mielocitos	11

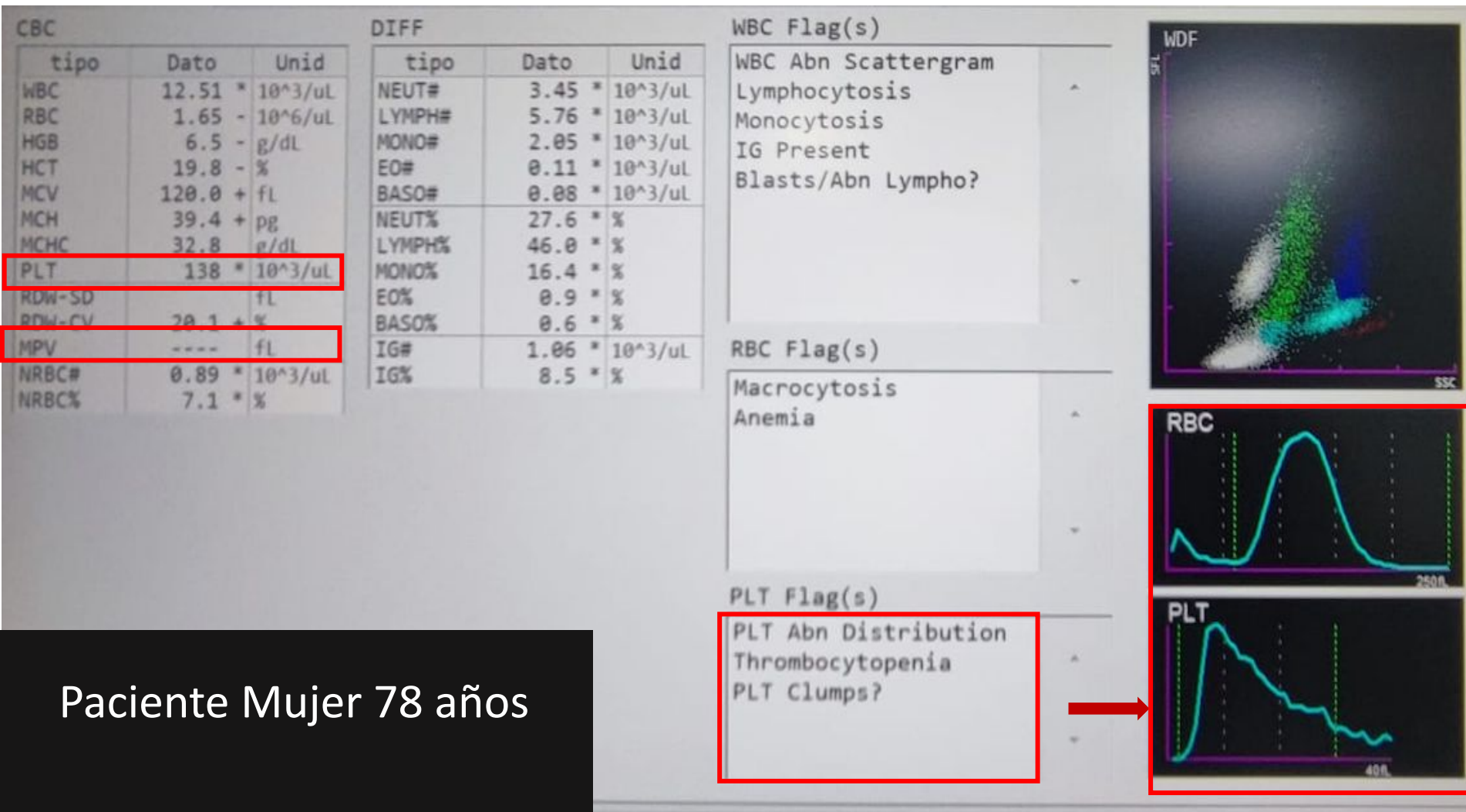
Trombocitosis confirmada 70 PLAQUETAS EN PROMEDIO POR CAMPO DE 100X.

Plaquetas: Micromegacariocitos: 4, trombocitosis, macroplaquetas, plaquetas hipogranulares y agranulares.

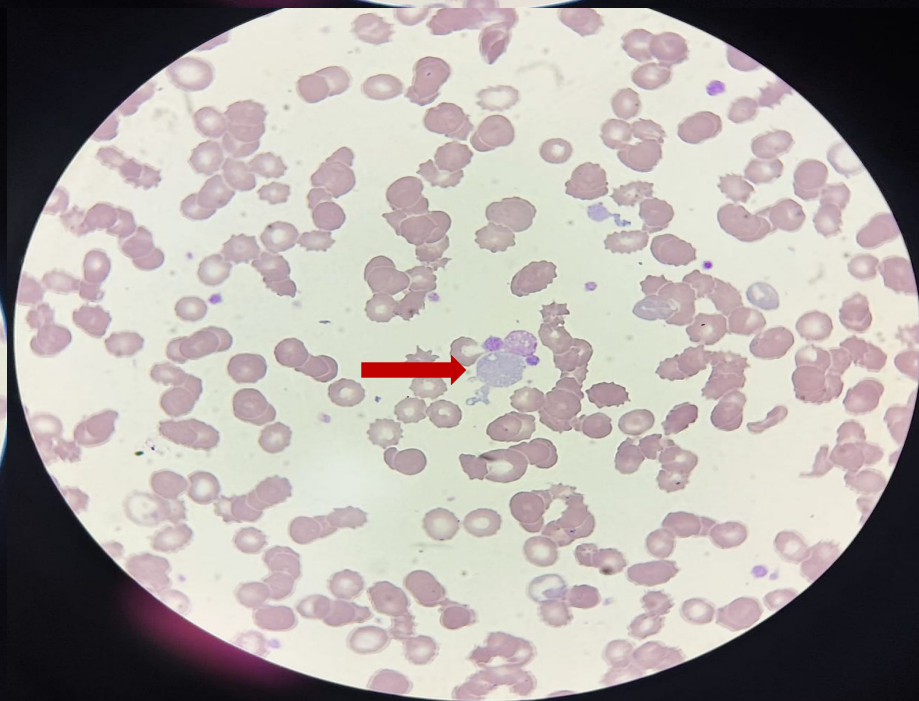
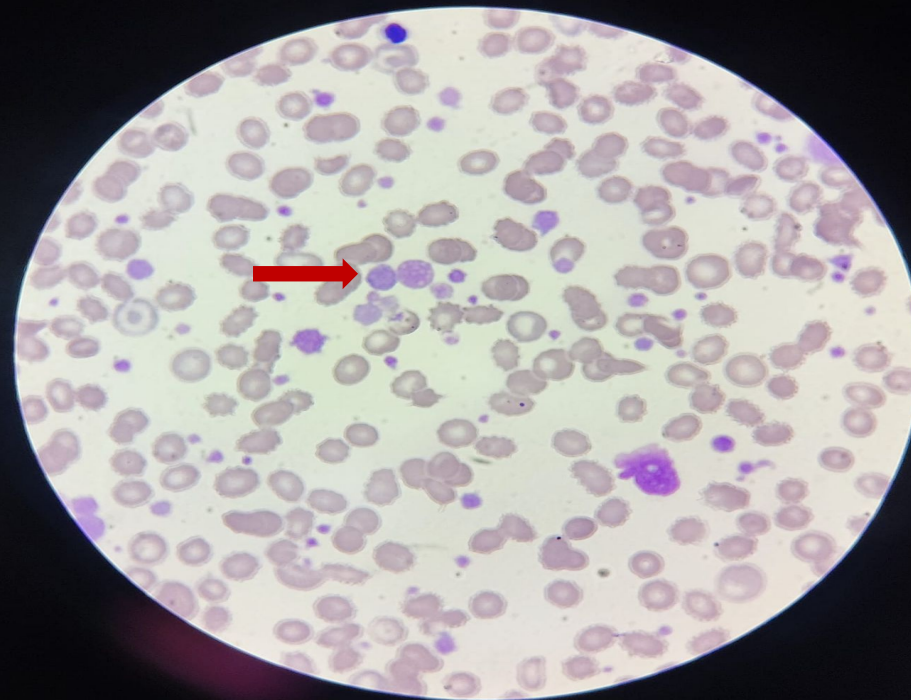
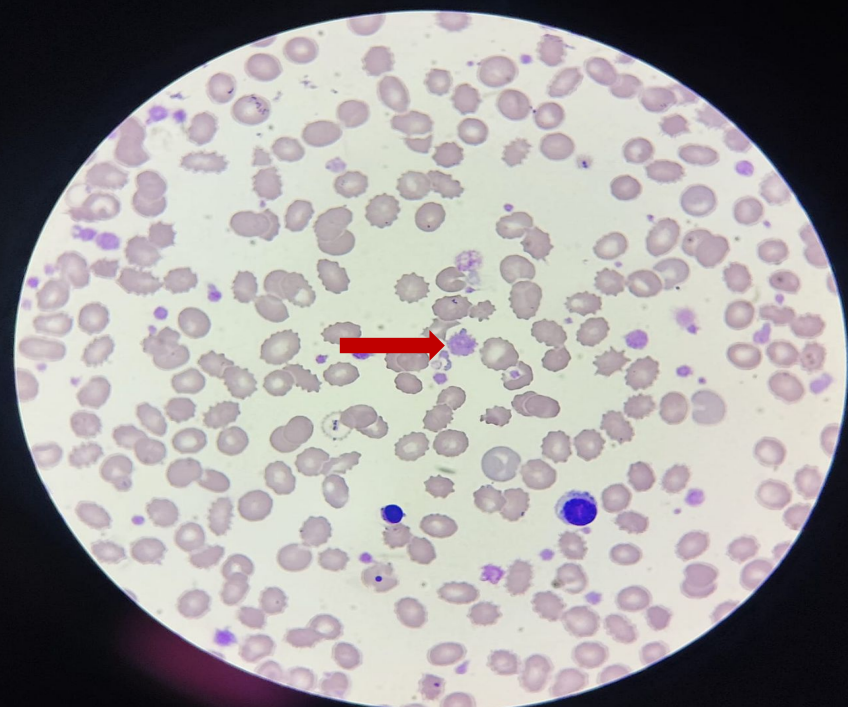
- GR:** Ortocromáticos 6 en 100 células, policromatofilia++ Macroцитos:++ Microцитos: ++, Queratocitos: ++ Howell Jolly: ++ Presencia anillos de cabot.
- GB:** Vacuolas: ++ y presencia de granulaciones tóxicas

NMP compatible con Trombocitemia esencial
 OJO LMC descartar t(9;22)
 Confirmar por pruebas moleculares: JAK, CALR, MPL

Caso clínico



Paciente Mujer 78 años



Caso clínico

Acumulativos

Fecha	02/02/2024	03/02/2024	04/02/2024	05/02/2024	06/02/2024	07/02/2024	08/02/2024
Hora(s)	03:04:34	02:37:34	02:28:05	02:23:08	03:35:57	02:25:45	03:31:13
WBC	19.54	17.09	16.19	16.07	16.75	16.44	18.33
RBC	2.63	2.67	2.37	2.36	2.23	2.21	2.29
HGB	8.8	8.7	8.0	7.8	7.4	7.2	7.5
HCT	27.4	27.6	24.1	24.5	23.3	22.8	24.0
MCV	104.2	103.4	101.7	103.8	104.5	103.2	104.8
MCH	33.5	32.6	33.8	33.1	33.2	32.6	32.8
MCHC	32.1	31.5	33.2	31.8	31.8	31.6	31.3
PLT	158	163	159	147	155	166	134
RDW-SD							
RDW-CV	27.7	28.1	27.6	----	----	----	27.6
MPV	13.8	----	----	----	13.9	----	----
NRBC#	3.82	3.06	1.48	0.67	0.26	0.10	0.08
NRBC%	19.5	17.9	9.1	4.2	1.6	0.6	0.4

TE: Trombocitosis y VPM no identificado por el equipo

Cortesía: Rúa Carolina

*De
la teoría ...*

*... A la
práctica*

**Desafíos y
soluciones en
diagnóstico y
pronóstico
Molecular**

Desafíos y soluciones en diagnóstico y pronóstico Molecular

- Resolución 2336 de 2023
- CUPS: 90.8.4.12 (estudio molecular de enfermedades)
- 90.8.4.20 (estudio molecular de genes)
- 90.8.4.22 (estudio molecular de exones)
- 90.8.4.24 (estudio molecular de mutaciones)

Realización de
pruebas moleculares
en nuestro contexto



- Mutaciones más relevantes en un solo panel.
- Infraestructura tecnológica avanzada y onerosa que debe ser analizada desde el **costo/beneficio para los pacientes.**

Infraestructura y
metodologías
estandarizadas



Interpretación adecuada de los datos desde la perspectiva diagnóstica y pronóstica propia de cada enfermedad.
Correlación de los resultados derivados de las pruebas especializadas con los hallazgos clínicos.

El hombre creador de energía

***Maestro Rodrigo Arenas
Betancourt 1968
costado sur de la Plazoleta de
Central de la Ciudad
Universitaria de Antioquia***

***Datos de contacto
paola.acevedo@udea.edu.co***

