



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ENTIDAD ACADÉMICA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INMUNOLOGÍA DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS RELACIONADO**

**A LA MUTACIÓN JAK2V617F**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**HERRERA MAYA GABRIEL**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: **DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ENTIDAD ACADÉMICA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INMUNOLOGÍA DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS RELACIONADO**  
**A LA MUTACIÓN JAK2V617F**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**HERRERA MAYA GABRIEL**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: **DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016**



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de septiembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **HERRERA MAYA GABRIEL** con número de cuenta **305127745**, con la tesis titulada **"INMUNOLOGÍA DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS RELACIONADO A LA MUTACIÓN JAK2V617F"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Secretario: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA  
Suplente: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA  
Suplente: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de enero de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional  
Autónoma de México.

Al CONACYT por la beca de manutención recibida (CVU:545322)

A mi tutora principal: Dra. Diana Elodia Aguilar León

A mi Comité Tutor: Dr. Julio Granados Arriola y Dr. Samuel Canizales  
Quinteros

Al Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias  
médicas y nutrición “Salvador Zubiran”

Al Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cancerología

Al Departamento Patología del Centro Médico ABC

## **Agradecimientos a título personal**

Silvia Hansen Bernal, Mostrando el camino cuando la mirada estaba perdida, por el valor de acercarse y compartir temores y alegrías.

José Fernando Herrera Gómez, por acompañar el camino de las decisiones difíciles emocionalmente y académicamente y enseñarme que la estadística es fácil.

María de los Ángeles Maya Sánchez, por apoyar en aspectos integrales de vida, estar ahí para poder soportar sarcasmos y siempre sacar una sonrisa en los momentos difíciles.

Miguel Herrera Maya, siempre con un sentido de vida que marca la diferencia entre lo que es uno y lo que quiere uno, obteniendo de él un punto de vista no antes conocido.

Verónica Herrera Maya, Porque se existencia me ha proporcionado pacienddo bajo cualquier circunstancia.

Rubén y Rose, Sin su amistad y apoyo no hubiera podido alcanzar esta meta.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Lista de tablas y figuras.....	i
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Historia.....	3
Clasificación de las neoplasias mieloproliferativas.....	4
Clasificación.....	5
Policitemia Vera.....	5
Trombocitemia Esencial.....	6
Mielofibrosis Primaria.....	6
Cinasas Janus.....	8
JAK2.....	9
Transductores de señales y activadores transcripcionales (STAT).....	10
Mutación JAK 2V617F.....	11
Clasificación por biología molecular de NMP.....	14
Otras mutaciones.....	17
Tratamiento.....	18
Antecedentes.....	20
Inmunología.....	20
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	23
Materiales y métodos.....	24
Criterios de selección.....	24
Tratamiento de las muestras.....	24
Separación de células.....	24
Extracción de ADN.....	25
Extracción de RNA.....	25
Obtención de ADNc.....	26
Oligonucleótidos.....	26
<i>In silico</i> .....	26
PCR Alelo específico.....	27
PCR.....	27
Digestión con Enzima de Restricción.....	28
Curva de disociación.....	28

Análisis de citocinas por PCR-tiempo real .....	29
Análisis estadístico.....	29
Resultados .....	29
Características clínicas de los pacientes.....	29
<i>In silico</i> .....	31
PCR alelo específico .....	31
PCR .....	33
Digestión con Enzima de Restricción .....	35
Curva de disociación .....	36
Q-PCR vs PCR.....	38
Análisis para la expresión de RNAm de citocinas .....	39
Discusión.....	46
Conclusión.....	50
Perspectivas.....	50
Literatura citada .....	51
Anexos.....	60
A.....	60
Oligonucleótidos usados para genes constitutivos .....	60
Oligonucleótidos para JAK2 utilizados para PCR punto final y PCR tiempo real (melting) ...	60
Oligonucleótidos para citocinas utilizados en PCR tiempo real. ....	60
B.....	61
Valores clínicos de cuenta sanguínea de la muestra utilizada. ....	61
C.....	63
Datos Poblacionales de la muestra utilizada. ....	63
D.....	65
Resultados obtenidos desglosados.....	65
E .....	67
Curva Estándar Para PCR-tiempo real. ....	67

## **Lista de tablas y figuras**

Fig. 1 Moneda republicana romana

Fig. 2 Dominios de las JAK

Fig. 3 Principales rutas de señalización que involucran a JAK2

Fig. 4. Representación esquemática de la JAK2

Fig.5 Porcentajes de NMP cromosoma filadelfia negativo (Ph-)

Fig. 6 Amplificación por PCR alelo específico del gen JAK2

Fig. 7 Amplificación por PCR del gen JAK2

Fig. 8 Porcentajes de positividad a la mutación JAK2V617F por PCR punto final

Fig. 9 Diagrama de sitios y productos del corte con enzima de restricción BSAXI

Fig. 10 Corte con enzima de restricción del fragmento de 508 pb correspondiente al gen JAK2

Fig. 11 Diagrama de fluorescencia de la alineación de productos en tiempo real del gen JAK2

Fig. 12 Porcentajes de positividad a la mutación JAK2V617F por PCR tiempo real

Fig. 13 y 15 Perfil de expresión del RNAm de TNF- $\alpha$  para las NMP

Fig. 14 y 16 Perfil de expresión del RNAm de IL-1 $\beta$  para las NMP

Fig. 17 y 19 Perfil de expresión del RNAm de IL-4 para las NMP

Fig. 18 y 20 Perfil de expresión del RNAm de IL-6 para las NMP

Fig. 21 y 23 Perfil de expresión del RNAm de IL-23 para las NMP

Fig. 22 y 24 Perfil de expresión del RNAm de IL-17 para las NMP

Fig. 25 Perfil de expresión del RNAm de TNF- $\alpha$  en TE comparando la presencia o ausencia del marcador JAK2V617F.

Tabla.1 Manifestaciones clínicas que se comparten entre NMP

Tabla. 2 Citocinas estimulantes de las principales proteínas relacionadas a la ruta JAK/STAT

Tabla. 3 Criterios según la OMS

Tabla. 4 Principales fármacos para el tratamiento de NMP's JAK2V617F

Tabla. 5 Valores promedio de biometría hemática para cada grupo de NMP.

## **Resumen**

JAK2 es una tirosina cinasa que promueve el crecimiento de líneas mieloides mediante la activación constitutiva de las rutas relacionadas a JAK2, STAT5, PI3K, ERK y AKT.

La ocurrencia de mutaciones somáticas en JAK2 deriva en la expansión clonal de células mieloides que terminarán por reemplazar las células hematopoyéticas sin mutación, como ocurre en policitemia vera, trombosis esencial y mielofibrosis primaria. Padecimientos relacionados con al ocurrencia de la mutación JAK2V617F. Lo anterior sugiere que las características inmunológicas entre estas neoplasias son similares, sin embargo estas aún no han sido bien descritas.

En este estudio se evaluaron por biología molecular los métodos adecuados para la clasificación de la mutación V617F del gen JAK2 en muestras de aspirado de médula ósea y de sangre periférica.

Se utilizaron equipos sensibles como el PCR tiempo real y PCR punto final y como resultado se sugiere la metodología en PCR tiempo real como la técnica adecuada para la clasificación de las neoplasias mieloproliferativas. Derivado de las características inmunológicas evaluadas en este trabajo se observó que aun cuando la policitemia vera, la trombosis esencial y la mielofibrosis primaria pueden ser originadas por la mutación JAK2V617F, la respuesta inmune para cada una resultó ser diferente tras haber medido citocinas relacionadas con la inflamación.

## **Abstract**

JAK2 is a tyrosine kinase that promotes growth of myeloid lineage by constitutive activation of JAK2, STAT5, PI3K, AKT and ERK related pathways.

The occurrence of somatic mutation in JAK2 resulting in clonal expansion of myeloid cells which eventually replace the unmutated hematopoietic cells, as in polycythemia vera, essential thrombosis and primary myelofibrosis. Conditions related to the occurrence of JAK2V617F mutation. This suggests that the immunological characteristics between these tumors are similar, but these have not been well described.

In this study the appropriate methods for the classification of the JAK2 V617F mutation in samples of bone marrow aspirates and peripheral blood were evaluated by molecular biology. Sensitive equipment such as real-time PCR and endpoint PCR were used and as a result the methodology suggested by real-time PCR as the proper technique for the classification of myeloproliferative neoplasms. Derived from the immunological characteristics evaluated in this study was observed that even when polycythemia vera, essential thrombosis and primary myelofibrosis may be caused by the JAK2V617F mutation, immune responses to each turned out differently after having measured inflammation-related cytokines .

## Introducción

### Historia

Neoplasia es el término que 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 (Taylor 2000). Neoplasia mieloproliferativa (NMP) es el nombre que recibe un grupo de afecciones hematológicas antes conocidas como enfermedades mieloproliferativas, por su característica proliferación de los linajes mieloides (Swerdlow et al. 2008). Las primeras formas de NMP se describieron entre 1845 y 1934, de los cuales se distinguieron tres tipos: policitemia vera (PV), trombosis esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP). Estos trastornos se caracterizan por sus semejantes manifestaciones clínicas, únicas en relación con otras NMP (Tabla.1) (Tefferi 2006; Spivak & Moliterno 2007; Geyer et al. 2014).

Gustav Heuck realizó en 1879 la primera descripción de MFP, tras su observación de crecimiento atípico y malformación del núcleo en megacariocitos (Lichtman 2005). Por otro lado, hacia 1903 Osler fundamentó la existencia de PV con base en una elevada concentración de eritrocitos. Por último, Epstein Barr y Goedel descubrieron en 1934 un estado trombocitémico denominado en la actualidad TE que se caracteriza por sus niveles elevados de plaquetas en ausencia de infección (no reactivo) (Navarro 2010).

Cabe mencionar que no fue sino hasta 2008 que estos desordenes fueron clasificados como NMP (Swerdlow et al. 2008). Hacia 1951 las NMP conformaban una categoría clínico patológica que incluía la leucemia crónica mielógena, PV, TE, MFP y eritroleucemia, clasificación que fue propuesta por William Damashek (Hsu 2007).

<b>Características compartidas entre NMP's</b>
<b>Anormalidades en los cromosomas 1, 8, 9, 13 y 20</b>
<b>Formación de colonias independientes de factores de crecimiento hematopoyético</b>
<b>Expresión de la mutación JAK2V617F</b>
<b>Mutaciones en el exón 12 de gen JAK2</b>
<b>Sobreexpresión del mRNA PVR-1</b>
<b>Mutaciones W515K/L y K39N</b>
<b>Trombosis y hemorragia</b>

Tabla.1 Manifestaciones clínicas que se comparten entre NMP's

A finales de la década de los sesentas, Louis Wasserman fundó el grupo de estudio para PV cuyo objetivo fue describir el origen del padecimiento, establecer sus criterios diagnósticos y realizar pruebas clínicas a gran escala (Navarro 2010; Tefferi et al. 2009). De este grupo de investigación surgió el trabajo de Fialkow y sus colegas, quienes implementaron el uso del gen de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa como marcador para los desórdenes mieloproliferativos a nivel clonal de células pluripotenciales (Tefferi 2006). Ese fue uno de los primeros intentos para diagnosticar la PV.

Para el año 1982 el mismo Damashek definió la PV como una panmielosis que presenta características como esplenomegalia, predisposición a trombosis arterial-venosa, mielofibrosis y evolución a leucemia mieloide aguda (Navarro 2010).

En la actualidad entendemos a las NMP como enfermedades hematológicas malignas, siendo las más comunes: PV, TE y MFP (Baxter et al. 2005). Estos desordenes comparten características entre las que destaca su tendencia a transformarse en leucemia mieloide aguda (Vassiliou et al. 2006; Kundranda et al. 2012). Baxter *et al.* proponen que las NMP se originan por la transformación de células madre hematopoyéticas, ya que la patogénesis molecular aún no se comprende. El mismo grupo de trabajo, en 2005, reporta la mutación JAK2V617F como el origen de las NMP (Tefferi et al. 2009). Posteriormente proponen la detección de la mutación JAK2V617F como característica de las NMP (Baxter et al. 2005).

### **Clasificación de las neoplasias mieloproliferativas**

Las NMP son desordenes clonales de las células troncales hematopoyéticas, con proliferación de uno o más de los linajes mieloides. Estas enfermedades aparecen entre los 50 a 70 años de edad generalmente, con una incidencia de 6 a 10 personas por cada 100,000 habitantes anualmente. Son caracterizadas por la hiperplasia de la médula ósea sin afectar la maduración hematopoyética; esplenomegalia o hepatomegalia. Además presentan niveles altos de plaquetas, eritrocitos y granulocitos en sangre periférica. Actualmente las NMP incluyen a leucemia mieloide crónica, leucemia neutrofílica crónica, PV, TE, MFP, leucemia eosinofílica crónica, mastocitosis y neoplasia mieloproliferativa no clasificable (Swerdlow et al. 2008).

En 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) acuña el término neoplasia para estas enfermedades. En el mismo año, se establecieron los criterios diagnósticos como

caracterización histológica y marcadores moleculares. Estos criterios diagnóstico son importantes para poder proporcionar tratamiento farmacológico adecuado. Tratamiento que dependerá de la presencia o ausencia de la mutación JAK2V617F (Navarro 2010; Tefferi et al. 2009).

Las alteraciones que pueden presentarse en las NMP son: trombosis, hemorragias, hematopoyesis extramedular (común en bazo e hígado) (Konoplev et al. 2007; Santos & Verstovsek 2011) y cromosoma filadelfia negativo (Ph-) (Malcovati & Cazzola 2008). La expectativa de vida para pacientes con PV y TE varía de 5 a 7 años y para pacientes con MFP a más de 15 años (Santos & Verstovsek 2011).

La característica mayor, de acuerdo a la OMS, para la clasificación se basa en los valores de referencia para la cuenta plaquetaria o la cuenta de eritrocitos. Esta característica compromete la detección de las fases tempranas de la enfermedad. Por lo tanto la detección temprana de las NMP se consideran una herramienta biológicamente relevante para la medicina preventiva (Tefferi 2006).

Las NMP, presentan una relación con el gen JAK2. Sin embargo hay excepciones dentro de los síndromes mielodisplásicos (SMD) como es el caso del desorden denominado anemia refractaria con sideroblastos en anillo y marcada trombocitosis (Tefferi et al. 2009; Santos & Verstovsek 2011; Szpurka et al. 2006). A largo plazo se ha reportado que algunos de los individuos con PV y TE pueden progresar a MFP o leucemia mieloide aguda. Así mismo la MFP, se caracteriza por la presencia de fibrosis de la médula ósea, citopenia y esplenomegalia, que puede también transformarse en leucemia mieloide aguda (Baxter et al. 2005; Vardiman & Hyjek 2011).

## **Clasificación**

### **Policitemia Vera**

A partir del 2005 se le atribuye el origen del proceso neoplásico a la presencia de mutaciones en el gen JAK2. En este caso la Mutación JAK2V617F desencadenan la fosforilación constitutiva de las vías mediadas por las proteínas JAK-STAT. La mutación clonal en estado heterocigoto se ha relacionado a elevados niveles de hemoglobina y prurito. La mutación JAK2V617F en estado homocigoto genera hiperproliferación de eritrocitos acompañado de

leucocitosis y esplenomegalia. El Genotipo heterocigoto u homocigoto de la mutaciones JAK2V617F confiere ventajas proliferativas independientes de factores de crecimiento, como la eritropoyetina (Navarro 2010; Hsu 2007).

Los criterios diagnóstico de acuerdo a la OMS contemplan niveles de hemoglobina mayores a 18.5 g/dl en hombre y 16.5% g/dl en mujeres o evidencia de aumento en el volumen de eritrocitos y presencia de marcadores moleculares (Hsu 2007; Vardiman et al. 2009) (Tabla. 2). PV tiene una distribución dependiente de sexo, siendo las mujeres las que más frecuentemente presentan esta enfermedad y a menor edad que los hombres, la complicación más frecuente es la trombosis hepática (Spivak & Moliterno 2007).

Así mismo es importante evaluar que la biopsia de médula ósea muestre hiper celularidad en: líneas eritroide, granulocítica y/o megacariocítica. Los niveles de eritropoyetina por debajo de los rangos de referencia y formación de colonias eritroides endógena *in vitro* (Swerdlow et al. 2008).

### **Trombocitemia Esencial**

La TE presenta malformaciones en la línea megacariocítica, con elevadas concentraciones de hemoglobina y leucocitosis. Se presenta en personas de edad mayor con transformación a PV. Esta neoplasia no se ha asociado con riesgo de trombosis, pero si a la transformación a leucémica mieloide aguda (Navarro 2010).

Los criterios de diagnóstico para esta NMP de acuerdo a la OMS son: cuentas plaquetarias mayores o iguales  $450 \times 10^9/L$ , biopsias de médula ósea con incremento en la proliferación en el linaje megacariocítico, sin aumento en granulopoyesis de la línea de los neutrófilos o en la eritropoyesis. Se debe demostrar la presencia de JAK2V617F o que no exista evidencia de trombosis reactiva (Vardiman et al. 2009) (Tabla. 2). Tiene distribución dependiente de sexo siendo más frecuente la presencia en mujeres que en hombres (Spivak & Moliterno 2007).

### **Mielofibrosis Primaria**

La MFP se caracteriza por esplenomegalia, granulocito y eritrocitos inmaduros en sangre periférica y glóbulos rojos en forma de lágrima (diacriocitos). En su fase temprana, esta

enfermedad se caracteriza por un número elevado de células CD34 positivas en la médula, mientras que las fases posteriores implican fibrosis medular con disminución de células CD34 en la médula, así como aumento correspondiente de congestión esplénica y hepática con células CD34 (Navarro 2010).

La clasificación de las neoplasias según la OMS indica proliferación megacariocítica y atipia, usualmente acompañada por fibrosis de reticulina y/o colágena, ausencia de fibrosis reticulínica, cambios en los megacariocíticos que deben ir acompañados por incremento de células en la médula ósea, proliferación granulocítica y frecuentemente disminución de eritropoyesis. Descartar criterios de leucemia mielógena crónica, PV, síndrome mielodisplásico u otro neoplasma mieloide. Demostrar la mutación JAK2V617F u otro marcador clonal. Ausencia de fibrosis reactiva o secundaria en médula ósea (Tabla. 2) (Vardiman et al. 2009).

Otros criterios que se deben considerar son síndrome leucoeritroblástico, aumento de las concentraciones séricas de lactato deshidrogenasa, anemia, y esplenomegalia palpable (Vardiman et al. 2009). Como síntomas podemos encontrar pérdida de peso, sudor nocturno, fatiga, y fiebre (Navarro 2010; Santos & Verstovsek 2011).

	<b>Biometría hemática</b>	<b>Clínica</b>	<b>Marcadores moleculares</b>	<b>Patología</b>
PV	Hemoglobina >18.5 g/dL (H) >16.5 g/dL (M)	< Eritropoyetina sérica >UFC'seritoides	JAK2V617F (95%) y Exón12	Hiper celularidadtrilineal Panmielosis
TE	Plaquetas > 450x10 <sup>9</sup> /L	NA	JAK2V617F (50-60%)	>Megacariocitos Hipersegmentación
MP	Anemia Leucoeritroblastosis > Lactato deshidrogenasa	Esplenomegalia >DHL	JAK2V617F (50%) y MPLW515/L	Megacariocitos atípicos Fibrosis

Tabla 2. Criterios según la OMS para el diagnóstico de las diferentes neoplasias mieloproliferativas. Entre paréntesis la frecuencia en la que se encuentra el marcador molecular JAK2V617F. NA: no aplica (Vardiman et al. 2009).

## Cinasas Janus

Las cinasas Janus (JAK) son tirosin cinasas asociadas a receptores de citocinas que forman parte de vías de señalización destinadas a la regulación de la expresión génica. Su nomenclatura proviene del Dios romano Janus quien es representado con dos caras que hacen referencia a los opuestos, como el inicio y el fin. (Fig. 1) (Lee et al. 2009).



Fig.1 Moneda republicana romana que representa al Dios Janus (Museo Kunsthistorisches)

Existen cuatro miembros de la familia JAK en humanos (JAK1, JAK2, JAK3, TyK2) los cuales contienen siete regiones diferentes (JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, JH6, JH7) (Santos & Verstovsek 2011; Ward et al. 2000; Mendiola & Cruz 2005; Maures et al. 2007) (Fig.2). La unión del ligando al receptor activa las cinasas, con la consecuente activación de rutas de señalización intracelulares (Santos & Verstovsek 2011). Estas cinasas citoplasmáticas tienen capacidad de transducción de señales para múltiples receptores involucrados a hormonas y factores de crecimiento hematopoyéticos (Baxter et al. 2005).

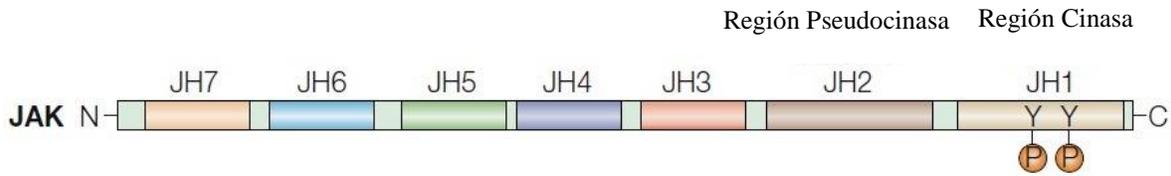


Fig. 2 Regiones de las JAK mostrando la ubicación de la región pseudocinasa y la region cinasa, así como la ubicación de los residuos de tirosina que se fosforilan al activarse esta cinasa (Shuai & Liu 2003).

## JAK2

En la proteína JAK2 las regiones N terminales JH6 y JH7 son importantes para la adhesión de la molécula a los receptores de citocinas y el mantenimiento de la expresión del receptor (Santos & Verstovsek 2011). Las regiones JH3-JH4 muestran similitud con los dominios SH2 (proteínas de unión a tirosinas conservadas) que en conjunto con la región JH4-JH7 están encargados de la interacción proteína-proteína debido a su homología con los dominios FERM (dominio de unión a lípidos) que son críticos para la interacción de la porción citoplasmática del receptor a JAK2 (Girault et al. 1998).

El dominio JH2 se ha reportado que en condiciones no fisiológicas posee actividad catalítica (Bandaranayake et al. 2012). Su función es inhibir y regular la actividad del dominio JH1 controlando la activación de la señalización inducida por citocinas (Saharinen & Silvennoinen 2002), de esta manera la eliminación de la región JH2 tiene como consecuencia el incremento de la actividad cinasa.

La región JH1 es una verdadera región tirosin cinasa, responsable de la actividad cinasa de las moléculas JAK (Santos & Verstovsek 2011) incluye tirosinas conservadas que son componentes críticos de la asa de activación localizándose en Y1007/Y1008 (Feng et al. 1997).

JAK2 es esencial en las rutas que controlan el desarrollo eritroide, mieloide y megacariocítico, pero no para la linfopoyesis (Santos & Verstovsek 2011). En líneas celulares una mutación puntual a la secuencia del dominio pseudocinasa promueve el crecimiento independiente de citocinas, acompañado de la activación constitutiva de las rutas relacionadas a JAK2, STAT5 y PI3K, ERK y AKT. De la misma forma las líneas celulares

que tienen la mutación en estado homocigoto, cuentan con la activación constitutiva de JAK2, STAT5 y ERK (Tefferi 2006) (Fig. 3).

### **Transductores de señales y activadores transcripcionales (STAT)**

En mamíferos se han identificado 7 proteínas STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, destacando a STAT5a/b como la responsable de la regulación hematopoyética (Ward et al. 2000). Las STAT son factores transcripcionales que se activan después de ser reclutados por un complejo receptor-cinasa. En el caso de las NMP la eritropoyetina activa su receptor. Posteriormente JAK2 es fosforilada por el receptor de eritropoyetina. Posteriormente STAT5a/b es fosforilada por JAK2 (Fig.3). Una vez activadas se transporta al núcleo, donde afectan la expresión génica. Las STAT tienen dominios homólogos a Src involucrados en la dimerización de las proteínas. El dominio terminal está involucrado en la translocación a núcleo y el dominio de unión a DNA es un barril- $\beta$  con pliegues tipo inmunoglobulina (McBride et al. 2000).

La regulación de la hematopoyesis relaciona a las proteínas JAK y STAT mediante la ruta de señalización JAK2-STAT5a/b es un descubrimiento realizado durante la investigación de los efectos del INF- $\alpha$  (Lee et al. 2009; Leonard & O'Shea 1998; Wilks 1989). Por lo tanto, las STAT son factores transcripcionales latentes. Esto quiere decir que hasta que estas proteínas son fosforiladas se liberan formando dímeros que viajan a núcleo e inducen la expresión génica específica. STAT5a/b incrementa la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, angiogénesis y resistencia a apoptosis (Santos & Verstovsek 2011) (Fig.3) por su estrecha relación a factores de crecimiento y citocinas como IL-2, IL-3, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos y el factor estimulador de colonias de granulocitos (Ward et al. 2000).

JAK2-STAT5 a/b regula la transcripción de BCL-X, regulando la diferenciación megacariocítica y eritroide en pacientes con NMP (Baxter et al. 2005; Ward et al. 2000; Levine et al. 2007). Alteraciones en las expresiones de marcadores biológicos como la desregulación de BCL-X, la sobreexpresión de PRV-1 y el factor de transcripción NF-E2 se deben a la activación de la ruta JAK2/STAT5a/b a través de una mutación ubicada en el codón mutación 617 del dominio pseudocinasa de JAK2 (Hsu 2007) tema que se trata a continuación.

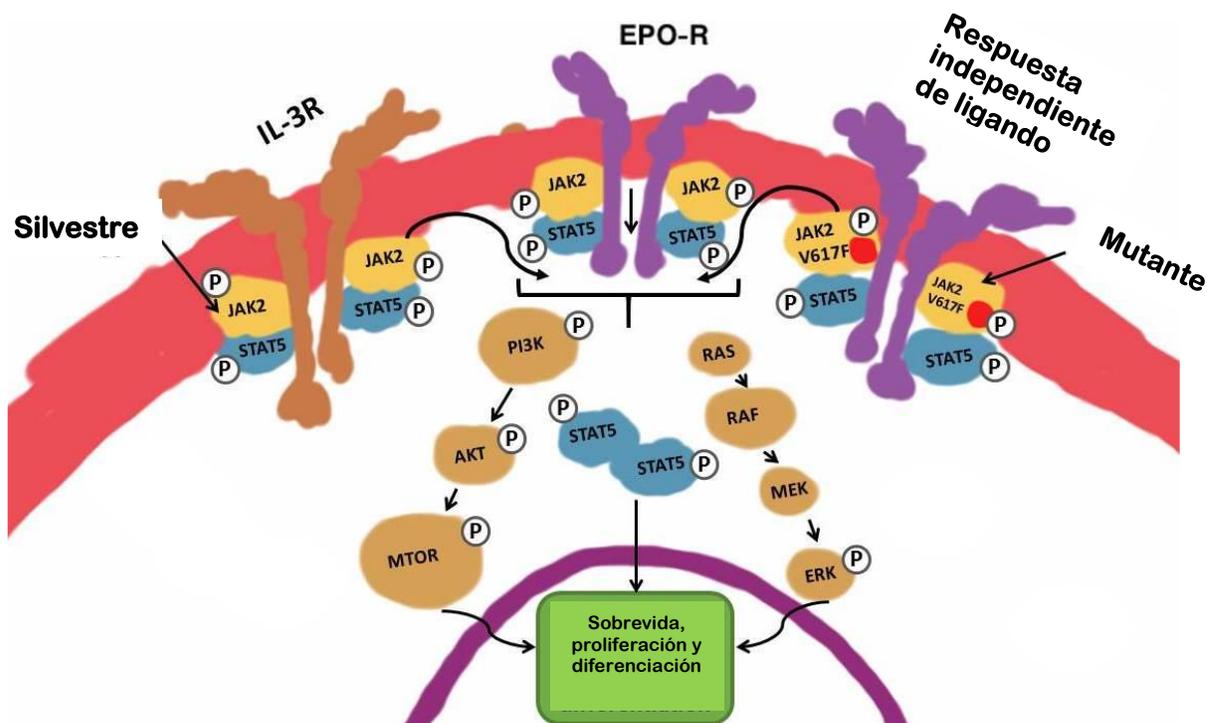


Figura 3. Principales rutas de señalización que involucran a JAK2. A la izquierda se ejemplifica lo que sucede con JAK2 sin mutaciones asociada a un receptor de citosinas, al centro se ejemplifica lo que sucede con una JAK2 en la mielopoyesis y a la derecha se ejemplifica lo que sucede con una JAK2 con una mutación en la mielopoyesis. IL-3R, receptor de IL-3; EPO-R, receptor de eritropoyetina; JAK2, cinasa Janus 2; STAT5, Transductores de señales y activadores transcripcionales; PI3K, cinasa 3- fosfoinositol; AKT, proteína cinasa B; MTOR, proteína objetivo mecanístico de rapamicina; RAS, proteína sarcoma de rata; RAF, sarcoma rápido acelerado; MEK, proteína cinasa activada por mitógeno; ERK, cinasas reguladas por señales extracelulares; P, fosforilación.

### Mutación JAK 2V617F

Las ocurrencias de lesiones genéticas y mutaciones proveen de marcadores moleculares capaces de facilitar la clasificación de las NMP, además proporcionan de herramientas para describir el mecanismo responsable de patologías asociadas (Spivak & Moliterno 2007). Mutaciones somáticas en células multipotenciales producen la expansión clonal de células mieloides que terminaran por reemplazar a las células hematopoyéticas sin mutación (Tefferi et al. 2009; Malcovati & Cazzola 2008; Levine et al. 2007).

JAK2 está localizado en el cromosoma 9 región p24 (Passamonti et al. 2011) se ha considerado un marcador diagnóstico, junto con valores de referencia clínicos y

hematológicos (Tabla3), para las NMP (Zhao et al. 2011) y solo para estas neoplasias. La mutación somática que se usa actualmente para el diagnóstico de NMP en JAK2 es un cambio de nucleótido G-C por T-A en el exón 14 del gen JAK2 en la posición 1849 produciendo la sustitución de una valina (V) por una fenilalanina (F) en el codón 617 del marco de lectura genético (Navarro 2010), denominándose a esta JAK2V617F. En específico se define a la mutación V617F como una anormalidad somática genética que resulta en la supresión de la regulación negativa de la actividad cinasa de JAK2 y produce auto-fosforilación del dominio JH1 por liberación de la inhibición de la región JH2 (Navarro 2010; Passamonti et al. 2011; Percy & McMullin 2005).

Esta mutación permite desarrollar hipersensibilidad a una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento como lo son IL-3, trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento insulínico (IGF) y eritropoyetina (EPO), entre otras citocinas (Tabla.3) lo que induce al incremento de los niveles basales de proliferación y supervivencia (Benmoussa et al. 2011).

Proteína	Citocinas activadoras	Referencias
JAK2	EPO, TPO, IL-3, IL-5, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-23, IL-13, OSM, LIF, Leptina, GH, PLR, PDGF, EGF	(Ward et al. 2000; Mendiola & Cruz 2005; O'Shea et al. 2013)
STAT5a/b	IL-2, IL-3, IL-7, GM-CSF, G-CSF, Leptina, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-9, IL-15, IL-5	(Ward et al. 2000; Mendiola & Cruz 2005; O'Shea et al. 2013)

Tabla 3. Citocinas estimulantes de las principales proteínas relacionadas a la ruta JAK/STAT en desordenes mieloproliferativos. EPO, eritropoyetina; TPO, trombopoyetina; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos; OSM, oncostina; LIF, Factor inhibidor de leucemia; GH, Hormona del crecimiento; PLR, prolactina; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGF, factor de crecimiento epidermal.

Aun es tema de debate la hipótesis en la cual se sugiere que la mutación JAK2V617F es de origen secundario a otras afectaciones. Lo que significaría que esta mutación es un efecto del

proceso neoplásico y no como una mutación iniciadora. Colocando a las patologías NMP con mutación JAK2V617F positiva como un efecto en las etapas de desarrollo neoplásico (Kralovics et al. 2006; Pardanani 2007). Sin embargo las frecuencias y efecto de tener la mutación JAK2V617F son claros y es necesario determinar la mutación y otras posibles mutaciones en esta cinasa para poder dar un tratamiento efectivo y actualizado con respecto a las posibles modificaciones en la clasificación de las NMP.

En casos particulares la leucemia mieloide crónica atípica (Fend et al. 2008) síndromes mielodisplásicos, leucemias eosinofílica crónica, leucemia neutrofílica crónica, no suelen ser positivos para JAK2V617F al momento del diagnóstico, aunque en muy raras ocasiones se encuentran marcadores para NMP como JAK2V617F entre otras NMP atípicas (Vardiman & Hyjek 2011) llegando a encontrar este marcador en neoplasias no hematológicas (Xu et al. 2007).

Al estar ausente en la mayoría de los desórdenes mielodisplásicos se le considera el marcador molecular ideal para las NMP (Kremer et al. 2006) con ligeras excepciones de ocurrencia (Szpurka et al. 2006; Flach et al. 2010). También se ha reportado la existencia de mutaciones dobles en diferentes codones dentro de la misma región como es el caso particular de la mutación compartida JAK2L611V/V617F que llevan a la activación de rutas de señalización que se relacionan a la proliferación pero que son diferentes a las rutas de señalización que se relacionan a la ruta JAK2/STAT5 (Cleyrat et al. 2010).

Encontramos también que la mutación JAK2V617F está relacionada a la fibrosis en bazo y sin encontrar evidencia de fibrosis en los compartimientos hematopoyéticos (Konoplev et al. 2007) lo cual nos hace preguntarnos si esta mutación está relacionada a la activación de mecanismos que promueven un ambiente a favor de la trombosis en los vasos sanguíneos (S L Etheridge et al. 2014).

El ambiente se relaciona al nivel de compartimentalización para estas enfermedades. El ambiente del estroma en médula ósea interviene en el proceso neoplásico. Ambiente que involucra una respuesta a la presencia de mutación puntual y para la respuesta inmunológica también. Por otro lado, la presencia de marcadores en sangre periférica puede reflejar otra cara del proceso neoplásico. (Bennemann et al. 2012).

La mutación JAK2V617F estudiada en poblaciones, con un aproximado de 20,000 muestras de sangre periférica, (Lee et al. 2009) encontraron que la mutación V617F se encuentra en

90% de los casos de PV, 55% de los casos de TE y 55% de los casos de MFP (Baxter et al. 2005; Xia et al. 2012; Scott et al. 2007; Butcher et al. 2008). Sin embargo los estudios relacionados a la mutación JAK2V617F se enfocan sólo a una mutación, ignorando la posible relación de los nucleótidos adyacentes a la mutación.

De esta forma estudios, llevados a cabo en ratones modificados genéticamente, han logrado describir más efectos de esta mutación puntual. Estudios que han dado evidencias de la importante participación de STAT5a/b, cuando se está presenta la mutación JAK2V617F en el desarrollo de una NMP. De tal manera que en ausencia de la proteína STAT5a/b no se genera una NMP (O'Shea et al. 2013). Esto es un ejemplo de los intentos de describir la patogénesis en cepas de ratones knockout para las NMP. Estos estudios, siendo muy importantes, aun no logran el comportamiento independiente de PV, TE y MFP (Li et al. 2011; S. O. Park et al. 2013) mostrando que la mutación JAK2V617 pudiera depender de otros factores para el desarrollo de una NMP.

### **Clasificación por biología molecular de NMP**

Para la clasificación de estas neoplasias con el marcador JAK2V617F se describen varias técnicas entre los cuales encontramos la secuenciación, pirosecuenciación, PCR alelo específico (Baxter et al. 2005; Vigil et al. 2013), fragmentos de restricción para polimorfismos (Baxter et al. 2005), q-PCR altamente específico (Fantasia et al. 2014), HPLC, espectrometría de masas (Zhao et al. 2011) y Snapback (Wu et al. 2014). Estas técnicas tienen diferentes sensibilidades y cuentan con la posibilidad de brindar más información sobre lo que sucede alrededor de una mutación puntual. Hasta la fecha son pocas las técnicas con regulación sanitaria para el correcto diagnóstico de estas enfermedades.

Algunas de estas técnicas tienen la capacidad de cuantificar la expresión genética “carga alélica”. La carga alélica permite relacionar el tipo de NMP que se está presentando a un fenotipo. La carga alélica baja se relaciona a características que se presentan en la TE y la carga alélica alta se relaciona a características que se presentan en la PV. La utilidad de esta información está relacionada directamente con las características clínicas de laboratorio como lo son el prurito, esplenomegalia, cuentas celulares, evolución de la fibrosis (Kiladjian 2012) monitoreo del tratamiento y tipo de fármaco disponibles para el tratamiento (Malhotra

2012; S. H. Park et al. 2013; Tiedt et al. 2008). Sin embargo la carga alélica, por si sola, no logra diferenciar entre PV, TE o MFP.

Recientemente se han reportado mutaciones que involucran los exones 12, 13, 14 y 15 del gen JAK2 (Lee et al. 2009). Las mutaciones encontradas los exones 12 (K539), 13(R564L, L579F, H587N, S591L), 14 (H606Q, V617I, C618R) y 15 (L624P) (Fig.4) son de particular interés para la descripción de mutaciones asociadas a las NMP. No hay que limitar la aparición de las NMP a la mutación JAK2V617F. En el mejor de los casos debe de ser estudiada la mayor parte del dominio JH2 del gen JAK2 y otras moléculas asociadas a la ruta JAK/STAT (Lee et al. 2009; Schnittger et al. 2009; Ma et al. 2009).

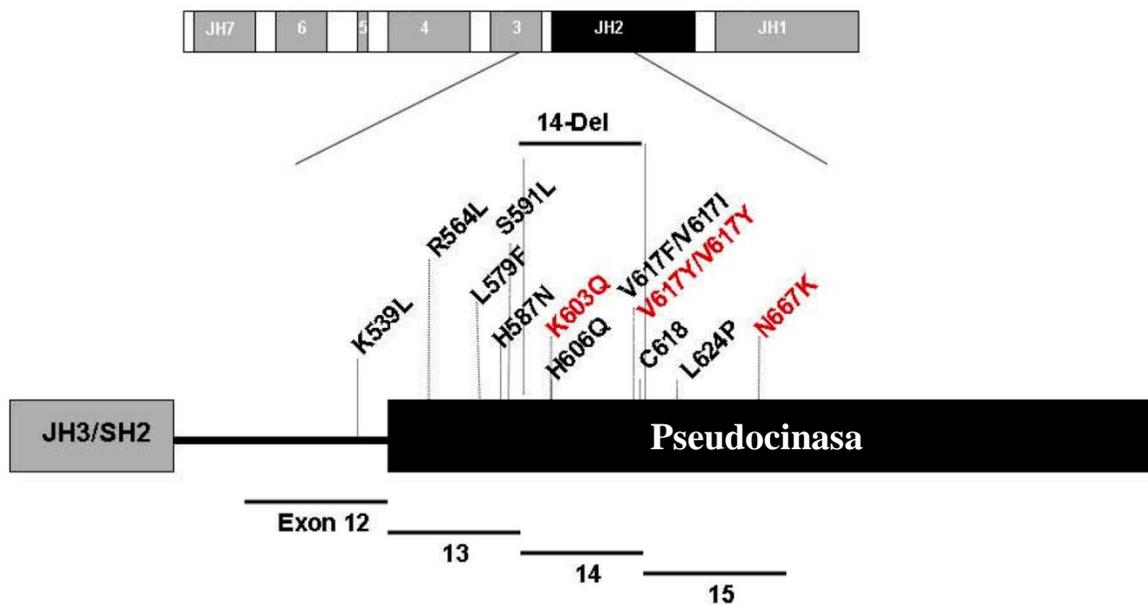


Fig. 4. Representación esquemática de JAK2 con sus 7 dominios. Se muestra en amplio las mutaciones que han sido descrita hasta 2009 en el dominio pseudocinasa, en rojo se muestran mutaciones que sólo se encuentran en mamíferos no humanos y en negro las mutaciones que se han descrito en humano (Lee et al. 2009).

Métodos como el de Anna H Zhao, *et al.* en el cual se amplifica por PCR una región de JAK2. Posteriormente se lleva a cabo la digestión del primer amplificado con la enzima de restricción BsaXI. Y finalmente se elabora un PCR anidado que resulta en la amplificación del fragmento con la mutación V617F (Zhao et al. 2011) o PCR alelo específico para la mutación V617F (Bock et al. 2006), sin la amplificación del fragmento silvestre de JAK2. Este método no considera mutaciones como C618R y V617I que existen en alta cercanía a la

mutación V617F (Lee et al. 2009). Las mutaciones C618R y V617I no afectan los dominios de corte de la enzima de restricción BsaXI, resultando en una clasificación errónea de las NMP. Lo cual podría llevar a un tratamiento que podría no favorecer la recuperación del individuo.

Por otro lado, se ha observado la aparición de 3 bandas después de la amplificación inicial de JAK2, con la posterior digestión con enzima de restricción BsaXI (Datos no publicados). Se verificó el efecto de alineación inespecífica de los oligonucleótidos reportados por Anna H Zhao, *et al.* (Datos no publicados) y no hay resultados que muestren alineación de oligonucleótidos inespecífica. Las mutaciones que se encuentran cercanas unas de otras son difíciles de observar y aún más difícil si estas se encuentran en un menor porcentaje respecto a la secuencia silvestre (Lander et al. 2001).

Como ejemplo para mostrar la dificultad de elaborar pruebas de clasificación para mutaciones puntuales en un gen. Utilizaré la metodología para clasificar mutaciones en el gen KRAS. En este trabajo se producen 4.7% de resultados no interpretables para el método de polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción. Este caso nos expone al mismo tiempo otros tipos de técnicas y el porcentaje de resultados no interpretables.

Por el método de curva de disociación de alta resolución se tiene un 5.5% de resultados no interpretables. Y el caso con menos resultados interpretables nos los da el método por sondas TaqMan con un 3.3% de resultados no interpretables. Al mismo tiempo los métodos de diagnóstico por curva de disociación de alta resolución y sondas TaqMan, no generan falsos positivos en los resultados (Chretien et al. 2013) en este caso las sondas TaqMan brindan mayor sensibilidad con menor porcentaje de error y que está enfocado a más de una sola mutación puntual.

Entre otras complicaciones se puede decir que la secuenciación puede no reflejar el real estado de estas neoplasias, esto debido a que se necesita de más del 40% de células en estado heterocigoto para poder detectar la mutación (Baxter et al. 2005; Bench et al. 2013). Con lo cual no se podría tener la sensibilidad que se necesita para determinar estados tempranos de las NMP, disminuyendo la posibilidad de un mejor cuidado al individuo. Uno de los métodos más sensibles y que brinda más información respecto a la situación cromosómica de las posibles mutaciones implicadas es la curva de disociación en q-PCR. Este método nos permite saber si la mutación se encuentra como homocigoto o como heterocigoto con lo

cual hacer una inferencia respecto al tiempo de duración de la enfermedad, siendo que el carácter homocigoto nos refleja la evolución de la enfermedad en mayor tiempo que en un individuo heterocigoto (Bench et al. 2013; Ho et al. 2012; Sattler et al. 2006).

### **Otras mutaciones**

En busca de mutaciones que expliquen la aparición de PV, TE y MFP sin la presencia de JAK2V617F se describieron translocaciones en las diferentes líneas celulares de los componentes hematopoyéticos y que se relacionan a citogenética, estas aberraciones cromosómicas no son homogéneas y aun no se ha descrito su participación en la patología de la enfermedad (Vassiliou et al. 2006). En 2007 se describen mutaciones en el exón 12 de JAK2: N542-E543 del, F537-K539delinsL, K539L y la H538Q-K539L, mismas que se asocian específicamente con PV o con eritrocitosis aisladas asociadas con concentraciones séricas bajas de eritropoyetina, especialmente en jóvenes (Navarro 2010; Vardiman et al. 2009; Schnittger et al. 2009) así como mutaciones relacionadas a males hematológicos en leucemias linfoblásticas en niños con síndrome de Down en particular la mutación JAK2R683G/S (Kearney et al. 2009). Tres mutaciones se han reportado para casos familiares de NMP, se ha denominado V617I encontrada en una sola familia, R564Q encontrada en una sola familia y H608N en 2 familias que presentan síndromes parecidos a NMP en toda la descendencia. Comprobando el origen germinal de estas mutaciones al encontrar las respectivas mutaciones tanto en componentes mieloides como linfoides (Elisa Rumi et al. 2014; S Leah Etheridge et al. 2014; Mead et al. 2013).

En 1-4% de los casos de TE se ha encontrado mutaciones somáticas activadoras, que involucran al gen MPL resultando de un cambio de nucleótido G>T, en la posición 1544, que ocasiona una sustitución de un triptófano (W) por una leucina (L) en el codon 515. Ninguna de estas mutaciones se encuentra en las trombocitosis reactivas (Navarro 2010; Tabarroki & Tiu 2014). También se ha asociado mutaciones al exón 12 del gen TET2 en un 10% de los casos. Mismo caso para MFP donde el 4% de los casos se ha asociado con mutaciones somáticas activadoras del MPL (MPL W515K/L) y 17% de los casos se asocia a mutaciones al exón 12 del gen TET2 (Vardiman et al. 2009; Tabarroki & Tiu 2014; Tefferi 2010).

Las mutaciones antes mencionadas se encuentran en proporción baja de las poblaciones estudiadas y considera que se pueden englobar en mutaciones relacionadas a proteínas tirosincinasa, mutaciones en activadores de receptores, o en la regulación negativa de reguladores. Dentro de las mutaciones asociadas a las NMP Thorsten Klampfl, *et al.* en 2013 describen mutaciones para el gen de calreticulina en TE y MFP, sin encontrarse en PV siendo de los pocos genes asociados a NMP que puede diferenciar entre entidades patológica (Klampfl et al. 2013).

Al mismo tiempo esta mutación se describe en la mayor parte de la población que no presenta mutaciones para JAK2 siendo mutuamente excluyentes (Klampfl et al. 2013). Hasta ahora se han descrito 23 diferentes mutaciones para el gen de calreticulina, de las cuales las más comunes son inserciones o deleciones. Estas mutaciones tienen diferencias en cuanto a valores clínicos en comparación a aquellas NMP con presencia de mutación JAK2V617F (E Rumi et al. 2014). Las principales diferencias se encuentran en la edad en la que se presenta la enfermedad y la cuenta plaquetaria (Andrikovics et al. 2014).

La calreticulina es una proteína muy conservada con múltiples funciones, en el retículo endoplásmico esta proteína regula el plegamiento de proteínas y glicoproteínas, pero en compartimentos extracelulares la función de esta proteína está relacionada con proliferación, apoptosis y muerte celular relacionada a factores inmunológicos (Nangalia et al. 2013). Recientemente se ha intentado ya implementar tecnologías para el diagnóstico de estas mutaciones a base de análisis de fragmentos por electroforesis de capilar, secuenciación (Klampfl et al. 2013) e inmunohistoquímica (Vannucchi et al. 2014), pero solo algunas de estas metodologías son capaces de permitirnos observar la amplia gama de mutaciones que comprende la calreticulina.

## **Tratamiento**

Para el tratamiento de las NMP con fármacos dirigidos al sitio activo las cinasas Janus (terapia dirigida) se debe de evaluar la presencia o ausencia de mutaciones relacionadas a la diana del fármaco, que en este caso es el sitio activo de la proteína JAK2. Por lo cual es necesaria la detección mediante biología molecular de mutaciones relacionadas JAK2. Para las mutaciones en JAK2 es importante hacer un tamiz de las posibles causas usando como primera característica clasificatoria la mutación V617F. La terapia dirigida no debe descartar

el uso de fármacos dirigidos al sitio activo las cinasas Janus, en ausencia de la mutación V617F. Sería ideal que se considerando las mutaciones que hasta la fecha que se han descrito en JAK2, así como otras proteínas involucradas en la ruta de señalización.

Los médicos o hematólogos que tratan a pacientes con NMP están limitados en la opción de tratamientos farmacológicos. Por lo general los pacientes que se tratan con agentes citoreductivos (hidroxiurea, anagrelida o pipobroman) controlan efectivamente las cuentas celulares en sangre y disminuyen el riesgo de trombosis, sin embargo también se asocia el uso de estos fármacos con un aumento en la transformación a leucemia mieloide aguda (Santos & Verstovsek 2011; Hsiao et al. 2008). En el mercado son pocos los fármacos específicos aprobados para esta enfermedad.

En el caso de ser JAK2V617 positivo con diagnóstico inicial de PV o TE se describen tratamientos mucho más sensibles con hidroxiurea, que aquellos que no son JAK2V617 positivo y son tratados con anagrelide. Para los casos de NMP con tratamiento de hidroxiurea la trombosis arterial baja (Hsu 2007) debido al efecto citoreductor de la hidroxiurea.

Por otro lado existe la posibilidad de transformación a leucemia posterior a la pérdida de JAK2V617. Efecto que se observa en los síntomas clínicos después de 20 meses de tratamiento. En esta etapa del desarrollo neoplásico se nota una marcada anemia, que resulta de la transformación de fenotipo heterocigótico a tipo silvestre en la fase de leucemia. Este fenómeno implica que las NMP con JAK2V617 positivo pueden generar una agresiva leucemia mieloide aguda, fase en la cual no se detecta la mutación JAK2V617 (Hsiao et al. 2008).

Dentro de otras opciones de fármacos específicos existen inhibidores de las JAK como Ruxotinib, el cual se une al sitio catalítico más eficientemente que el ATP, impidiendo así la proliferación de las clonas mutantes (Malhotra 2012); el beneficio de la terapia dirigida es la reducción en el tamaño del bazo hasta un 50% así como la disminución de los síntomas (Passamonti et al. 2011). Otros de los fármacos disponibles con el mismo efecto o con efectos sobre 2 o más cinasas es el Lestaurtinib, INCB018424, SB1518 y muchos otros que aún están en fase de pruebas clínicas (Santos & Verstovsek 2011; Passamonti et al. 2011; Kiladjian 2012) (Tabla.4). Sin embargo hay evidencia que sugiere que las células troncales hematopoyéticas, mismas que se encuentran en estado de quiescencia, pueden permanecer aun en presencia de la terapia dirigida. Por esta razón es que se debe de monitorear la

presencia y la expresión de la mutación en sangre periférica durante el tratamiento (Santos & Verstovsek 2011).

<b>Activo</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencias</b>
CEP-701	Inhibidor de JAK2 y FLT3	(Santos & Verstovsek 2011; Passamonti et al. 2011)
INCB018424	Inhibidor de JAK1 y JAK2	(Santos & Verstovsek 2011; Passamonti et al. 2011)
SB1518	Inhibidor de JAK2 y FLT3	(Santos & Verstovsek 2011; Passamonti et al. 2011)
TG101348	Inhibidor altamente afín a JAK1 y poco afín a JAK2	(Santos & Verstovsek 2011; Passamonti et al. 2011)
XL019	Inhibidor de JAK2	(Santos & Verstovsek 2011; Passamonti et al. 2011)
CYT387	Inhibidor de JAK1 y JAK2	(Passamonti et al. 2011)
AZD1480	Inhibidor de JAK1 y JAK2	(Passamonti et al. 2011)
LY2784544	Inhibidor de JAK2	(Passamonti et al. 2011)

Tabla 4. Principales fármacos para el tratamiento de NMP's JAK2V617F positivas.

## **Antecedentes**

### **Inmunología**

Las citocinas como la familia de interferón, eritropoyetina, trombopoyetina, hormona del crecimiento y prolactina son citocinas involucradas en la respuesta celular a crecimiento, diferenciación, metabolismo, hematopoyesis, defensa del hospedero e inmunorregulación. Sus receptores tienen como fundamental mecanismo de transducción de señales la ruta JAK-STAT en particular la cascada de señalización que se lleva a cabo por JAK1 y JAK2 con funciones tan amplias que van desde la defensa de hospedero y hematopoyesis hasta el crecimiento y desarrollo neural (O'Shea et al. 2013).

Un ejemplo describe severas deficiencias al detener la transcripción de JAK2 en ratones knockout encontrando fallo sistémico en la producción de eritrocitos que lleva a la muerte del embrión. Evitar la transcripción de STAT5a detiene el desarrollo de glándulas mamarias

con daño en la señalización de prolactina. En el caso de STAT5b se producen defectos en la ruta de señalización de la hormona de crecimiento y defectos en la proliferación de células NK (Shuai & Liu 2003; Leonard & O'Shea 1998).

Poco se sabe respecto a la relación del gen JAK2 con la inmunidad innata y adaptativa, siendo que se han logrado hacer inferencias a través de modelos murinos e interpretación de la caracterización morfológica o metabólica de los mismo modelos, mientras que miles de reportes se enfocan a describir mutaciones en busca de la activación constitutiva derivada de una mutación (Ghoreschi et al. 2009). Es difícil encontrar cuales son las diferencias inmunológicas en las NMP, las diferencias en expresión de citocinas y la caracterización de respuestas inflamatorias en estas enfermedades (Santos & Verstovsek 2011).

La activación constante de la ruta JAK/STAT en varios tumores se debe a la activación de varias citocinas y factores de crecimiento tanto autócrinos como parácrinos. Dentro de estas citocinas encontramos, en varios tumores, altos niveles de IL-6 que se correlacionan con el fenotipo maligno y de mal pronóstico para el individuo, citocina que es regulada en su mayoría por los mediadores JAK2. Esta cinasa es capaz de traslocarse a núcleo independientemente de las proteínas STAT, generando modificaciones epigenéticas como fosforilaciones a las histonas que derivan en la expresión de varios genes, efecto que supone grandes ventajas para el desarrollo de múltiples tumores. Inmunológicamente la activación de JAK2 puede interferir con la activación de la inmunovigilancia y activación de células dendríticas, en conjunto con la activación de proteínas STAT se promueve la proliferación y reclutamiento de células T regulatorias y células supresoras derivadas mieloides que suprimen la respuesta antitumoral. Por esta razón es que el papel de las JAK es crucial en las interacciones básicas inmunológicas y tumorales (Seavey & Dobrzanski 2012) y es de importancia su interacción con el desarrollo de las NMP.

Por otro parte los perfiles de expresión de citocinas a partir de RNAm asociadas a respuestas inflamatorias no se han descrito para estas neoplasias, se han llevado a cabo estudios relacionados a citocinas en plasma de ratón y humano, mismos que describen perfiles aberrantes de citocinas a nivel de proteína, particularmente niveles reducidos de IL-1 $\beta$  e IL-33, que podrían estar relacionados con una baja expresión de citocinas para inflamación tipo Th2, y diferencias en la expresión de IL-4, IL-8, TNF- $\alpha$ , CCL3 e IL-10 entre los grupos de PV y TE (Pourcelot et al. 2014; Belver & Ferrando 2015; Musolino et al. 2013). En este

estudio se describen los comportamientos de las citocinas en relación a respuestas inflamatorias de inmunidad adaptativa y poco se sabe de la inmunidad innata. Con estos patrones de expresión de citocinas a nivel de proteínas no se puede obtener una herramienta que apoye el diagnóstico en asociación a marcadores inmunológicos, lo cual podría complementar el perfil de características necesarias para hacer más precisa la clasificación de estas neoplasias.

Por otro lado poco interés se ha relacionado a la participación de marcadores inmunológicos de inflamación como IL-23, IL-12 e IL-17 en relación a diferentes mecanismo de desarrollo neoplásico para las NMP. Siendo estos marcadores importantes para hacer una inferencia con respecto a la relación de estas enfermedades (Sutton et al. 2009; Langowski et al. 2006; Langrish et al. 2004; Lin & Karin 2007).

### **Hipótesis**

- Si Policitemia Vera, Trombocitemia Esencial y Mielofibrosis Primaria pueden ser producidas por la misma mutación, en este caso JAK2V617F, entonces Policitemia Vera, Trombocitemia Esencial y Mielofibrosis Primaria tienen procesos inflamatorios similares.

### **Objetivos**

- Validar prueba de detección para JAK2V617F.
- Evaluar las frecuencias de la mutación JAK2V617F en NMP para la población que corresponde a los departamentos de hematología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y el Instituto Nacional de Cancerología.
- Evaluar la expresión de citocinas a nivel de RNAm relacionadas al efecto inflamatorio.

## **Materiales y métodos**

### **Criterios de selección**

Se realizó la colecta de sangre periférica y aspirado de médula ósea con un muestreo por conveniencia de pacientes que han sido diagnosticados con NMP por histopatología o biometría hemática de acuerdo a los criterios de la OMS del 2008, o con evidencias de positividad de JAK2V617F contemplando edades entre 30 y 80 años. Casos negativos para la mutación JAK2V617F, tendrán que ser positivos para al menos un carácter mayor de diagnóstico correspondiente a las NMP. Autorización y consentimiento informado serán otorgados de acuerdo a la normatividad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Las muestras control se tomarán candidatos a donadores del banco de sangre. Se excluirán aquellos individuos con evidencia de infecciones, enfermedades autoinmunes, deficiencia de hierro y familiares de casos con enfermedad hematológica. Para el control se tomaran muestras de pacientes sanos, que cumplen los criterios del banco de sangre como individuos sanos, los resultados de biometría hemática se revisan para descartar infecciones.

### **Tratamiento de las muestras**

Se obtienen muestras de sangre periférica y de aspirado de médula ósea contenidas en tubos Vacutainer con K2EDTA (Becton, Dickinson and company U.S.A), para sangre periférica se consideran 3ml y para el aspirado de médula ósea se consideran 1 a 2 ml. La muestra será tratada en un rango de 6 horas desde la toma sin pasar este periodo de tiempo debido a la posible degradación del material genético. Posteriormente se le adiciona el mismo volumen de medio de cultivo celular RPMI 1640 L-glutamine (Gibco, U.S.A). Para sangre periférica se consideran 3ml de medio de cultivo y para aspirado de médula ósea se considera 1 o 2 ml de medio de cultivo.

### **Separación de células**

Posterior al tratamiento de las muestras se hace la separación de células mononucleares. Se adicionan 3 ml de Lymphoprep (Axis-Shield, Noruega) a un tubo de centrífuga de 15ml

(Corning, U.S.A) y se resbala por las paredes la muestra anteriormente tratada de sangre periférica/aspurado de médula ósea, se centrifuga 30 minutos a 2000 rpm. Se recupera la fracción que contiene las células mononucleares con una micropipeta y se divide en 4 tubos de 1.5 ml siendo aproximadamente 350 µl de muestra. A cada tubo se le adiciona el doble del volumen de medio de cultivo RPMI 1640 siendo aproximadamente 750 µl de medio de cultivo. Se homogeniza a mano y se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se adicionan 750 µl de medio de cultivo RPMI 1640, se homogeniza a mano y se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante. Se le adiciona 450 µl de medio de cultivo RPMI 1640 y 150 µl de Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, U.S.A) al pellet, se homogeniza a mano. 2 muestras se conservan en criovial a -70 °C y las otras 2 muestras serán procesadas para la extracción de DNA y RNA.

### **Extracción de ADN**

La extracción es llevada a cabo con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, U.S.A). Se adicionó 300 µl de RPMI y 300 µl de solución de lisis de núcleos y se incubó por 1hr a 37 °C, una vez finalizada la incubación se adiciona 3 µl de RNAsa (Invitrogen, U.S.A) se homogenizó por inversión e incubó 37 °C durante 15 minutos, al terminar se colocó en hielo. Posteriormente se adicionó 150 µl de solución precipitante y se mezcló vigorosamente en vortex durante 15 segundos y se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto durante 3 minutos a temperatura ambiente. Para concluir se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo con 300 µl de isopropanol y homogeneizar gentilmente. Posteriormente se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 500 µl de etanol al 70% por duplicado, se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto y se dejó secar a 37 °C de 10 a 15 minutos. Se adicionó al pellet 100 µl de solución hidratante y se incubó 1 hora a 56 °C para cuantificar.

### **Extracción de RNA**

Se realizó limpieza con RNase AWAY™ (AMBION, USA) en todo material ocupado para evitar contaminación. La extracción es llevada a cabo con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, U.S.A). Se adicionó 175 µl de RLA (β mercaptoetanol) y 350

µl de RDA se homogenizó y se incubó por 3 minutos a 70 °C. Se centrifugó 10 min a 14000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionó 200 µl de etanol al 95%, se homogenizó y se transfirió a columna para centrifugarse 1 minuto a 14000 rpm. Se adicionó 600 µl de RWA y se centrifugó a 14000 rpm 1 minuto. Se adicionó 40 µl de yellow, 5 µl de cloruro de magnesio y 5 µl de DNAsa I, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 200 µl de solución de Stop y se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto. A continuación se adicionó 600 µl de RWA y se centrifugó a 14000 rpm por 1 minutos. Después se adicionó 250 µl de RWA y se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos. Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se adicionó 100 µl de agua, se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto y cuantificó.

Posteriormente la columna se lavó 2 veces con buffer de lavado (500 µl), se centrifugó y se le adicionó 50 µl de buffer de elución e incubó por 2 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto, para recuperar el RNA, el cual se guardó a -80°C hasta su uso.

### **Obtención de ADNc**

Una vez obtenido el ARN total es necesario sintetizar la cadena complementaria o ADNc; Utilizando 2 µl de buffer RT 10X, 1 µl de oligo dT (PromegaCorporation, U.S.A), 2 µl de dNTP's 10mM, 1 µl de RNAsaInhibitor (PromegaCorporation, U.S.A), 1 µl de enzima Omniscript (Omniscript, Qiagen, CA, USA), 6 µl de agua libre de RNAsa y 12 µl de RNA 15 ng/µl. La reacción se incubó a 37 °C durante 60 minutos y posteriormente a 93 °C durante 15 minutos.

### **Oligonucleótidos**

Se construyeron oligonucleotidos para genes constitutivos con la finalidad de verificar la calidad de la extracción antes obtenida considerando fragmentos de diferentes tamaños (Apéndice A). Y cuatro oligonucleótidos, uno de ellos dirigido al genotipo Silvestre de JAK2 y otro dirigido a la mutación V617F de JAK2, tomados de Giuseppe Tagariello, *et al* (Tagariello et al. 2009).

### ***In silico***

Mediante software especializado se corroboraron las propiedades de los ensayos utilizados. Para verificar que a las temperaturas de trabajo no se generaran estructuras de horquilla (hairpin) y heterodimeros se utilizó el software en línea “OligoAnalyzer 3.1” (Integrated DNA technologies, Iowa USA). Para corroborar que los oligonucleótidos alinean correctamente con el gen de interés se utilizó el software en línea “Standard Nucleotide BLAST” (NCBI, Bethesda, USA). Para corroborar que se obtienen productos únicos y específicos se utilizó el software en línea “UCSC In-Silico PCR” (UCSC GenomeInformaticsGroup, California, USA). Para corroborar los sitios de restricción en nuestro fragmento de 453 pb se utilizó el software en línea “NEBcutter V2.0” (New englandbiolabs inc., Texas, USA). Para observar el comportamiento de la curva de disociación se utilizó el software en línea “uMELT 2.0.2” (Theuniversity of Utha, USA.).

### **PCR Alelo específico**

Para JAK2 se hizo una reacción que considera el genotipo silvestre (229pb) y el genotipo mutante (279pb), se utilizan 12.5 µl de mix Hot Star (QuiagenHotStarTaq, Quiagen, CA, USA), 5.5 µl de agua libre de RNAsa, 1 µl de Oligo sentido, 1 µl de Oligoantisentido y 60 µg/µl de muestra para obtener un volumen final de 25 µl. Obtenida esta mezcla se procede a la incubación a 95°C durante 15 minutos para desnaturalizar las dobles cadenas, se introduce una secuencia de pasos que van de 95°C 30 segundos, 60°C 30 segundos y 72°C 45 segundos durante 40 ciclos, este paso permite la desnaturalización, unión de los oligos y elongación del DNA en la secuencia que se está buscando, se deja a 72°C por 5 minutos para la elongación final y se detiene la reacción a 4°C. Se hace un gel de agarosa al 1.8% y se observa en transluminador.

### **PCR**

Para JAK2 se hicieron reacciones para cada genotipo por separado que consideran, el genotipo silvestre (229 pb) y el genotipo mutante (279 pb), se utilizó 12.5 µl de mix Hot Star (QuiagenHotStarTaq, Quiagen, CA, USA), 5.5 µl de agua libre de RNAsa, 1 µl de Oligo sentido, 1 µl de Oligoantisentido y 60 µg/µl de muestra para obtener un volumen final de 25 µl. Obtenida esta mezcla se procede a la incubación a 95°C durante 15 minutos para

desnaturalizar las dobles cadenas, se introduce una secuencia de pasos que van de 95°C 30 segundos, 54°C 30 segundos y 72°C 45 segundos durante 40 ciclos, este paso permite la desnaturalización, unión de los oligos y elongación del DNA en la secuencia que se está buscando, se deja a 72°C por 5 minutos para la elongación final y se detiene la reacción a 4°C. Se hace un gel de agarosa al 1.8% y se observa en transluminador. En esta fase se determina la presencia de un genotipo mutante si es que existe un amplificado para los oligonucleótidos que incorporan la mutación.

### **Digestión con Enzima de Restricción**

Al producto del PCR se le trató con la enzima de digestión BsaXI (*Bacillusstearothermophilus*) cepa 25B (New EnglanBiolabs, U.S.A). Se preparó una solución de trabajo del buffer CutSmart 10X (New EnglanBiolabs, U.S.A) diluyendo 50 µl de buffer CutSmart en 450µl de agua libre de RNAsas (Quiagen, U.S.A). Se adicionó a un tubo de PCR 1µl de enzima, 1µg de DNA de la muestra, 5µl de Buffer CutSmart 1X. Después se ajustó la reacción a 25 µl de volumen final, adicionando 2.5µl de buffer CutSmart 10X y 11.3µl de agua libre de RNAsas. Se incubó en termociclador (Applied Biosystems, U.S.A) a 37C° durante 1 hora.

### **Curva de disociación**

El primer paso es una reacción de PCR el cual se utilizan 12.5 µl de mix QuantiTect SYBR Green (Quiagen, CA, USA), 5.5 µl de agua libre de RNAsa, 1 µl de Oligo sentido, 1 µl de Oligoantisentido, y 60 µg/µl de muestra para obtener un volumen final de 25 µl. Obtenida esta mezcla se procedió a la incubación a 95°C durante 15 minutos para desnaturalizar las dobles cadenas, se introdujo una secuencia de pasos que van de 95°C 50 segundos, 54°C50 segundos y 72°C1 minuto 20 segundos durante 40 ciclos. Se llevó a cabo una curva de disociación donde al producto de PCR se llevó de 40<sup>0</sup> C a 90<sup>0</sup> C y se observaron diferentes picos de disociación correspondientes a la mutación JAKV617F y al genotipo silvestre. Con este método se puede observar si la mutación se encuentra presente como homocigoto o como heterocigoto.

### **Análisis de citocinas por PCR-tiempo real**

Una vez elaboradas las curvas (Apéndice), se prepara la reacción con 12.5 µl de Mix Hot StarSybr (Quiagen, Quantitect SYBR Green PCR), 10.5 µl de agua libre de RNAsa, 0.5 µl de Oligo sense, 0.5 µl de Oligo antisense, 1 µl de muestra. Obtenida esta mezcla se procede a la incubación a 95°C durante 15 minutos para desnaturalizar las dobles cadenas, se introduce una secuencia de pasos que van de 95°C 1 minuto segundos, 54 a 60°C 1 minuto y 72°C 1:30 segundos durante 40 ciclos, este paso permite la desnaturalización, unión de los oligos y elongación del DNAc. El PCR en tiempo real se hizo en un termociclador 7500 real time PCR system (AppliedBiosystem, USA). La curva elaborada se utilizó de referencia siendo que esta curva tiene determinados números de copias por microlitro, también es importante mencionar que el análisis por Sybr Green en tiempo real necesita de una curva de Melting, en esta es posible verificar que el producto que se amplificó sea siempre el mismo y no se amplifiquen productos inespecíficos.

### **Análisis estadístico**

Las medias, error estándar y porcentajes se obtuvieron a través de Excel 2010 (Microsoft, USA). Las diferencias entre los grupos y las citosinas fueron calculadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney y Chi cuadrada para estadística no paramétrica con muestras no pareadas ( $P < 0.05$ ). Para coeficientes de asociación se utilizó  $\kappa$  en la comparación entre técnicas ( $\kappa > 0.8$ ) y coeficiente de contingencia para la asociación del genotipo mutante contra el silvestre ( $C > 0.8$ ) (SPSS 19, New York)

### **Resultados**

#### **Características clínicas de los pacientes**

Se obtuvieron un total de 21 casos desde el 2012 hasta el 2015 del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran” y el Instituto Nacional de Cancerología. 6 casos corresponden a PV (28%), 12 casos corresponden a TE (58%) y 3 casos corresponden a MFP (14%) (Fig. 5); al mismo tiempo se obtuvieron un total de 9 muestras control de sangre periférica y sangre periférica movilizada.

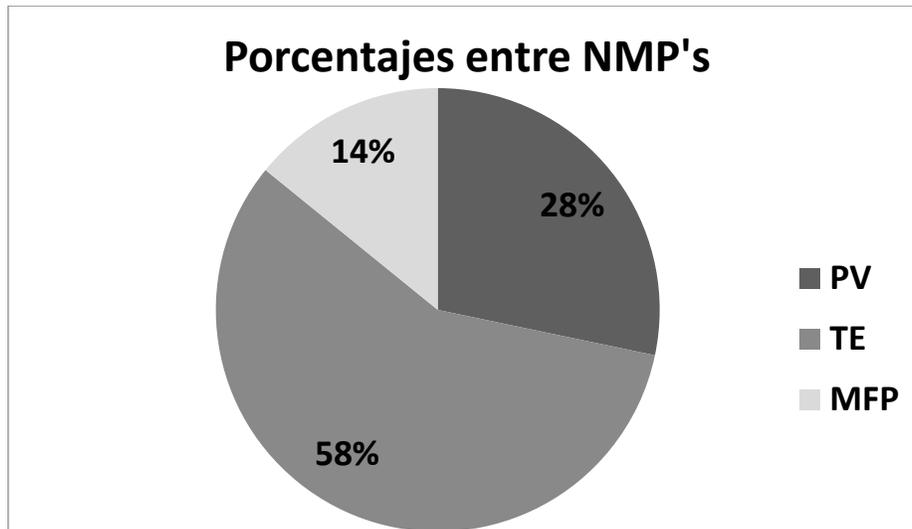


Fig.5 Porcentajes de NMP cromosoma filadelfia negativo (Ph-). PV, policitemia vera. TE, trombocitemia esencial. MFP, Mielofibrosis primaria

La biometría hemática y biometría hemática extendida (apéndice B) se obtuvo al momento de la toma de muestra, así como los datos poblacionales (apéndice C). En el caso de NMP se obtuvo aspirado de médula ósea, con el cual no se lleva a cabo biometría, y sangre periférica al mismo tiempo de la toma de muestra. De la misma forma de las muestras control se obtuvo sangre periférica y sangre periférica movilizada, que son negativos para la mutación JAK2V617F (Apéndice D).

No se encontraron diferencias significativas en la edad ( $P > 0.05$ ,  $\bar{X} = 58.7 \pm 10.2$ ) ni en la proporción por sexo en los grupos de estudio ( $P > 0.05$ ). Se encontraron diferencias significativas en los valores de hemoglobina ( $P = 0.034$ ) y eritrocitos ( $P = 0.001$ ) para los casos de PV. En el caso de TE se encuentran niveles altos de plaquetas ( $P = 0.0001$ ) (Tabla. 5). No se encontraron diferencias significativas en los casos de MFP para los valores de biometría hemática y biometría hemática especial.

	Edad (años)	Tratamiento	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	Eritrocitos (10 <sup>6</sup> /μl)	Síntomas y patología
<b>PV</b>	<b>61</b> (± 9.7)	<b>Hidroxiure</b> <b>a</b>	<b>19.6</b> (±0.83)	<b>341.3</b> (±105.8)	<b>5.78</b> (±1.16)	<b>Presentes</b>
<b>TE</b>	<b>56</b> (±10.5)	<b>Hidroxiure</b> <b>a</b>	<b>15</b> (±2.14)	<b>792.5</b> (±290.6)	<b>4.6</b> (±0.9)	<b>Presentes</b>
<b>MF</b>	<b>63</b> (± 11)	<b>Hidroxiure</b> <b>a</b>	<b>15.2</b> (±3.6)	<b>409.6</b> (±372)	<b>5.2</b> (±1.5)	<b>Presentes</b>

Tabla. 5 Valores promedio de biometría hemática para cada grupo de NMP. Se muestran Valores promedio y en la parte inferior se muestra la desviación estándar PV, policitemia vera. TE, trombocitemia esencial. MFP, Mielofibrosis primaria.

### *In silico*

Se corrobora por medio de las herramientas informáticas que a las temperaturas de trabajo no generen estructuras de horquilla (hairpin) y heterodimeros, los oligonucleótidos alinean correctamente con el gen de interés en un 100% de identidad. Se obtienen productos únicos y específicos por PCR *in silico*.

Se determina un solo sitio de restricción para la enzima de restricción BSAXI en el fragmento de 508 y el comportamiento de la curva de disociación demuestra la presencia de amplificación para el genotipo silvestre a 85 °C y para el genotipo mutante a 82 °C.

### **PCR alelo específico**

Esta técnica nos permite mantener un control que es la amplificación del gen JAK2, en un fragmento de 508 pb, considerando ~200 pb de bases río arriba y ~200pb de bases río abajo del codón 617 de JAK2. En la misma reacción obtenemos un fragmento de 279 pb que es específico para la mutación JAK2V617F y otro fragmento de 229 pb que es específico para el genotipo silvestre de JAK2.

A continuación se muestra un control que se ha corroborado, a través de otro laboratorio, que tiene la mutación JAK2V617F para correlacionarlo con nuestra metodología. Se observa que

en ambos casos cuenta con la mutación JAK2V617F (Fig. 6B). Por lo cual se procede a trabajar con las muestras colectadas.

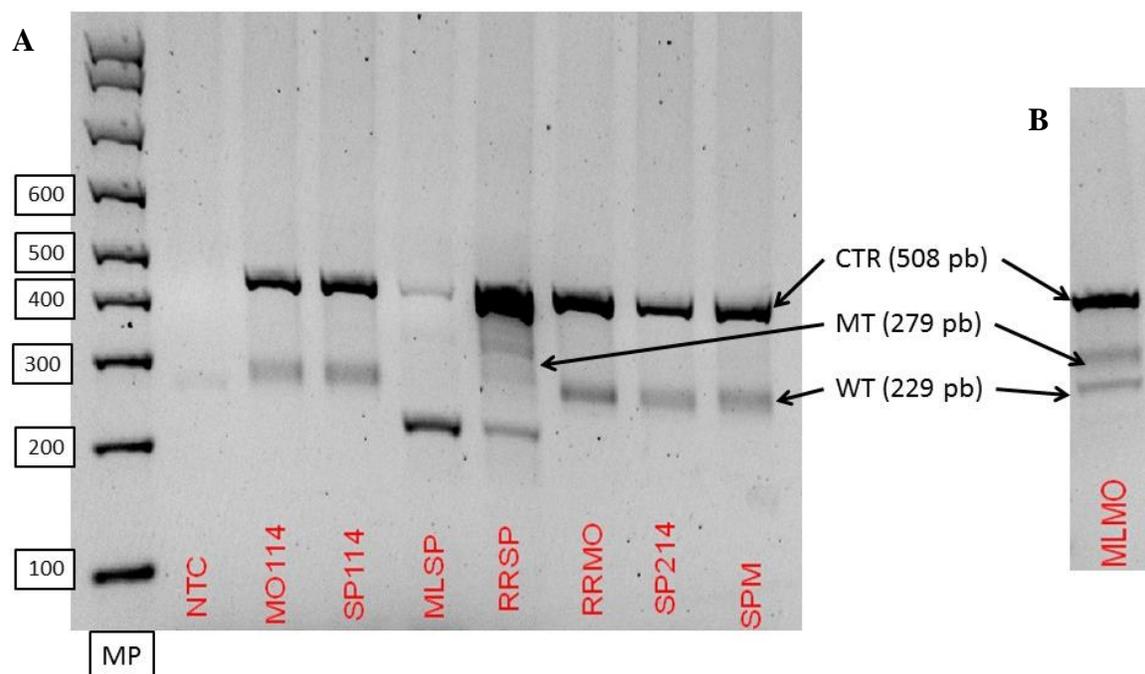


Fig. 6 Amplificación por PCR alelo específico del gen JAK2 y sus genotipos silvestre y mutante. NTC- Control negativo. MO114-aspirado de médula ósea correspondiente a una PV. SP114-sangre periférica correspondiente a una PV. MLSP-sangre periférica correspondiente a una MFP (JAK2V617F+). RRSF-sangre periférica correspondiente a una TE. RRMO-aspirado de médula ósea correspondiente a una TE. SP214-sangre periférica correspondiente a un control negativo. SPM, sangre periférica movilizada correspondiente a un control negativo. MLMO- aspirado de médula ósea correspondiente a una MFP (JAK2V617F+). CTR- amplificación del gen JAK2 en un fragmento de 508 pb. MT-fragmento mutante de 279 pb. WT-fragmento silvestre de 229 pb. (MP, Marcador de peso molecular. CTR, Fragmento de 508 pb correspondientes al gen JAK2. WT, genotipo silvestre. MT, mutante. PV, policitemia vera. TE, trombocitemia esencial. MFP, Mielofibrosis primaria).

Al llevar a cabo la metodología con control negativo y casos de NMP se observa que la concentración de DNA (80 ng/μl) no es suficiente para amplificar el gen mutante. De la misma manera la presencia de un alelo mutante compromete el corrimiento electroforético correcto de las muestras problemas por lo cual es imposible observar de manera concreta la presencia o ausencia de la mutación. De la misma forma esta metodología presenta otro contratiempo el cual comprende la presencia de múltiples productos de amplificación que se

consideran productos inespecíficos o sugerentes de la presencia de una deleción en el marco de lectura del gen JAK2 (Fig. 6A). Debido a las dificultades observadas no se elaboraron análisis estadísticos, ya que las muestras y los casos obtenidos son escasos y se obtiene poco material biológico.

## PCR

Por esta metodología se tienen los fragmentos de 279 pb (específico para la mutación JAK2V617F) y para el fragmento de 229 pb (específico para el genotipo silvestre) en reacciones independientes. Eliminando la competencia del control interno y propiciando la reacción hacia el genotipo de interés.

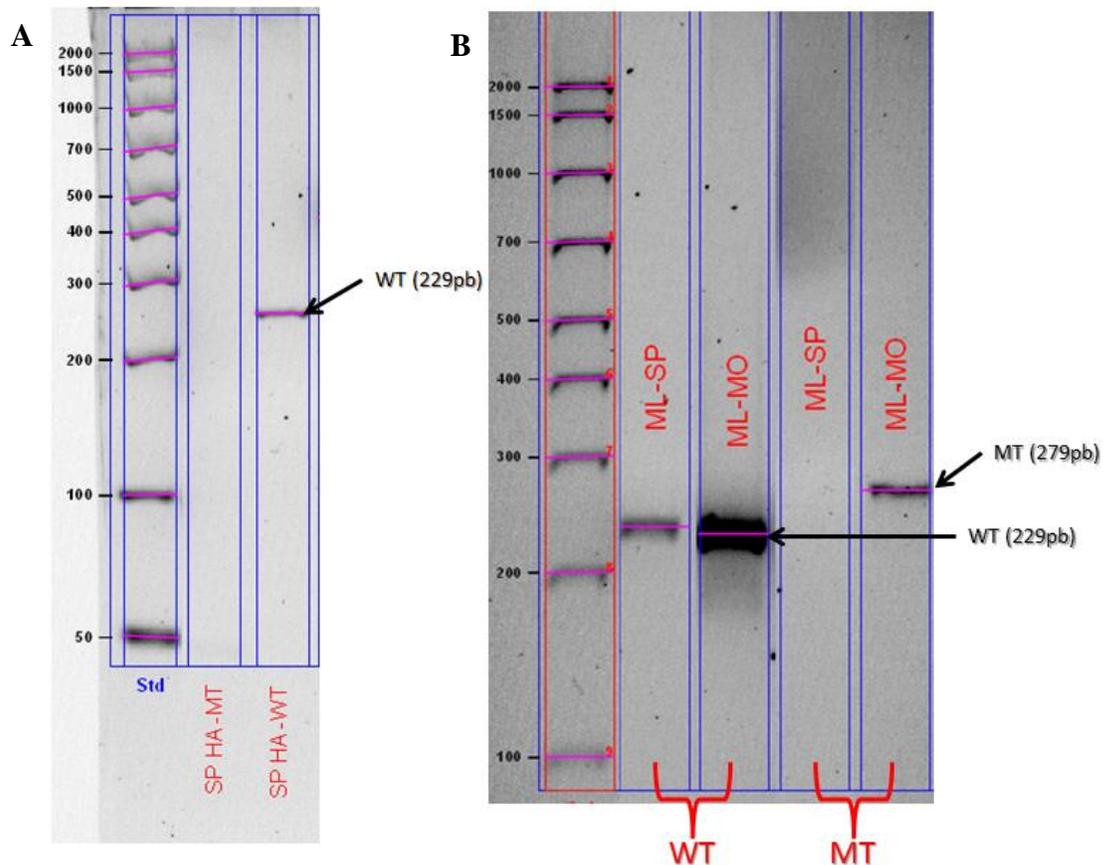


Fig. 7 Amplificación por PCR del gen JAK2 y sus genotipos silvestre y mutante. A, sangre periférica de muestra control. SP HA-MT, reacción con oligonucleótidos específicos para la mutación JAK2V617F en muestra control SP HA-WT, reacción con oligonucleótidos específicos para el genotipo silvestre en muestra control. B. Muestra de PV JAK2V617F+. MLSP- sangre periférica correspondiente a una MFP

(JAK2V617F+). MLMO- aspirado de médula ósea correspondiente a una MFP (JAK2V617F+). (WT, genotipo silvestre. MT, mutante. PV, policitemia vera. WT, genotipo silvestre. MT, genotipo mutante).

Utilizando 50 ng/μl de DNA genómico se puede observar de manera clara la presencia o ausencia de la mutación JAK2V617F con lo cual se obtiene un método confiable y específico para la determinar la ausencia o presencia de la mutación. Las condiciones utilizadas para ambas reacciones son las mismas. En la muestra control se observa la amplificación del genotipo silvestre, amplificación que corresponde a un fragmento de 229 pb, y no se observa amplificación del genotipo mutante (Fig. 7A). Para el caso de NMP se observa amplificación del genotipo silvestre en sangre periférica y médula ósea. Además se observa el genotipo mutante en médula ósea pero no en sangre periférica, amplificación que corresponde a un fragmento de 279 pb (Fig. 7B).

Para PV y TE 50% de los casos son positivos para la mutación JAK2V617F, para MFP 100% de los casos son positivos para la mutación JAK2V617F (Fig. 8) los cuales se encuentran desglosados en el apéndice D. No se encontraron resultados no interpretables.

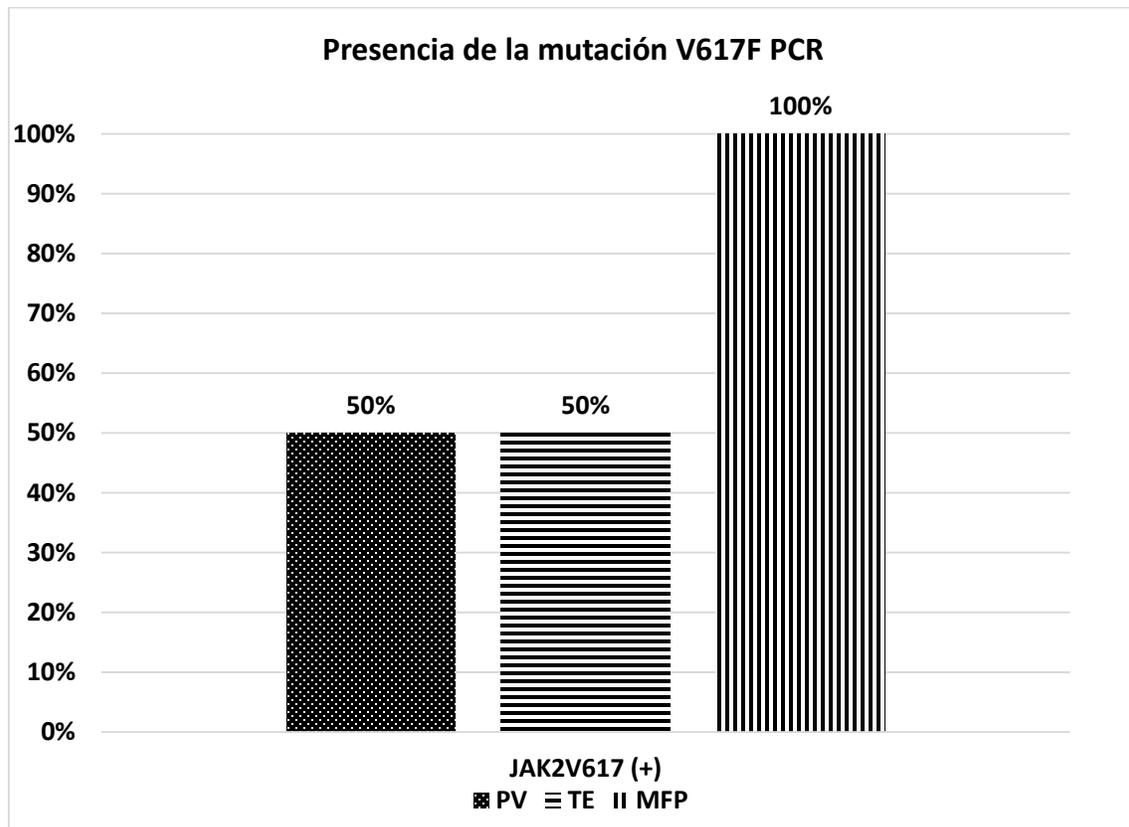


Fig. 8 Porcentajes de positividad a la mutación JAK2V617F por PCR punto final

## Digestión con Enzima de Restricción

Con la finalidad de corroborar que existe la mutación JAK2V617F en los casos de NMP se utiliza la enzima de restricción BSAXI que reconoce el sitio de restricción TGTCTGTGGAG. Este sitio de restricción se ve afectado por la presencia de la mutación JAK2V617F; de tal forma que al estar presente la mutación JAK2V617F se espera que la enzima de restricción no reconozca el sitio de restricción y por lo tanto en gel de agarosa podríamos observar residuos del fragmento de 508 pb, un fragmento de 300 pb y un último fragmento de 208 pb (Fig.9). El fragmento de 508 pb que corresponde al fragmento mutante sin sitio de reconocimiento para la enzima de restricción, y dos fragmentos de 320 pb y 208 pb, que corresponde al genotipo silvestre el cual tiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción.



Fig. 9 Diagrama de sitios de reconocimiento de la enzima de restricción BSAXI (parte superior) y productos del corte de la misma en el gen de JAK2; genotipos silvestre (parte media) con productos de 320 y 208 pb y mutante (parte inferior) con sitio de reconocimiento afectado por la mutación V617F.

Se obtuvieron en el 100% de las muestras, resultados no interpretables, todas las muestras presentan al menos dos sitios de corte para la enzima de restricción BSAXI. Encontramos que la enzima reconoce otro sitio de corte que se encuentra cerca de los 320 pb en todas las muestras, mismo que no se describe en la literatura. Y en cierto grado todos los casos presentaron fragmentos de 453 pb, que sugieren la presencia de la mutación JAK2V617F de manera constitutiva en todas las muestras de este estudio, incluyendo las muestras control

(Fig. 10). Estos resultados pueden implicar que la secuencia del gen JAK2 tiene otro sitio de reconocimiento para la enzima BSAXI ubicado en uno de los extremos del amplificado que hemos obtenido, al mismo tiempo se sugiere que existe de forma constante una secuencia de JAK2 que tiene la mutación V617F y que de alguna manera se suprime en las muestras control, de tal forma que solo es posible de observar a través de la extracción de ácidos nucleicos y que *in situ* la expresión es suprimida mediante un mecanismo desconocido.

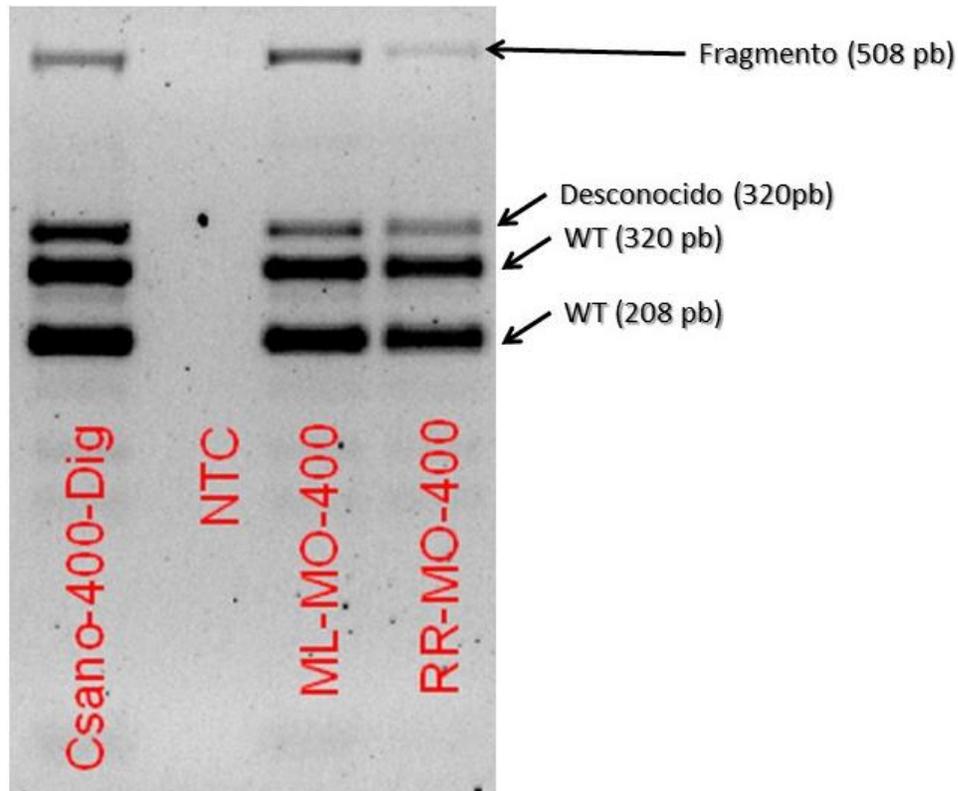


Fig. 10 Corte con enzima de restricción del fragmento de 508 pb correspondiente al gen JAK2. Csano-400-Dig, corresponde a un caso control sin mutación JAK2V617F. NTC, Control negativo de reacción. ML-MO-400 caso control positivo para la mutación. JAK2V617F, confirmado por laboratorio externo. RR-MO-400, aspirado de médula ósea para un caso de NMP. WT, fragmento silvestre con sitio de restricción que genera dos fragmentos de 263 y 160 pb.

### Curva de disociación

Para corroborar lo observado en PCR punto final llevamos cabo la curva de disociación en tiempo real. Esta técnica nos permite observar a través de una constante de temperatura diferencias entre el genotipo mutante y el genotipo silvestre. De esta manera se obtienen dos

curvas de alineamiento con diferentes temperaturas, una correspondiente a la mutación JAK2V17F y otra para el genotipo silvestre (Fig. 11).

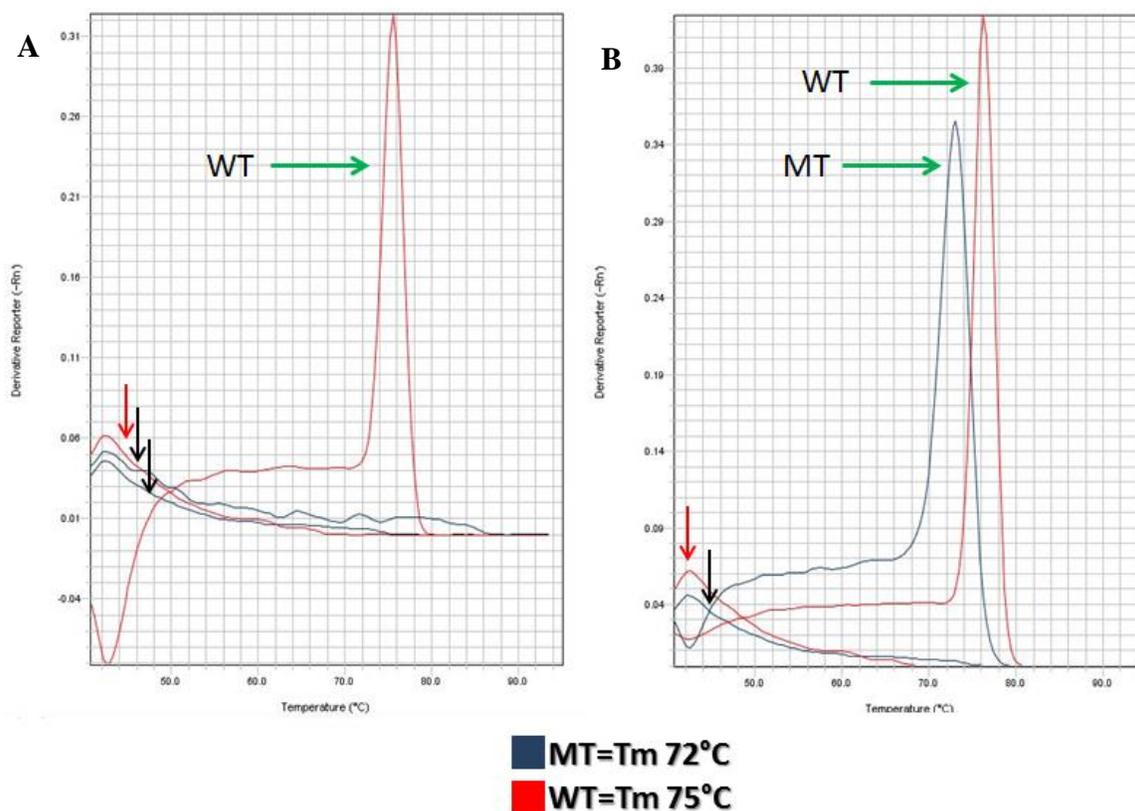


Fig. 11 Diagrama de fluorescencia para la alineación de productos en tiempo real del gen JAK2. A, sangre periférica movilizada de muestra control; en rojo se muestra la curva de amplificación correspondiente a el genotipo silvestre, que muestra temperatura de alineamiento de 75<sup>0</sup>C. En flecha color rojo se muestra el control negativo de reacción, en flechas color negro se muestran el control negativo de reacción y la muestra control negativa para la mutación JAK2V617. B, médula ósea de muestra control positivo para la mutación JAK2V617F; en rojo se muestra la curva de amplificación correspondiente a el genotipo silvestre, que muestra temperatura de alineamiento de 75<sup>0</sup>C y en negro se muestra la curva de amplificación correspondiente a el genotipo mutante, que muestra temperatura de alineamiento de 72<sup>0</sup>C en flecha color rojo se muestra el control negativo de reacción, en flechas color negro se muestran el control negativo de reacción para la mutación JAK2V617.

PV se representa con 50% de las muestras positivas para la mutación JAK2V617F, TE se representa con 25% de los casos positivos para la mutación JAK2V617F, para MFP 67% de los casos son positivos para la mutación JAK2V617F (Fig. 12) los cuales se encuentran desglosados en el apéndice D. No se encontraron resultados no interpretables.

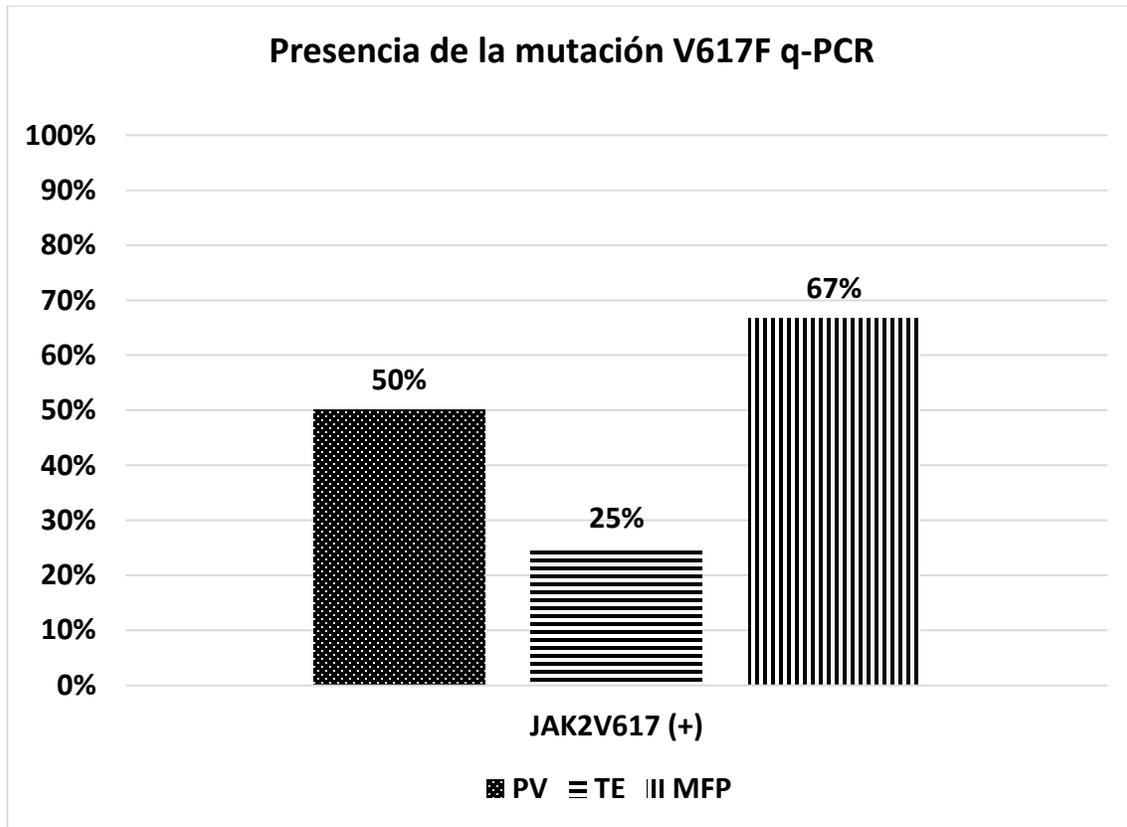


Fig. 12 Porcentajes de positividad a la mutación JAK2V617F por PCR tiempo real

### Q-PCR vs PCR

Se lleva a cabo un estudio comparativo entre técnicas, con lo cual podemos observar si existe correlación entre los resultados obtenidos con diferentes técnicas, determinando cuál de estas técnicas es eficiente en la clasificación y detección de la mutación JAK2V617F, de esta manera las técnicas tienen correlación moderada ( $\kappa = 0.562$ ). Con la metodología de PCR punto final se observan 3 inconsistencias, mismos que se observan como una banda de 279 pb en gel de agarosa al 1.8%. Estos falsos positivos fueron completamente negativos al observar las curvas de alineamiento en PCR tiempo real. Las técnicas plasmadas en este trabajo resultan en la exitosa aplicación de la disociación por PCR tiempo real para la detección de la mutación JAK2V617F, técnica que es capaz de diferenciar con la menor cantidad de resultados no interpretables si existe la presencia de la mutación.

## Análisis para la expresión de RNAm de citocinas

La expresión de citocinas para las NMP en sangre periférica no muestra diferencias para TNF- $\alpha$  (Fig. 13). Sin embargo la expresión para IL-1 $\beta$  muestra diferencias entre las diversas NMP, (P = 0.0001) con incremento significativo en la expresión de RNAm en MFP, TE y MFP (Fig.14).

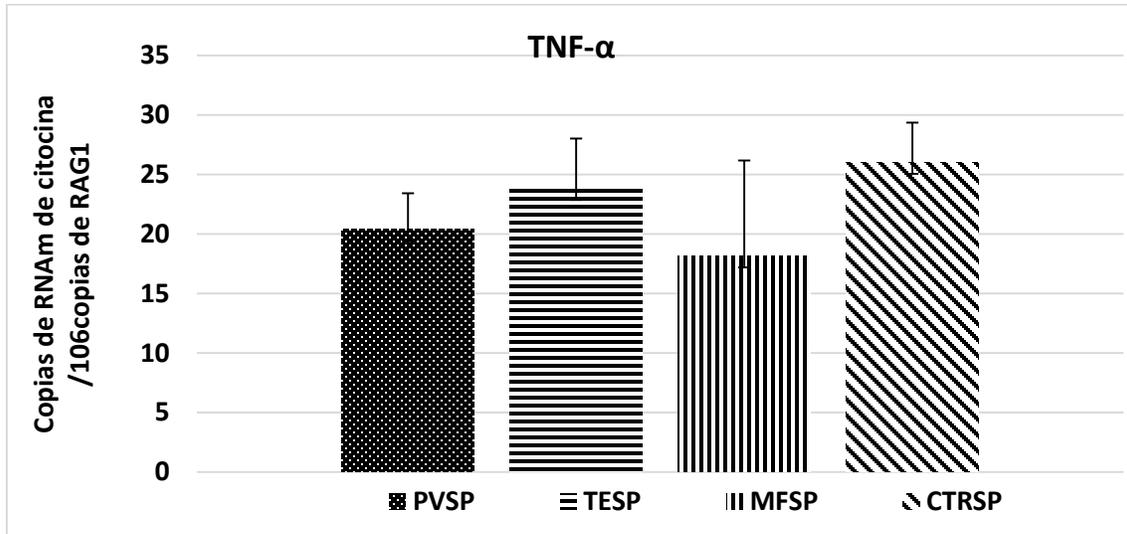


Fig. 13 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de TNF- $\alpha$  para las NMP en sangre periférica. PVSP; Policitemia vera, TESP, trombocitemia escencial, MFSP, mielofibrosis primaria. CTRSP, muestras control.

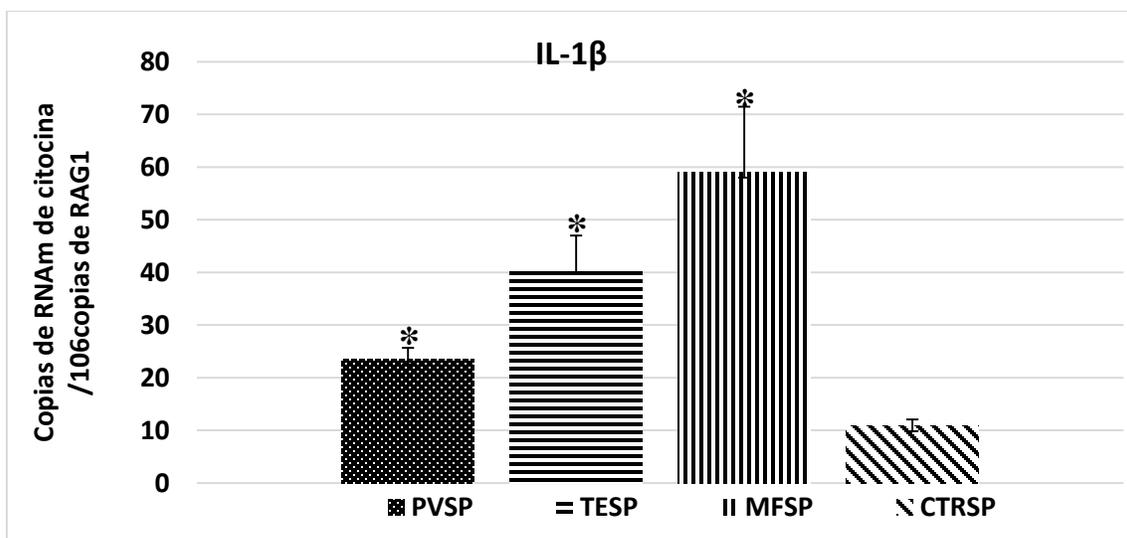


Fig. 14 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-1 $\beta$  para las NMP en sangre periférica. PVSP; Policitemia vera, TESP, trombocitemia escencial, MFSP, mielofibrosis primaria. CTRSP, muestras control.

En médula ósea se observan diferencias para TNF- $\alpha$  (P = 0.025 y P = 0.035) con marcada reducción de expresión en PV y TE (Fig. 15). Sin embargo la expresión para IL-1 $\beta$  muestra solamente diferencia significativa, que se observa como baja expresión, para PV y TE (P = 0.004) (Fig.16).

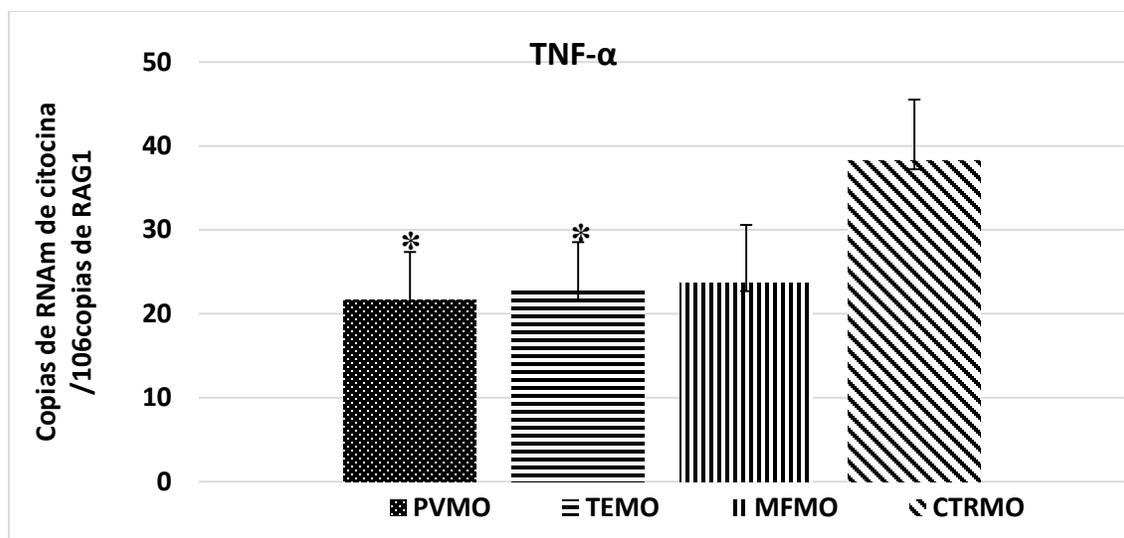


Fig. 15 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de TNF- $\alpha$  para las NMP en médula ósea. PVMO; Policitemia vera, TEMO, trombocitemia escencial, MFMO, mielofibrosis primaria. CTRMO, muestras control.

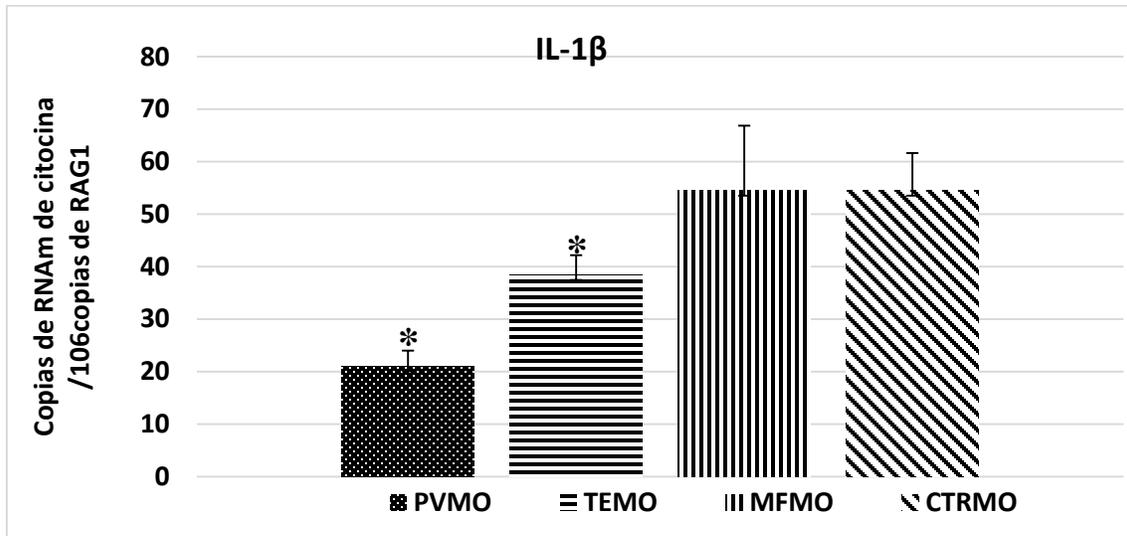


Fig. 16 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-1 $\beta$  para las NMP en médula ósea. PVMO; Policitemia vera, TEMO, trombocitemia escencial, MFMO, mielofibrosis primaria. CTRMO, muestras control.

La expresión de IL-4 en sangre periférica no muestra diferencias (Fig. 17). Sin embargo la expresión de IL-6 muestra aumento solamente para MFP (P = 0.03) (Fig.18).

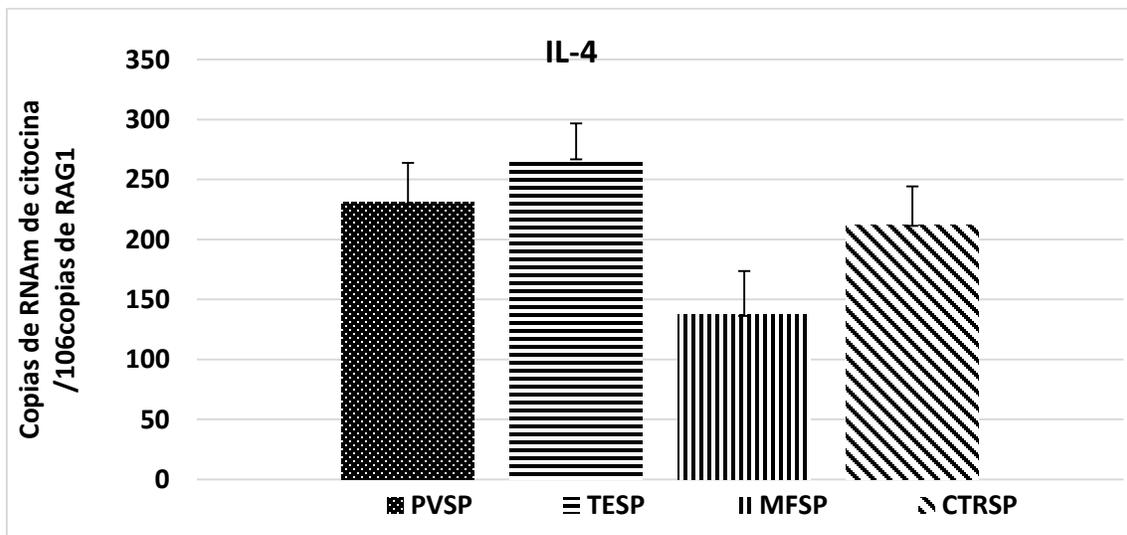


Fig. 17 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-4 para las NMP en sangre periférica. PVSP; Policitemia vera, TESP, trombocitemia escencial, MFSP, mielofibrosis primaria. CTRSP, muestras control.

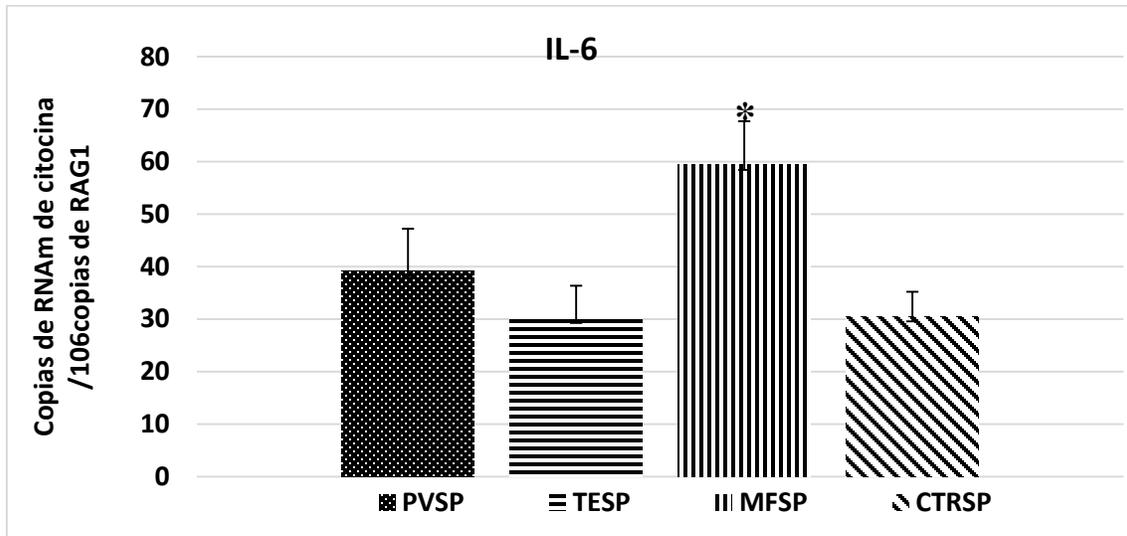


Fig. 18 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-6 para las NMP en sangre periférica. PVSP; Policitemia vera, TESP, trombocitemia escencial, MFSP, mielofibrosis primaria. CTRSP, muestras control.

En el caso de médula ósea no se encontraron diferencias para IL-6 e IL-4 ( $P > 0.05$ ) (Fig. 19 y 20).

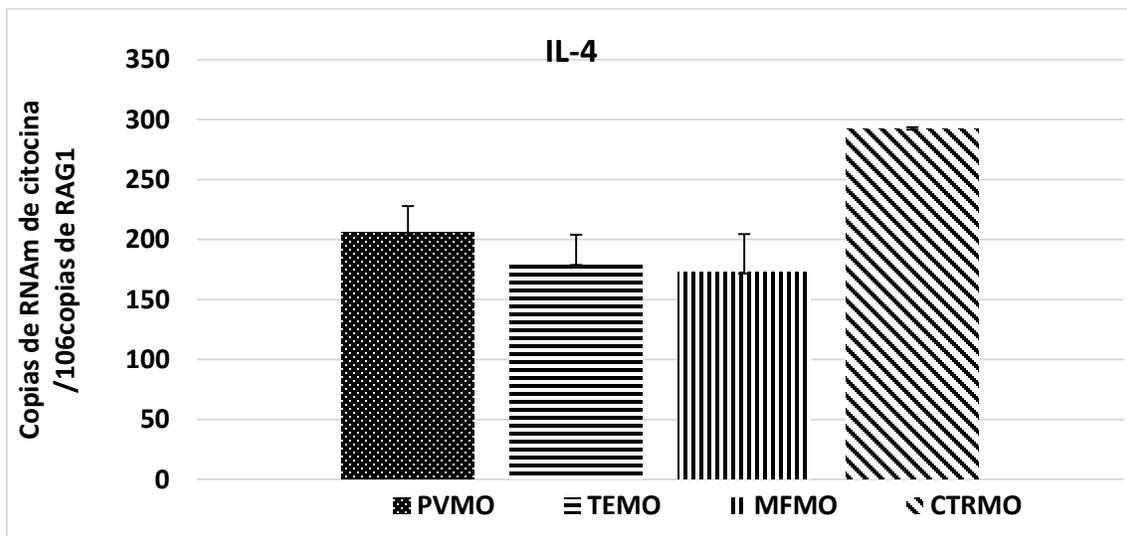


Fig. 19 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real en PCR tiempo real de IL-4 para las NMP en médula ósea. PVMO; Policitemia vera, TEMO, trombocitemia escencial, MFMO, mielofibrosis primaria. CTRMO, muestras control.

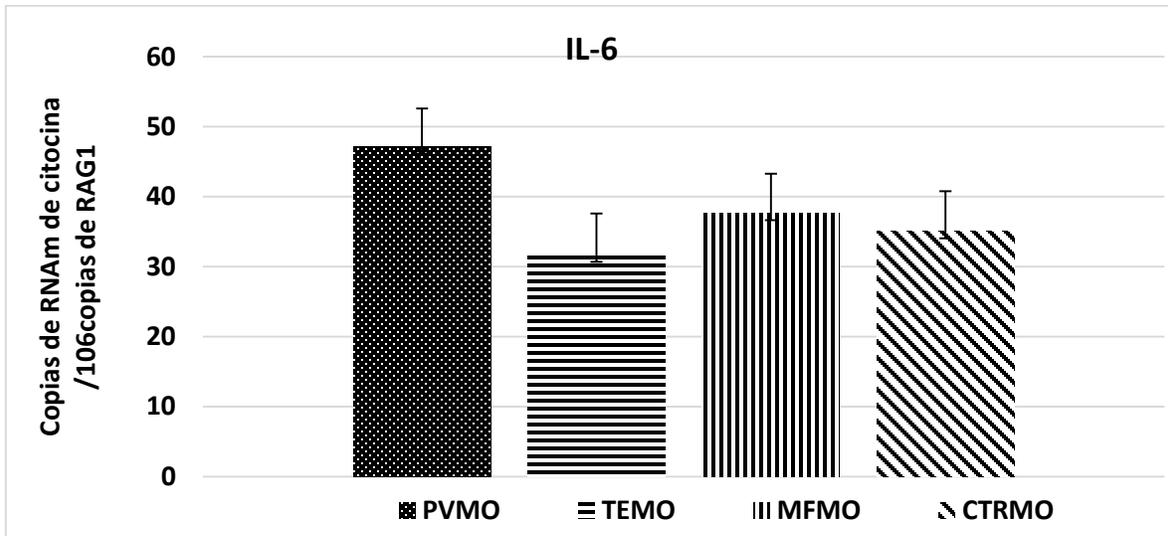


Fig. 20 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-6 para las NMP en médula ósea. PVMO; Policitemia vera, TEMO, trombocitemia escencial, MFMO, mielofibrosis primaria. CTRMO, muestras control.

La expresión de IL-23 para las NMP en sangre periférica muestra diferencias entre TE y MFP ( $P = 0.02$  y  $P = 0.002$ ) (Fig. 21) con marcada tendencia al incremento de expresión. Sin embargo la expresión de IL-17 no muestra diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Fig. 22).

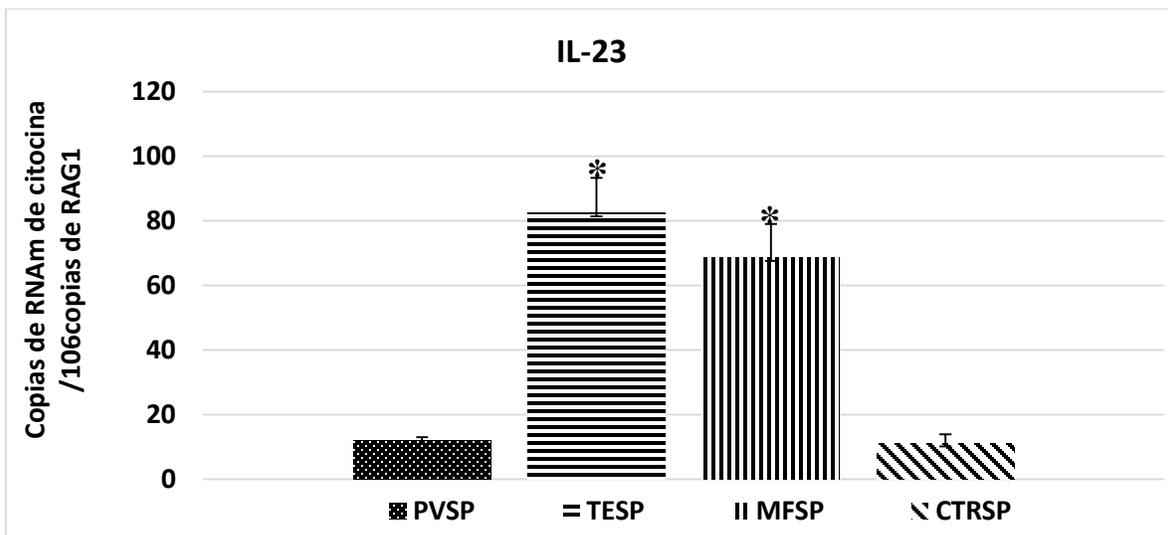


Fig. 21 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-23 para las NMP en sangre periférica. PVSP; Policitemia vera, TESP, trombocitemia escencial, MFSP, mielofibrosis primaria. CTRSP, muestras control.

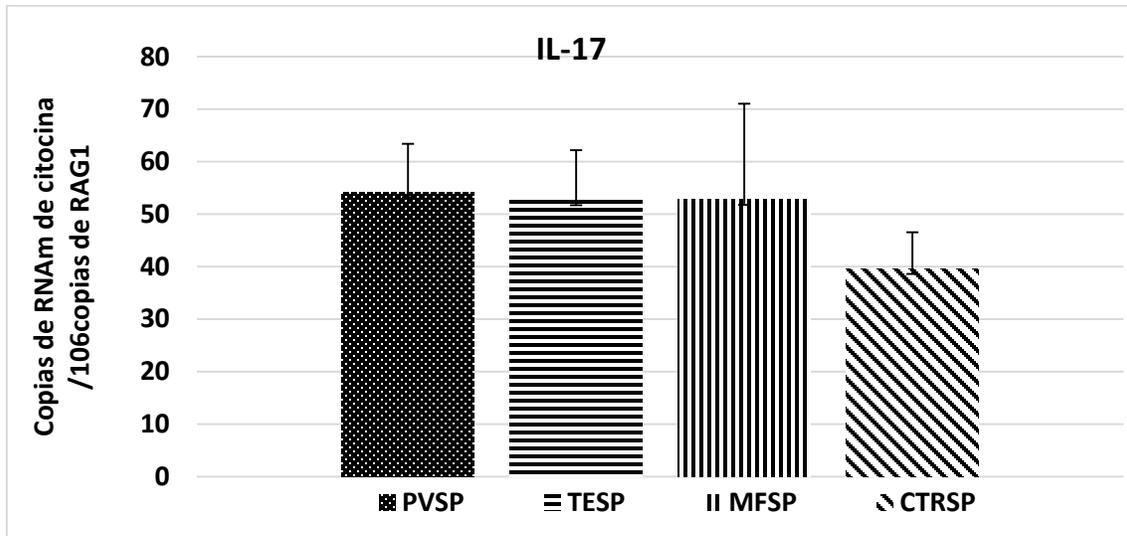


Fig. 22 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-17 para las NMP en sangre periférica. PVSP; Policitemia vera, TESP, trombocitemia escencial, MFSP, mielofibrosis primaria. CTRSP, muestras control.

En médula ósea se observan diferencias significativas para la expresión de IL-23 en TE y MFP ( $P = 0.02$  y  $P = 0.004$ ) (Fig. 23), se encuentran patrones inversos de expresión para IL-17, donde en TE muestra baja expresión de IL-17 ( $P = 0.001$ ) y en MFP muestra diferencias de alta expresión ( $P = 0.05$ ) (Fig. 24).

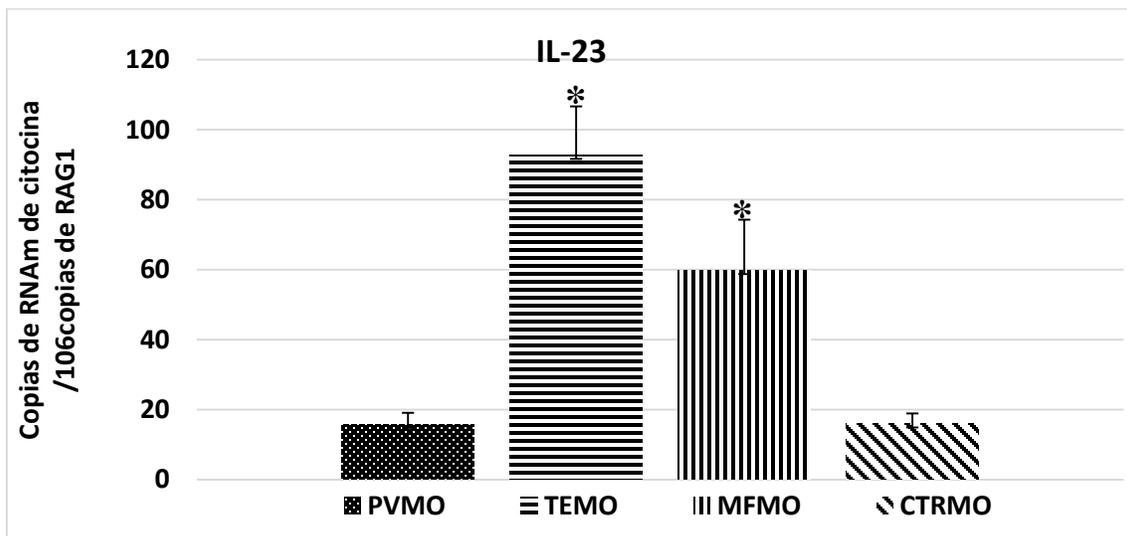


Fig. 23 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-23 para las NMP en médula ósea. PVMO; Policitemia vera, TEMO, trombocitemia escencial, MFMO, mielofibrosis primaria. CTRMO, muestras control.

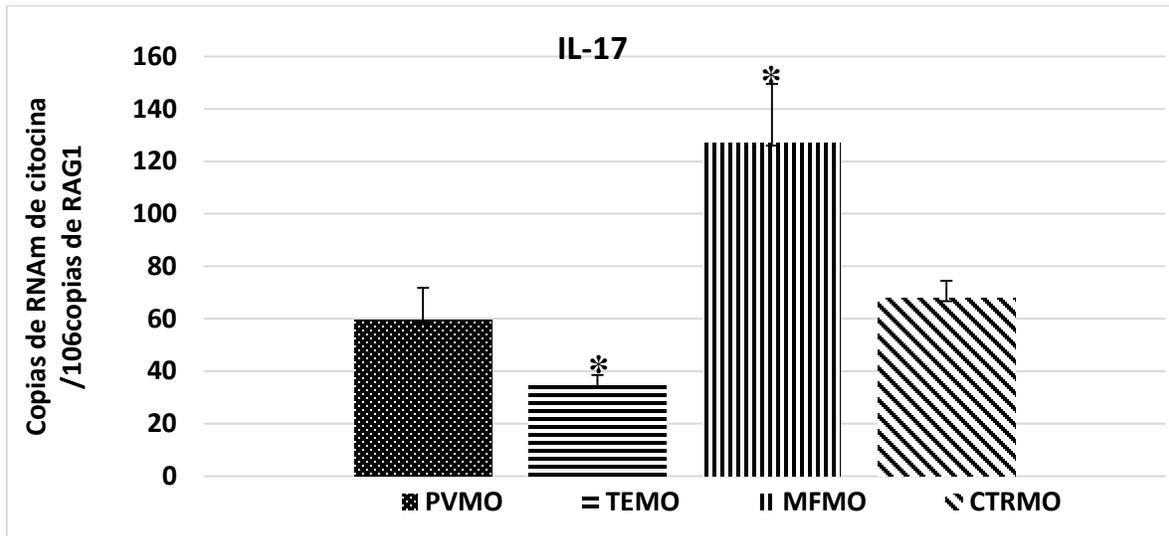


Fig. 24 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de IL-17 para las NMP en médula ósea. PVMO; Policitemia vera, TEMO, trombocitemia escencial, MFMO, mielofibrosis primaria. CTRMO, muestras control.

La expresión de citocinas se evaluó para cada enfermedad en relación a la presencia o ausencia del marcador molecular JAK2V617F. Solo para TE se encontró diferencia significativa ( $P = .033$ ) en la expresión de TNF- $\alpha$  en médula ósea (Fig. 25). Encontrando que la expresión de TNF- $\alpha$  es superior en caso de presentar la mutación. En los demás casos los resultados no son significativos ( $P > 0.05$ ) (datos no mostrados).

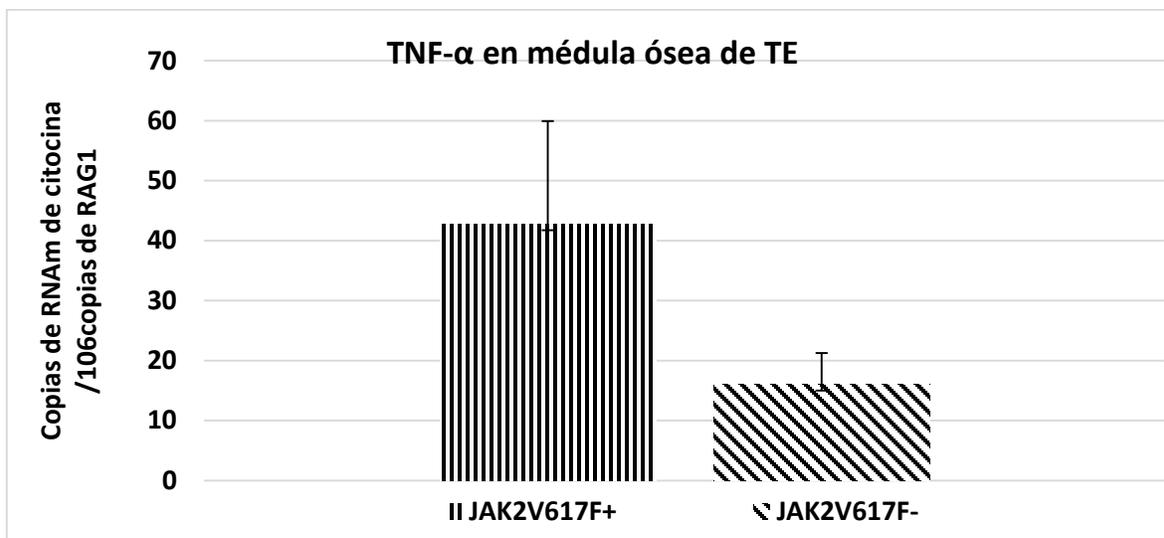


Fig. 25 Perfil de expresión del RNAm en PCR tiempo real de TNF- $\alpha$  en TE comparando la presencia o ausencia del marcador JAK2V617F.

## Discusión

El descubrimiento de mutaciones en el gen JAK2 y en otros genes relacionados a las rutas de proliferación y supervivencia de los diferentes linajes mieloides, se ha convertido en herramienta actual y de ayuda para la clasificación de las Neoplasias mieloproliferativas. La mutación puntual JAK2V617F se ha colocado como carácter mayor, según la OMS, para poder clasificar correctamente las NMP. Por esta razón es que la clasificación de las NMP sigue y seguirá siendo un reto en países en vías de desarrollo. Lo cual convierte en una necesidad la clasificación correcta y expedita de las NMP. Sin mencionar que la cantidad de mutaciones presentes hasta el momento para las NMP, que sigue en incremento. En esta investigación se exploran técnicas necesarias, accesibles y expeditas para ayudar a la clasificación, evitando procedimientos de riesgo para el paciente.

Durante esta investigación se contrastaron múltiples criterios expuestos en las publicaciones de la OMS para la clasificación de las NMP. Como primer análisis observamos que la edad y el sexo no demuestran diferencias entre las NMP. Siendo de 50 a 60 años la edad en la que se presentan con mayor prevalencia estas enfermedades. En cuanto a la frecuencia de las enfermedades encontramos que al menos para esta muestra, la mayoría de casos se asocian a TE (58%), siguiendo los casos de PV (28%) y por último los casos de MFP (14%) en las

frecuencias mencionadas anteriormente, de acuerdo al número de muestra obtenido durante esta investigación (n=21).

Al enfocarnos en uno de los caracteres mayores de clasificación, y siendo este considerado el más relevante, el marcador molecular JAK2V617F, se determinó que tiene una tendencia asociarse con los grupos de NMP ( $C = 0.321$ ) demostrado por la correlación débil y sin llegar a ser significativa.

A través de las diferentes metodologías empleadas logramos observar diferencias importantes en las técnicas con la cuales se clasifican estas enfermedades. De manera que en este estudio se reporta que la competencia de oligonucleótidos en técnicas de PCR-alelo específico, llega a ser una limitante importante en la correcta clasificación de estas neoplasias, metodología que presenta la mayoría de resultados no interpretables (18 casos). Este efecto se le puede atribuir a la baja expresión del alelo mutante JAK2V617. Llevando la reacción a la amplificación del control interno y del genotipo silvestre, lo cual no permite observar la presencia o ausencia de genotipos mutantes.

Mediante la técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism) se infieren sitios de restricción no reportados en la literatura. Estos pueden ocasionar tanto resultados no interpretables, como falsos positivos. Al menos en este estudio con la enzima de restricción BSAXI no fue posible obtener resultados interpretables, debido a la presencia de un sitio de restricción de cerca de 100 pares de bases del sitio de restricción que se conoce como involucrado en la ayuda de clasificación de la mutación JAK2V617F.

Con mejores resultados y eliminando la competencia de los oligonucleótidos la técnica de PCR cumple con las expectativas, además de ser confiable y rápida, se obtiene un buen método como primer análisis de laboratorio para la clasificación de las NMP. Este método es capaz de mostrar la presencia o ausencia de la mutación JAK2V617F; Si en conjunto se trabaja con una reacción dirigida hacia la presencia o ausencia del genotipo silvestre. Es capaz de mostrar si la mutación se encuentra como homocigoto o como heterocigoto. Con este método solo se obtuvieron 4 casos no interpretables.

Por otro lado la curva de disociación en PCR tiempo real fue la herramienta capaz de discriminar si la mutación se encuentra como homocigoto o como heterocigoto, por inferencia de los resultados obtenidos. Metodología que no muestra resultados no interpretables y con la cual es posible determinar de forma precisa si se encuentra la

mutación. Siendo la herramienta ideal para determinar la presencia o ausencia de la mutación JAK2V617F.

Al llevar a cabo la comparación entre PCR y Q-PCR se observa que hay correlación moderada entre las técnicas para la clasificación de las NMP. Por lo cual es de importancia mencionar que el PCR al ser un método menos sensible funge como una técnica rápida para uno de los caracteres de clasificación mayores. Y por otro lado y con mayor eficiencia la técnica de Q-PCR se consideró en este trabajo como la técnica de confirmación para la clasificación de NMP.

En busca de características para la clasificación que estén presentes en todas las NMP y que tengan la capacidad de generar diferenciación entre estas entidades patológicas, se buscaron citocinas que pudieran correlacionar a algún tipo de inflamación para ser utilizado como características de clasificación. Aun cuando se han estudiado otros componentes inmunológicos relacionados a la regulación de la vía JAK/STAT sin la capacidad de diferenciar entre patologías y que no se relacionan a inflamación.

En el caso de PV encontramos un perfil inmunológico que sugiere la reducción de respuesta inflamatoria Th1 en conjunto con el incremento de respuesta inflamatoria Th2, a nivel sistémico (sangre periférica) y local (médula ósea). De manera interesante se observa el incremento a nivel sistémico de la expresión de IL-1 $\beta$ . Sugiriendo que la respuesta tipo Th2 está presente como mecanismo en la resolución de la proliferación aberrante de eritrocitos mediante la activación de respuesta antiinflamatorias (Kamimura et al. 2014).

TE presenta patrones sugerentes de respuesta inmune innata por la sobre expresión de IL-23 a nivel sistémico (sangre periférica) y local (médula ósea), citocina que está relacionada a la aparición de hematopoyesis extramedular. Esta citocina es necesariamente producida en células hematopoyéticas para poder llevar a cabo su actividad biológica. (Lee et al. 2003). Por otro lado se ha comprobado que IL-23 está relacionada a la aparición de la inflamación sistémica que resulta en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Kamimura et al. 2014). De manera contrastante en este estudio los niveles de IL-17, no correlacionan con la expresión de IL-23, sino que la expresión en médula ósea de IL-17 se reduce (Kamimura et al. 2014; Lee et al. 2003). Por lo tanto se sugiere que la presencia de inflamación relacionada a la respuesta inmune innata y no a la adaptativa, con inferencia hacia inflamación crónica.

El perfil de expresión de IL-1 $\beta$  sugiere la reducción de autofagia, ya que el incremento en la expresión de esta citosina se ha relacionado a la deficiencia en los mecanismos de autofagia. Además, IL-1 $\beta$  es necesaria para la expresión de IL-17. Por lo tanto la elevada expresión de IL-23 e IL-1 $\beta$  se sugiere por inferencia que es un mecanismo de inmunidad innata que promueve el desarrollo y crecimiento tumoral, suprimiendo la respuesta inmune adaptativa, que se relaciona con la ausencia de respuestas inflamatorias de tipo celular y humoral, mismos que son mediadores de la inmunovigilancia.

Por otro lado, la falta de traducción del RNAm de IL-1 $\beta$  que ya se ha reportado para estas patologías (Pourcelot et al. 2014) se desconoce. Sin embargo se puede observar la tendencia de asociación entre el tipo de patología y el nivel de expresión de RNAm de IL-1 $\beta$  a nivel sistémico.

MFP presenta patrones sugerentes de respuesta tipo Th17 por la presencia de IL-23 a nivel sistémico (sangre periférica) y local (médula ósea) y solo para IL-17 a nivel local (médula ósea). En este caso podemos observar que de manera local (médula ósea) se comienza a generar la expresión de IL-17, que adicionando a la sobreexpresión a nivel sistémico (sangre periférica) de IL-6 nos apunta a una clara respuesta proinflamatoria (Lee et al. 2003; Kamimura et al. 2014).

Se ha podido observar que la cantidad de expresión de IL-1 $\beta$  se relaciona independientemente a las diferentes NMP. Por esta razón es que la expresión de IL-1 $\beta$  puede servir en la clasificación de las NMP. Comportamiento que también se puede relacionar a la hipótesis ya antes expuesta por varios autores (Naseema Gangat et al. 2007; Passamonti et al. 2000; Campbell et al. 2005; Passamonti et al. 2008; N Gangat et al. 2007; Cervantes et al. 2009; Mesa et al. 2005; Kralovics et al. 2005; Passamonti et al. 2010; Landolfi et al. 2007; Passamonti et al. 2011) en la cual se plantea que estas NMP son varias etapas de una misma patología.

La sobreexpresión de TNF- $\alpha$  en presencia de la mutación JAK2V617F se relaciona a la ruta JAK/STAT, de esta manera la presencia de JAK2 activado tiene efectos sobre la expresión al menos de TNF- $\alpha$  y que se relaciona a los patrones de inflamación crónica presentes en TE.

## **Conclusión**

La población de NMP en los departamentos de hematología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y el Instituto Nacional de Cancerología tienen frecuencias de aparición similares a las frecuencias de aparición reportadas en otras poblaciones. La frecuencia de la mutación JAK2V617F en esta población es similar a las frecuencias reportadas en otras poblaciones.

Se validó la metodología de curva de disociación en PCR tiempo real como la metodología adecuada para la detección y clasificación de la NMP, en relación a la mutación JAK2V617F. Las NMP no tienen respuestas antiinflamatorias similares, aun con la presencia del marcador molecular JAK2V617F.

En cuanto a la evaluación de la respuesta inmune, PV tiene patrones de expresión de citocinas sugerentes de inflamación tipo Th2. TE tiene patrones de expresión de citocinas sugerentes de respuesta inmune innata. Y por último MFP tiene patrones de expresión de citocinas sugerentes de inflamación tipo Th17. Por lo tanto las NMP no tienen respuestas similares de inflamación.

La expresión de IL-1 $\beta$ , en sangre periférica, tiene la posibilidad de diferenciar entre las diferentes NMP.

La expresión de TNF- $\alpha$  se relaciona a la presencia de la mutación JAK2V617F. De esta manera al tener la mutación JAK2V617F, hay mayor expresión de TNF- $\alpha$ .

## **Perspectivas**

Posteriormente se evaluará la relación de nuevos marcadores moleculares como el gen calreticulina (entre otros), que se ha demostrado estar relacionados al desarrollo de estas neoplasias, a la expresión de citocinas. También se pretende corroborar la relación e inmunidad innata de TE y la relación de inmunidad adaptativa de MF con la evaluación de la expresión de IL-12. Como última línea de evaluación se considera ampliar el número de muestra para relacionar estas neoplasias a polimorfismos que ya se han reportado con relación al desarrollo de estas neoplasias así como describir nuevos polimorfismos que se pudieran encontrar asociados en la población mexicana.

### Literatura citada

- Andrikovics, H. et al., 2014. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*, 99(7), pp.1184–1190. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895336>.
- Bandaranayake, R.M. et al., 2012. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol*, 19(8), pp.754–759. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820988>.
- Baxter, E.J. et al., 2005. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365(9464), pp.1054–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781101> [Accessed September 8, 2014].
- Belver, L. & Ferrando, A. a, 2015. Aberrant cytokine production by nonmalignant cells in the pathogenesis of myeloproliferative tumors and response to JAK inhibitor therapies. *Cancer discovery*, 5(3), pp.234–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749974> [Accessed June 2, 2015].
- Bench, A.J., Baxter, E.J. & Green, A.R., 2013. Methods for detecting mutations in the human JAK2 gene. *Methods Mol Biol*, 967, pp.115–131. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296725>.
- Benmoussa, A. et al., 2011. JAK2-V617F mutation in Moroccan patients with myeloproliferative disorders: contribution, diagnosis and therapeutic prospects. *Pathol Biol (Paris)*, 59(4), pp.e89–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939582>.
- Bennemann, K. et al., 2012. Epigenetic dysregulation of secreted frizzled-related proteins in myeloproliferative neoplasms complements the JAK2V617F-mutation. *Clin Epigenetics*, 4(1), p.12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935201>.
- Bock, O. et al., 2006. Detection of the Single Hotspot Mutation in the JH2 Pseudokinase Domain of Janus Kinase 2 in Bone Marrow Trephine Biopsies Derived from Chronic Myeloproliferative Disorders. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8(2), pp.170–177.
- Butcher, C.M. et al., 2008. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia*, 22(4), pp.870–873. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914411>.
- Campbell, P.J. et al., 2005. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 366(9501), pp.1945–53. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325696>.

Cervantes, F. et al., 2009. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International working group for myelofibrosis research and treatment. *Blood*, 113, pp.2895–2901.

Chretien, A.S. et al., 2013. Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med*, 2(1), pp.11–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133623>.

Cleyrat, C. et al., 2010. JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. *Leukemia*, 24(5), pp.1069–1073. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182460>.

Etheridge, S.L. et al., 2014. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood*, 123(7), pp.1059–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24381227> [Accessed October 23, 2014].

Etheridge, S.L. et al., 2014. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(6), pp.2295–2300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24469804>.

Fantasia, F. et al., 2014. A highly specific q-RT-PCR assay to address the relevance of the JAK2WT and JAK2V617F expression levels and control genes in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*, 93(4), pp.609–616. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173087>.

Fend, F. et al., 2008. Atypical chronic myeloid leukemia as defined in the WHO classification is a JAK2 V617F negative neoplasm. *Leuk Res*, 32(12), pp.1931–1935. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555525>.

Feng, J. et al., 1997. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Molecular and cellular biology*, 17(5), pp.2497–2501.

Flach, J. et al., 2010. Mutations of JAK2 and TET2, but not CBL are detectable in a high portion of patients with refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis. *Haematologica*, 95(3), pp.518–519. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903679>.

Gangat, N. et al., 2007. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, 138(3), pp.354–358.

- Gangat, N. et al., 2007. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia*, 21(2), pp.270–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170720> [Accessed June 4, 2015].
- Geyer, H.L. et al., 2014. Distinct clustering of symptomatic burden among myeloproliferative neoplasm patients: retrospective assessment in 1470 patients. *Blood*, 123(24), pp.3803–3810. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553173>.
- Ghoreschi, K., Laurence, A. & O’Shea, J.J., 2009. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*, 228(1), pp.273–287. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19290934>.
- Girault, J.A. et al., 1998. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 4(12), pp.751–69. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2230389&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ho, C.L. et al., 2012. Rapid identification of heterozygous or homozygous JAK2(V617F) mutations in myeloproliferative neoplasms using melting curve analysis. *J Formos Med Assoc*, 111(1), pp.34–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333011>.
- Hsiao, H.H. et al., 2008. Disappearance of JAK2 V617F mutation in a rapid leukemic transformed essential thrombocythemia patient. *Leuk Res*, 32(8), pp.1323–1324. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078991>.
- Hsu, H.C., 2007. Pathogenetic role of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Chin Med Assoc*, 70(3), pp.89–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389152>.
- Kamimura, D. et al., 2014. *Cytokine Frontiers*, Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-54442-5>.
- Kearney, L. et al., 2009. Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113(3), pp.646–648. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927438>.
- Kiladjan, J.J., 2012. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, pp.561–566. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233635>.
- Klampfl, T. et al., 2013. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms.

- N Engl J Med*, 369(25), pp.2379–2390. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325356>.
- Konoplev, S. et al., 2007. Janus kinase 2 V617F mutation is detectable in spleen of patients with chronic myeloproliferative diseases suggesting a malignant nature of splenic extramedullary hematopoiesis. *Hum Pathol*, 38(12), pp.1760–1763. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707884>.
- Kralovics, R. et al., 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 352(17), pp.1779–1790. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858187>.
- Kralovics, R. et al., 2006. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, 108(4), pp.1377–1380. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675710>.
- Kremer, M. et al., 2006. The JAK2 V617F mutation occurs frequently in myelodysplastic/myeloproliferative diseases, but is absent in true myelodysplastic syndromes with fibrosis. *Leukemia*, 20(7), pp.1315–1316. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16617316>.
- Kundranda, M.N., Tibes, R. & Mesa, R.A., 2012. Transformation of a chronic myeloproliferative neoplasm to acute myelogenous leukemia: does anything work? *Curr Hematol Malig Rep*, 7(1), pp.78–86. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170483>.
- Lander, E.S. et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp.860–921. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011>.
- Landolfi, R. et al., 2007. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*, 109, pp.2446–2452.
- Langowski, J.L. et al., 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442(7101), pp.461–465.
- Langrish, C.L. et al., 2004. IL-12 and IL-23: Master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 202, pp.96–105.
- Lee, D.C. et al., 2003. *The Cytokine Handbook*, Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780126896633500454>.
- Lee, T.S. et al., 2009. Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13–15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Struct Biol*, 9, p.58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744331>.

- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J., 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16, pp.293–322. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597132>.
- Levine, R.L. et al., 2007. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*, 7(9), pp.673–683. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721432>.
- Li, J. et al., 2011. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Disease Models & Mechanisms*, 4(3), pp.311–317.
- Lichtman, M. a, 2005. Is it chronic idiopathic myelofibrosis, myelofibrosis with myeloid metaplasia, chronic megakaryocytic-granulocytic myelosis, or chronic megakaryocytic leukemia? Further thoughts on the nosology of the clonal myeloid disorders. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 19(7), pp.1139–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902283>.
- Lin, W. & Karin, M., 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. *The Journal of Clinical Investigations*, 117(5), pp.1175–1183.
- Ma, W. et al., 2009. Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J Mol Diagn*, 11(1), pp.49–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074595>.
- Malcovati, L. & Cazzola, M., 2008. Myelodysplastic/myeloproliferative disorders. *Haematologica*, 93(1), pp.4–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166777>.
- Malhotra, H., 2012. Janus activated kinase inhibition in myelofibrosis. *Indian J Cancer*, 49(3), pp.260–265. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238141>.
- Maures, T.J., Kurzer, J.H. & Carter-Su, C., 2007. SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends Endocrinol Metab*, 18(1), pp.38–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140804>.
- McBride, K.M., McDonald, C. & Reich, N.C., 2000. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *The EMBO journal*, 19(22), pp.6196–6206.
- Mead, A.J. et al., 2013. Impact of isolated germline JAK2V617I mutation on human hematopoiesis. *Blood*, 121(20), pp.4156–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535062> [Accessed October 27, 2014].

- Mendiola, A.V. & Cruz, I.S., 2005. Vía JAK-STAT: Una Vision General. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 8(1), pp.14–25.
- Mesa, R.A. et al., 2005. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: A single-institution experience with 91 cases. *Blood*, 105, pp.973–977.
- Musolino, C. et al., 2013. Reduced IL-33 plasma levels in multiple myeloma patients are associated with more advanced stage of disease. *British journal of haematology*, 160(5), pp.709–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23205532> [Accessed June 2, 2015].
- Nangalia, J. et al., 2013. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, 369(25), pp.2391–2405. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325359>.
- Navarro, V.M., 2010. Marcadores moleculares de los síndromes mieloproliferativos. *Revista de Hematología*, 11(3), pp.152–155.
- O’Shea, J.J., Holland, S.M. & Staudt, L.M., 2013. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med*, 368(2), pp.161–170. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301733>.
- Pardanani, A., 2007. JAK2V617F and phenotype: questions galore. *Blood*, 109(1).
- Park, S.H. et al., 2013. The allele burden of JAK2 V617F can aid in differential diagnosis of Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasm. *Blood Res*, 48(2), pp.128–132. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826582>.
- Park, S.O. et al., 2013. Conditional deletion of Jak2 reveals an essential role in hematopoiesis throughout mouse ontogeny: implications for Jak2 inhibition in humans. *PLoS One*, 8(3), p.e59675. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23544085>.
- Passamonti, F. et al., 2010. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*, 115, pp.1703–1708.
- Passamonti, F. et al., 2000. Efficacy of pipobroman in the treatment of polycythemia vera: Long-term results in 163 patients. *Haematologica*, 85(10), pp.1011–1018.
- Passamonti, F. et al., 2011. Myeloproliferative neoplasms: from JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. *Oncotarget*, 2, pp.485–490.
- Passamonti, F. et al., 2008. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*, 93(11), pp.1645–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790799> [Accessed

June 4, 2015].

- Percy, M.J. & McMullin, M.F., 2005. The V617F JAK2 mutation and the myeloproliferative disorders. *Hematol Oncol*, 23(3-4), pp.91–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16285006>.
- Pourcelot, E. et al., 2014. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Experimental hematology*, 42(5), pp.360–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463275> [Accessed June 2, 2015].
- Rumi, E. et al., 2014. A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *American journal of hematology*, 89(1), p.115. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009127> [Accessed October 23, 2014].
- Rumi, E. et al., 2014. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 123(10), pp.1544–1551. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366362>.
- Saharinen, P. & Silvennoinen, O., 2002. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), pp.47954–47963.
- Santos, F.P. & Verstovsek, S., 2011. JAK2 inhibitors: what's the true therapeutic potential? *Blood Rev*, 25(2), pp.53–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21095048>.
- Sattler, M. et al., 2006. A sensitive high-throughput method to detect activating mutations of Jak2 in peripheral-blood samples. *Blood*, 107(3), pp.1237–1238. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434495>.
- Schnittger, S. et al., 2009. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica*, 94(3), pp.414–418. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252176>.
- Scott, L.M. et al., 2007. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, 356(5), pp.459–468. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17267906>.
- Seavey, M.M. & Dobrzanski, P., 2012. The many faces of Janus kinase. *Biochem Pharmacol*, 83(9), pp.1136–1145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209716>.

- Shuai, K. & Liu, B., 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 3(11), pp.900–911. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668806>.
- Spivak, J.L. & Moliterno, A.R., 2007. The Roles of Genetics and Epigenetics in the Diagnosis of Chronic Myeloproliferative Disorders. *Clinical Leukemia*, 1(5), pp.275–286.
- Sutton, C.E. et al., 2009. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from  $\gamma\delta$  T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity*, 31(2), pp.331–341. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.001>.
- Swerdlow, S.H. et al., 2008. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*,
- Szpurka, H. et al., 2006. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood*, 108(7), pp.2173–2181. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741247>.
- Tabarroki, A. & Tiu, R. V., 2014. Molecular Genetics of Myelofibrosis and its associated Disease Phenotypes. *Translational Medicine*, 8(7), pp.53–64.
- Tagariello, G. et al., 2009. The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in blood donors with upper-limit haematocrit levels. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 7(2), pp.111–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2689065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 1, 2015].
- Taylor, E.J., 2000. Dorland's Pocket Medical Dictionary. *The American Journal of the Medical Sciences*, 239, p.390.
- Tefferi, A., 2006. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pp.240–245. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124067>.
- Tefferi, A., 2010. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*, 24(6), pp.1128–1138. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428194>.
- Tefferi, A., Thiele, J. & Vardiman, J.W., 2009. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer*, 115(17), pp.3842–3847. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19472396>.

- Tiedt, R. et al., 2008. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*, 111(8), pp.3931–3940. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160670>.
- Vannucchi, A.M. et al., 2014. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618731>.
- Vardiman, J. & Hyjek, E., 2011. World health organization classification, evaluation, and genetics of the myeloproliferative neoplasm variants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, pp.250–256. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160042>.
- Vardiman, J.W. et al., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), pp.937–951. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357394>.
- Vassiliou, G.S. et al., 2006. An acquired translocation in JAK2 Val617Phe-negative essential thrombocythemia associated with autosomal spread of X-inactivation. *Haematologica*, 91(8), pp.1100–1104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885051>.
- Vigil, A.M.A. et al., 2013. Introducción del estudio molecular de la mutación JAK2V617F en neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL negativas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(4), pp.1–9.
- Ward, A.C., Touw, I. & Yoshimura, A., 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 95(1), pp.19–29.
- Wilks, a F., 1989. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(March), pp.1603–1607.
- Wu, Z. et al., 2014. A multiplex snapback primer system for the enrichment and detection of JAK2 V617F and MPL W515L/K mutations in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Biomed Res Int*, 2014, p.458457. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729973>.
- Xia, J. et al., 2012. JAK2 V617F, MPL W515L and JAK2 Exon 12 Mutations in Chinese Patients with Primary Myelofibrosis. *Chin J Cancer Res*, 24(1), pp.72–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359764>.
- Xu, X. et al., 2007. JAK2(V617F): Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood*, 109(1), pp.339–342. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946305>.

Zhao, A.H., Gao, R. & Zhao, Z.J., 2011. Development of a highly sensitive method for detection of JAK2V617F. *J Hematol Oncol*, 4, p.40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21985400>.

## Anexos

### A

#### Oligonucleótidos usados para genes constitutivos

Nombre	Secuencia Sentido	Secuencia antisentido	Tamaño (pb)
AF4/FMR2	GGAGCAGCATTCCATCCAGC	CATCCATGGGCCGGACATAA	600
AF4/FMR2	CCGCAGCAAGCAACGAACC	GTCTTCTCTGGCGGCTCC	400
ZBTB16	TGCGATGTGGTCATCATGGTG	CGTGTATTGTCGTCTGAGGC	300
RAG1	TGTTGACTCGATCCACCCCA	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA	200
TBXAS1	GCCCGACATTCTGCAAGTCC	GGTGTGCCGGGAAGGGTT	100

#### Oligonucleótidos para JAK2 utilizados para PCR punto final y PCR tiempo real

(melting)

Nombre	Secuencia
Sentido	TCCTCAGAACGTTGATGGCAG
Antisentido	ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT
Sentido específico (WT)	CATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG
Antisentido específico (MT)	GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA

#### Oligonucleótidos para citocinas utilizados en PCR tiempo real.

Nombre	Secuencia Sentido	Secuencia antisentido	Tamaño (pb)	Tm (°C)
IL-1 $\beta$	GCTCAAGTGTCTCAAGCAGCC	TTCAGTGGCGAGCTCAGGTAC	50	56
TNF- $\alpha$	GTTCAAGTGTCTCAAGCAGCC	AGCCCATGTTGTAGCAAACCC	52	60
IL-4	CCTCACATTGCTCAAGCAGCC	TGGGAGGTGAGACCCATTA	50	54

<b>II-6</b>	ATGGCTGAAAAAGATGGATGCT	GCAAGTCTCCTCATTGAATCCAG	51	60
<b>II-17</b>	TGGTGTCACTGCTACTGCTGC	TTCCTGCCTTCACTATGGCC	51	59
<b>IL-23</b>	TGAGGCTTGAATCTGCTGAG	CTCCTGCAGCCTGAGGGTC	52	60

## B

Valores clínicos de cuenta sanguínea de la muestra utilizada.

<b>Biometría Hemática</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Tipo</b>	<b>RBC</b>	<b>Hgb</b>	<b>Plt</b>	<b>WBC</b>
<b>Muestra</b>					
<b>Policitemia Vera</b>					
<b>HB</b>	SP	5.74	19.7	330	11.6
<b>FR</b>	SP	5.8	19.4	442	6.2
<b>MA</b>	SP	4	19.2	484	22.6
<b>RJ</b>	SP	7.67	19.9	210	6.9
<b>GL</b>	SP	5.67	18.5	252	8.5
<b>VS</b>	SP	5.8	21	330	8.5
<b>Trombocitemia esencial</b>					
<b>TV</b>	SP	6.31	14.9	645	4.9
<b>RR</b>	SP	4.34	15.4	852	5.6
<b>SP 1-14</b>	SP	4.69	13.4	1267	9.7
<b>RP</b>	SP	3.97	13.1	634	4.6
<b>MN</b>	SP	3.97	13.1	634	4.6
<b>GA</b>	SP	3.81	20.3	699	8.6
<b>MO-11-07</b>	SP	4	12.9	1335	12 900
<b>MO-12-21</b>	SP	6.4	17.5	789	11 900
<b>MO-12-23</b>	SP	5.2	14.9	872	6 400
<b>MO-12-24</b>	SP	3.8	14.4	537	3700
<b>MO-12-27</b>	SP	4.2	16	310	6 100
<b>MO-13-34</b>	SP	4.8	14.3	937	4 800
<b>Mielofibrosis Primaria</b>					

<b>ML</b>	SP	5.36	14.4	778	9.5
<b>LG</b>	SP	6.69	19.2	417	22.4
<b>MO-12-18</b>	SP	3.6	12	34	33
<b>Casos Control</b>					
<b>114</b>	SP	5.27	13.93	248	7.56
<b>214</b>	SP	4.28	15.58	246	5.44
<b>314</b>	SP	5.36	14.11	163	6.49
<b>414</b>	SP	5.07	12.44	328	6.92
<b>514</b>	SP	4.3	12.66	272	7.14
<b>614</b>	SP	4.31	12.33	396	9.09
<b>714</b>	SP	5.44	14.85	291	8.8
<b>814</b>	SP	5.37	14.92	386	10.01
<b>914</b>	SP	4.61	14.76	312	10.02

RBC, eritrocitos; Hgb, hemoglobina; Plt, plaquetas; WBC, Leucocito

<b>Biometría hemática extendida</b>						
<b>Muestra</b>	<b>Tipo</b>	<b>Neutrófilos</b>	<b>Linfocitos</b>	<b>Monocitos</b>	<b>Eosinófilos</b>	<b>Basófilos</b>
Muestra						
<b>Policitemia Vera</b>						
<b>HB</b>	SP	81.3	10.7	5	1.7	1.3
<b>FR</b>	SP	73	16.2	5.8	4.5	0.5
<b>MA</b>	SP	77.1	15.9	6	5	0.5
<b>RJ</b>	SP	63.8	21.4	12.1	2.7	0
<b>GL</b>	SP	63.8	25.3	5.6	1.3	0.8
<b>VS</b>	SP	81.3	330	5	1.3	0.8
<b>Trombocitemia esencial</b>						
<b>TV</b>	SP	62.6	28.3	5.8	2.6	0.7
<b>RR</b>	SP	55.6	35.6	4.9	3	0.9
<b>SP 1-14</b>	SP	68.4	22.3	4.2	4.3	0.8
<b>RP</b>	SP	62.8	23	9.9	2.9	1.3

<b>MN</b>	SP	62.8	23	9.9	2.9	1.3
<b>GA</b>	SP	59.7	33.1	4.8	2	2
<b>MO-11-07</b>	SP	12 900	63	29	6	0
<b>MO-12-21</b>	SP	11 900	77	13.2	5.8	2.7
<b>MO-12-23</b>	SP	6 400	78	14	4	1
<b>MO-12-24</b>	SP	3700	60	33	6	1
<b>MO-12-27</b>	SP	6 100	52	35	11	1
<b>MO-13-34</b>	SP	4 800	79	18	2	1
<b>Mielofibrosis Primaria</b>						
<b>ML</b>	SP	79.6	12.7	4.4	2.6	0.7
<b>LG</b>	SP	89.4	6.5	1.8	1.8	0.5
<b>MO-12-18</b>	SP	54	34	10	2	0
<b>Casos Control</b>						
<b>114</b>	SP	50.03	48.89	3.4	3.07	1.57
<b>214</b>	SP	55.13	47.44	2.45	4.22	0.19
<b>314</b>	SP	54.4	31.39	14.83	3.26	1.08
<b>414</b>	SP	67.01	41.12	5.07	2.47	1.62
<b>514</b>	SP	66.71	36.89	11.55	1.03	1.18
<b>614</b>	SP	45.76	35.48	3.42	4.71	1.5
<b>714</b>	SP	41.21	38.68	8.6	3.79	0.46
<b>814</b>	SP	58.39	23.16	6.65	3.17	0.57
<b>914</b>	SP	55.89	34.46	4.43	4.35	1.4

**C**

**Datos Poblacionales de la muestra utilizada.**

<b>Poblacionales</b>					
Muestra	Tipo	Diagnóstico	Diagnostico	Sexo	Edad
	Muestra	Inicial	Final		
<b>Policitemia Vera</b>					
<b>HB</b>	MO/SP	PV	PV	F	71

<b>FR</b>	MO/SP	PV	PV	M	54
<b>MA</b>	MO/SP	PV	PV	M	68
<b>RJ</b>	MO/SP	PV	PV	M	44
<b>GL</b>	MO/SP	PV	PV	M	60
<b>VS</b>	MO/SP	PV	PV	F	70
<b>Trombocitemia esencial</b>					
<b>TV</b>	MO/SP	TE	TE	M	55
<b>RR</b>	MO/SP	TE	TE	M	35
<b>SP 1-14</b>	MO/SP	TE	TE	F	54
<b>RP</b>	MO/SP	TE	TE	F	50
<b>MN</b>	MO/SP	TE	TE	F	62
<b>GA</b>	MO/SP	TE	TE	F	39
<b>MO-11-07</b>	MO/SP	TE	TE	M	66
<b>MO-12-21</b>	MO/SP	TE	TE	F	63
<b>MO-12-23</b>	MO/SP	TE	TE	M	70
<b>MO-12-24</b>	MO/SP	TE	TE	F	61
<b>MO-12-27</b>	MO/SP	TE	TE	F	62
<b>MO-13-34</b>	MO/SP	TE	TE	F	60
<b>Mielofibrosis Primaria</b>					
<b>ML</b>	MO/SP	TE	MFP	F	58
<b>LG</b>	MO/SP	PV	MFP	F	56
<b>MO-12-18</b>	MO/SP	MFP	MFP	M	76
<b>Casos Control</b>					
<b>114</b>	MO/SP	NEG	NEG	M	68
<b>214</b>	MO/SP	NEG	NEG	M	44
<b>314</b>	MO/SP	NEG	NEG	M	60
<b>414</b>	MO/SP	NEG	NEG	F	71
<b>514</b>	MO/SP	NEG	NEG	M	54
<b>614</b>	MO/SP	NEG	NEG	M	55
<b>714</b>	MO/SP	NEG	NEG	M	35

<b>814</b>	MO/SP	NEG	NEG	F	54
<b>914</b>	MO/SP	NEG	NEG	M	65

**D**

**Resultados obtenidos desglosados.**

<b>PCR-Punto Final</b>		
<b>Muestra</b>	<b>JAK2 INNSZ (Médula Ósea)</b>	<b>JAK2 INNSZ (Sangre Periférica)</b>
<b>Policitemia Vera</b>		
<b>HB</b>	JAK2+	JAK2+
<b>FR</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MA</b>	JAK2+	JAK2+
<b>RJ</b>	JAK2-	JAK2-
<b>GL</b>	JAK2-	JAK2-
<b>VS</b>	JAK2-	JAK2-
<b>Trombocitemia esencial</b>		
<b>TV</b>	JAK2+	JAK2+
<b>RR</b>	JAK2-	JAK2-
<b>SP 1-14</b>	JAK2-	JAK2-
<b>RP</b>	JAK2-	JAK2-
<b>MN</b>	JAK2-	JAK2-
<b>GA</b>	JAK2-	JAK2-
<b>MO-11-07</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-12-21</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-12-23</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-12-24</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-12-27</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-13-34</b>	JAK2-	JAK2-
<b>Mielofibrosis Primaria</b>		
<b>ML</b>	JAK2+	JAK2-
<b>LG</b>	JAK2+	JAK2+

<b>MO-12-18</b>	JAK2+	JAK2+
<b>Casos Control</b>		
<b>114</b>	JAK2-	JAK2-
<b>214</b>	JAK2-	JAK2-
<b>314</b>	JAK2-	JAK2-
<b>414</b>	JAK2-	JAK2-
<b>514</b>	JAK2-	JAK2-
<b>614</b>	JAK2-	JAK2-
<b>714</b>	JAK2-	JAK2-
<b>814</b>	JAK2-	JAK2-
<b>914</b>	JAK2-	JAK2-

<b>PCR-Tiempo Real</b>		
Muestra	JAK2 INNSZ (MO)	JAK2 INNSZ (SP)
<b>Policitemia Vera</b>		
<b>HB</b>	JAK2+	JAK2+
<b>FR</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MA</b>	JAK2+	JAK2+
<b>RJ</b>	JAK2-	JAK2-
<b>GL</b>	JAK2-	JAK2-
<b>VS</b>	JAK2-	JAK2-
<b>Trombocitemia esencial</b>		
<b>TV</b>	JAK2+	JAK2+
<b>RR</b>	JAK2-	JAK2-
<b>SP 1-14</b>	JAK2-	JAK2-
<b>RP</b>	JAK2-	JAK2-
<b>MN</b>	JAK2-	JAK2-
<b>GA</b>	JAK2-	JAK2-
<b>MO-11-07</b>	JAK2-	JAK2-
<b>MO-12-21</b>	JAK2-	JAK2-

<b>MO-12-23</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-12-24</b>	JAK2-	JAK2-
<b>MO-12-27</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-13-34</b>	JAK2-	JAK2-
<b>Mielofibrosis Primaria</b>		
<b>ML</b>	JAK2+	JAK2-
<b>LG</b>	JAK2+	JAK2+
<b>MO-12-18</b>	JAK2+	JAK2+
<b>Casos Control</b>		
<b>114</b>	JAK2-	JAK2-
<b>214</b>	JAK2-	JAK2-
<b>314</b>	JAK2-	JAK2-
<b>414</b>	JAK2-	JAK2-
<b>514</b>	JAK2-	JAK2-
<b>614</b>	JAK2-	JAK2-
<b>714</b>	JAK2-	JAK2-
<b>814</b>	JAK2-	JAK2-
<b>914</b>	JAK2-	JAK2-

## **E**

### **Curva Estándar Para PCR-tiempo real.**

Ejemplo aplicado para el ribosoma 16S bacteriano, y utilizando el marcador Low DNA MassLadder (Cat. 10068-013, Invitrogen). Previo a el análisis se hace un amplificado por PCR punto final de una muestra para el ribosoma 16S, esta muestra se corre en un gel de agarosa el 1.8% con un marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat. 15628-019, Invitrogen). Se observa en transluminador y se obtiene los índices de densidad para la muestra y para el marcador de masa molecular. En el ejemplo se obtuvo un ID (Índice de Densidad) para la muestra del ribosoma 16S de 217,261 y para el marcador de masa molecular ase obtuvo 20876.

El marcador de masa molecular sabemos que tiene 40 ng de DNA por banda, y se procede a la siguiente operación.

$$217261 \text{ ID de muestra} \left( \frac{40 \text{ ng}}{20876 \text{ ID del marcador de masa}} \right) = 41.62 \text{ ng}/5\mu\text{l}$$

Lo que es igual a

$$8.32 \text{ ng}/\mu\text{l} = 8.32 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$$

Obteniendo cuantos microgramos por microlitro hay en nuestra muestra; Se calculó la masa molecular del amplicón, realizando la siguiente operación

$$101 \text{ pb} \times 660 \frac{\text{g}}{\text{mol/pb}} = 66,660 \text{ g/mol}$$

Donde 101pb es el número de pares de bases en el producto de PCR que se obtuvo para el ribosoma 16S y 660 el peso molecular de un par de bases.

Para aplicarlo a la ecuación:

$$\begin{aligned} \frac{8.32 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}}{66,660 \text{ g/mol}} \times 6.021237 \times 10^{23} \text{ mol} &= 7.5204 \times 10^{16} \text{ cp}/\text{Lt} \\ &= 7.5204 \times 10^{10} \text{ cp}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Dónde:

$8.32 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$  : es el resultado de la primera operación.

66,660: es el resultado de la segunda operación.

$6.021237 \times 10^{23}$  : es el número de Avogadro.

De esto se obtiene el número de copias de DNA por microlitro de solución, conociendo esto podemos realizar la siguiente operación.

$$1 \times 10^{10} \left( \frac{1 \mu\text{l}}{7.5204 \times 10^{10}} \right) = .1329 \mu\text{l}$$

Ahora tomando 1.329 microlitros de muestra y agregando 8.64 microlitros de agua DEPC, obtenemos una solución con  $1 \times 10^{10}$  copias por microlitro, a esta solución se le agregan 90 microlitros de agua DEPC y se obtiene una solución  $1 \times 10^9$ , y se continúan haciendo soluciones seriadas.