



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTANDARIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PCR
ESPECÍFICO DE ALELO Y PCR-RFLP'S PARA LA
DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN V617F EN EL GEN
JAK2 EN PACIENTES CON NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

VERÓNICA ADRIANA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Marisol López López

VOCAL: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

SECRETARIO: Profesor: Rosa María Arana Trejo

1er. SUPLENTE: Profesor: Nancy Monroy Jaramillo

2° SUPLENTE: Profesor: Laura Carmona Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE ONCOHEMATOLOGÍA, S.C.

ASESOR DEL TEMA: QFB. ROSA MARÍA ARANA TREJO



SUSTENTANTE: VERÓNICA ADRIANA GONZÁLEZ MARTÍNEZ



AGRADECIMIENTOS.

Existen personas muy importantes a las que quiero dedicarla y agradecer su presencia en mi vida:

A Rosy: Por ser el sendero para la realización de éste trabajo y por su gran apoyo para iniciarme en lo que, estoy segura, quiero dedicarme toda la vida. Es un gran ser humano y le tengo un gran cariño y respeto; estoy y estaré infinitamente agradecida por sus todas enseñanzas.

A mi mami: Porque no sólo me diste la vida, sino que me has enseñado a caminar a través de ella sabiendo que siempre puedo tomar tu mano. Gracias por tu fortaleza, tu amor, tu compañía y tu apoyo incondicional. Te adoro.

A mi papi: Si se trata de hablar un verdadero hombre, ese eres tú. Gracias por estar siempre a mi lado, por enseñarme el camino del trabajo, del amor sincero, la sencillez y la nobleza. Te admiro.

A Ale: Gracias por enseñarme a ver la vida de un modo distinto y por darle ese toque de alegría día con día; porque sabes la forma de hacerme sonreír aún en los momentos más difíciles.

A Diana, Martha y Luis por representar los verdaderos amigos incondicionales y quienes complementan mi vida.

...Y sobre todo a Dios y a la vida, por hacerme inmensamente feliz y permitirme amar y disfrutar cada segundo con lo que tengo y con lo que soy.

Por mi raza hablará el espíritu". Orgullosamente UNAM.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumen | 11 |
| 2. Marco teórico | 12 |
| 2.1. Clasificación | 12 |
| 2.1.1. Clasificación de las neoplasias hematológicas | 12 |
| 2.1.2. Clasificación de los neoplasias mieloproliferativas | 13 |
| 2.2. Características Clínicas | 14 |
| 2.2.1. Neoplasias mieloproliferativas | 14 |
| A) Neoplasias mieloproliferativas clásicas | 15 |
| B) Neoplasias mieloproliferativas no-clásicas | 19 |
| 2.3. Biología Molecular | 22 |
| 2.3.1. Familia de genes <i>JAK</i> | 22 |
| 2.3.2. <i>JAK2</i> | 24 |
| 2.3.2.1. Gen <i>JAK2</i> | 24 |
| 2.3.2.2. Proteína <i>JAK2</i> | 24 |
| A) Estructura | 24 |
| B) Función | 25 |
| 2.3.3. Mutación <i>JAK2V617F</i> | 27 |
| A) Descubrimiento | 27 |
| B) Bases Genéticas y Celulares | 28 |
| C) Incidencia | 30 |
| D) Causas Genéticas y Asociación Fenotípica | 30 |
| E) Consecuencias Moleculares y Asociación Fenotípica | 31 |
| 2.3.4. Otras anomalías genéticas en neoplasias mieloproliferativas | 32 |
| 2.3.5. Tratamiento de neoplasias mieloproliferativas | 35 |
| 2.3.6. Métodos de detección para el estudio de <i>JAK2V617F</i> | 38 |
| A) Secuenciación Directa de ADN | 38 |
| B) PCR específico de alelo | 40 |
| C) PCR en tiempo real y curva de fusión de ADN | 40 |
| D) Polimorfismos en Fragmentos Largos de Restricción (RFLP) | 42 |
| E) Pirosecuenciación | 43 |
| F) Otras técnicas para la detección de mutaciones | 44 |
| 3. Objetivos | 45 |
| A) Generales | 45 |
| B) Particulares | 45 |
| 4. Desarrollo experimental | 46 |
| 4.1 Material y métodos | 46 |
| 4.2 Pacientes. | 46 |
| 4.3 Muestras | 47 |

| | |
|--------------------------------------------------|----|
| 4.4 Extracción de ADN y evaluación de la calidad | 47 |
| 4.4.1 Métodos de extracción | 47 |
| A) Automatizado | 47 |
| B) Salino | 48 |
| C) Orgánico | 49 |
| 4.3.2. Evaluación de la Calidad | 50 |
| A) Cualitativo | 50 |
| B) Cuantitativo | 50 |
| 4.5 Estandarización del PCR específico de alelo | 51 |
| 4.6 Estandarización del PCR acoplado a RFLP | 52 |
| 4.7 Purificación | 54 |
| 4.8 Secuenciación | 55 |
| 5. Resultados | 56 |
| 6. Discusión | 64 |
| 7. Conclusiones | 70 |
| 8. Referencias | 71 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1.- Clasificación de las Neoplasias Mieloides. | 13 |
| Tabla 2.- Clasificación de las NMP clásicas y las principales células afectadas. | 15 |
| Tabla 3.- Criterios en el diagnóstico de PV, TE y MFP. | 15 |
| Tabla 4.- Miembros de la familia <i>JAK</i> y sus principales características. | 22 |
| Tabla 5.- Incidencia y porcentaje reportados por investigadores para la mutación <i>JAK2V617F</i> en NMPs. | 30 |
| Tabla 6.- Reactivos y cantidades de la reacción de PCR específico de alelo. | 51 |
| Tabla 7.- Reactivos y cantidades de la reacción de PCR simple. | 53 |
| Tabla 8.- Reactivos y cantidades de la reacción de restricción con <i>BsaXI</i> . | 53 |
| Tabla 9.- Tipo de muestra y anticoagulante usados. | 56 |
| Tabla 10.- Método de extracción de ADN efectuado. | 57 |
| Tabla 11.- Datos de pacientes con NMP (<i>BCR-ABL</i> +/ <i>JAK2V617F</i> +). | 58 |
| Tabla 12.- Datos de pacientes con NMP (negativos para <i>BCR-ABL</i>). | 61 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.- Algoritmo para el diagnóstico por sospecha de Policitemia Vera (PV). | 17 |
| Figura 2.- Algoritmo diagnóstico por sospecha de trombocitemia esencial (TE). | 18 |
| Figura 3.- Algoritmo diagnóstico por sospecha de mielofibrosis primaria (MFP). | 18 |
| Figura 4.- Algoritmo diagnóstico para eosinofilia primaria. | 20 |
| Figura 5.- Dominios estructurales de JAK2. | 24 |
| | |
| Figura 6.- Estructura propuesta para JAK2. | 24 |
| Figura 7.- Vía de señalización JAK-STAT y activación de JAK2 por mutaciones. | 26 |
| Figura 8.- Modelo del desarrollo jerárquico hematopoyético. | 29 |
| Figura 9.- Diagrama esquemático de la estructura genética y las mutaciones en <i>JAK2</i> . | 33 |
| Figura 10.- Electroferogramas para la detección de <i>JAK2V617F</i> . | 39 |
| Figura 11.- Curva de fusión para la detección de <i>JAK2V617F</i> . | 41 |
| Figura 12.- Sitios de reconocimiento para la endonucleasa de restricción en el gen <i>JAK2</i> que puede ser usado para la detección de la mutación <i>JAK2V617F</i> . | 42 |
| Figura 13.- Principio esquemático de la pirosecuenciación. | 43 |
| Figura 14.- Diagrama esquematizado del proceso automatizado para la extracción de ADN. | 47 |
| Figura 15.- Diagrama esquematizado del proceso salino para la extracción de ADN. | 48 |
| Figura 16.- Diagrama esquematizado del proceso orgánico para la extracción de ADN | 49 |
| Figura 17.- Purificación automatizada de ADN. | 54 |
| Figura 18.- ADN genómico de alto peso molecular visualizado por electroforesis en gel de agarosa. | 56 |
| Figura 19.- Pacientes con LMC positivos para la mutación <i>JAK2V617F</i> . | 58 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 20.- Fragmento del electroferograma de <i>JAK2</i> del paciente #1 BCR-ABL+/ <i>JAK2V617F</i> + | 59 |
| Figura 21.- PCR específico de alelo. | 60 |
| Figura 22.- PCR acoplado a RFLP. | 60 |
| Figura 23.- Mutación <i>JAK2V617F</i> en pacientes con NMPs (negativos para BCR-ABL). | 61 |
| Figura 24.- Distribución de género en pacientes positivos para <i>JAK2V617F</i> . | 62 |
| Figura 25.- Fragmento de los electroferogramas de <i>JAK2</i> en NMPs. | 62 |
| Figura 26.- Fragmento del electroferograma de <i>JAK2</i> en un NMP negativo para <i>JAK2V617F</i> . | 63 |

ABREVIATURAS

ATP: Trifosfato de Adenosina.

DMP: Desorden Mieloproliferativo.

EEC: Colonias Eritroides Endógenas.

EM: Enfermedad de Mastocitos.

EMP: Enfermedad Mieloproliferativa.

EMPC: Enfermedad Mieloproliferativa Crónica.

Epo: Eritropoyetina.

EpoR: Receptor de Eritropoyetina.

FGFR1: Gen para el Receptor 1 del Factor de Crecimiento de Fibroblastos.

FIP1L1: Gen FIP1 *like*-1

FISH: Hibridación *in situ* con Fluorescencia.

GM-SCF: Factor Estimulante de Colonias Granulocito/Macrófago.

Hb: Hemoglobina.

Ht: Hematocrito.

ICT: Inhibidores Cinasa de Tirosina.

IDCS: Inmunodeficiencias Combinadas Severas.

IFN: Interferón.

IGF-I: Factor de Crecimiento Similar a la Insulina.

IL: Interleucina.

LDH: Lactato Deshidrogenasa.

LEC: Leucemia Eosinofílica Crónica.

LMA: Leucemia Mieloide Aguda.

LMC: Leucemia Mieloide Crónica.

LMCa: Leucemia Mieloide Crónica Atípica

LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crónica.

LMMJ: Leucemia Mielomonocítica Juvenil.

LNC: Leucemia Neutrofílica Crónica.

LOH: Pérdida de Heterocigosidad.

MFP: Mielofibrosis Primaria.

MS: Mastocitosis Sistémica.

NMC: Neoplasia Mieloide Crónica.

NMP: Neoplasia Mieloproliferativa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PC: Proteína Cinasa.

PCT: Proteína Cinasa de Tirosina.

PDGFRA: Receptor Alfa del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

PDGFRB: Receptor Beta del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

Ph: Cromosoma Filadelfia.

PV: Policitemia Vera.

RFLP: Polimorfismos en Fragmentos Largos de Restricción.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a Transcripción Reversa

SMD: Síndrome Mielodisplásico.

SHE: Síndrome Hipereosinofílico.

SHP-I: Fosfatasas de Tirosina en Proteínas

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido

SOCS: Supresores de la Señalización de Citocinas

STAT: Transductores de Señal y Activadores de Transcripción.

TE: Trombocitemia Esencial.

Tpo: Trombopoyetina.

TpoR: Receptor de Trombopoyetina.

UPD: Disomía Uniparental Adquirida.

1. RESUMEN

Las neoplasias mieloproliferativas (NMPs) son un grupo heterogéneo de enfermedades hematopoyéticas de origen clonal caracterizadas por la proliferación descontrolada de células mieloides con alteraciones en la maduración. La Organización Mundial de la Salud (OMS) las clasifica en ocho entidades, de las que PV, TE y MFP están muy relacionadas a nivel clínico y genético.

Las mutaciones en el gen *JAK2*, localizado en el cromosoma 9p24 y que codifica para una cinasa de tirosina involucrada en la activación de receptores, afectan procesos celulares; la mutación de mayor relevancia en NMPs clásicos y negativos para *BCR-ABL* es *JAK2V617F* debido a su incidencia elevada y por generar sobrelape fenotípico.

La mutación *JAK2V617F*, generada por una transversión de guanina por timina en el ADN, conduce a un cambio del aminoácido valina por fenilalanina en la proteína y aunque no todos los pacientes la poseen, su identificación se considera un criterio mayor para el diagnóstico por su incidencia y por considerar a *JAK2* un blanco potencial para la terapia.

En este trabajo, se estandarizaron los métodos de PCR específico de alelo y PCR-RFLP para la detección de *JAK2V617F* en muestras de pacientes mexicanos con sospecha clínica de NMPs con el propósito de implementarlas como pruebas complementarias al diagnóstico y determinar su incidencia en nuestra población.

Se incluyeron muestras de médula ósea y de sangre periférica para la extracción del ADN genómico por tres métodos distintos, se evaluó la calidad y cantidad (electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría a 260nm). El producto viable fue sometido a los ensayos mencionados, de forma repetitiva y consecutiva, bajo diferentes condiciones para su estandarización, usando un blanco de agua y controles negativos de personas sanas.

Algunos fragmentos amplificados se purificaron (método automatizado) y se secuenciaron. Mediante los electroferogramas se corroboraron los resultados generados por las técnicas estandarizadas y los casos positivos (por PCR específico de alelo, PCR-RFLP's y secuenciación) fueron usados posteriormente como controles positivos.

Se encontró una incidencia global para *JAK2V617F* del 29% en NMPs clásicos negativos para *BCR-ABL* y del 8% para pacientes con LMC y se pretende continuar con esta investigación en una población mayor.

1. MARCO TEÓRICO

2.1. CLASIFICACIÓN

2.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.

En 1951, William Dameshek fue el primero en dar a conocer el concepto de “desórdenes mieloproliferativos” (DMP) considerando dentro de este grupo a la leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria (MFP) y eritroleucemia (síndrome de Di Guglielmo o leucemia eritroide aguda) ^[1, 2, 3].

Fue hasta 2001 cuando el comité de la OMS dio a conocer la clasificación de las neoplasias mieloides asignando a los DMP bajo la categoría de enfermedades mieloproliferativas crónicas (EMPC). Las EMPC se consideraron una de las cuatro categorías principales de neoplasias mieloides crónicas (NMC) junto con los síndromes mielodisplásicos (SMD), la entidad combinada de síndrome mielodisplásico/enfermedad mieloproliferativa (SMD/EMP) y la mastocitosis. Dentro de las EMPC se incluyó a la leucemia neutrofílica crónica (LNC), leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico (LEC/SHE) y EMPC atípicas ^[1,4].

Ahora se sabe que estas EMPC se deben a la presencia de derivados clonales en células progenitoras y que su diversidad fenotípica es atribuida a las diferencias en la transducción de señales anormales generadas por mutaciones que afectan moléculas con actividad de cinasa de tirosina u otras relacionadas. Inicialmente el criterio diagnóstico y de clasificación para estos desórdenes sólo se basaba en la histología; ahora el empleo de marcadores moleculares, permiten el refinamiento de estos criterios ^[1].

En 2008, se dio a conocer la clasificación aplicada en la actualidad para el diagnóstico de EMPC y conocidas ahora como neoplasias mieloproliferativas (NMP) ^[1,5]. Sin embargo, los criterios de clasificación se encuentran en modificación continua para facilitar la identificación de cada padecimiento.

2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS [WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2008].

En 2001, la OMS expuso cuatro categorías de neoplasias mieloides crónicas ^[1, 4, 6]:

- 1.- Enfermedades mieloproliferativas crónicas (EMPC).
- 2.- Síndromes mielodisplásicos (SMD).
- 3.- Síndromes mieloproliferativos/Enfermedades mieloproliferativas (SMD/EMP)
- 4.- Mastocitosis.

En 2008 se modificó y se dio a conocer el sistema de clasificación usado en la actualidad, reemplazando la palabra enfermedad (EMPC y SMD/EMP) por “neoplasia”. Así, el término EMPC se denomina neoplasia mieloproliferativa (NMP) y el SMP/EMD se nombra síndrome mielodisplásico/neoplasia mieloproliferativa (SMD/NMP). Los detalles de dicha clasificación se muestran en la Tabla 1 ^[1, 4].

Tabla 1.- Clasificación de las Neoplasias Mieloides (WHO, 2008) ^[1].

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Leucemia Mieloide Aguda (LMA) |
| 2. Síndromes Mielodisplásicos (SMD) |
| 3. Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) |
| 3.1. Leucemia Mieloide Crónica (LMC) (<i>BCR-ABL</i> positiva) |
| 3.2. Policitemia Vera (PV) |
| 3.3. Trombocitemia Esencial (TE) |
| 3.4. Mielofibrosis Primaria (MFP) |
| 3.5. Leucemia Neutrofilica Crónica (LNC) |
| 3.6. Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) |
| 3.7. Síndrome Hipereosinofílico (SHE) |
| 3.8. Enfermedad de Mastocitos (EM) |
| 3.9. NMPs no clasificados |
| 4. Síndrome Mielodisplásico/Neoplasia Mieloproliferativa (SMD/NMP) |
| 4.1. Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC) |
| 4.2. Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) |
| 4.3. Leucemia Mieloide Crónica Atípica (LMCa) (<i>BCR-ABL</i> negativa) |
| 4.4. SMD/NMP no clasificados |
| 5. Neoplasias Mieloides asociadas a eosinofilia y rearreglos anormales. |
| 5.1. Neoplasia mieloides asociada al rearreglo <i>PDGFRA</i> |
| 5.2. Neoplasia mieloides asociada al rearreglo <i>PDGFRB</i> |
| 5.3. Neoplasia mieloides asociada al rearreglo <i>GFR1</i> (Síndrome Mieloproliferativo 8p11) |

2.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

2.2.1. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMPs)

Las NMPs son un amplio espectro de desórdenes clonales, generalmente crónicos, que se originan en progenitores del sistema hematopoyético; se cree que la célula iniciadora es un progenitor oligopotente de la línea mieloide (Figura 8). En la mayoría de los casos, las causas de estos padecimientos son desconocidas, pero se considera un factor de riesgo la exposición a radiación ionizante. [7, 8 9, 10].

Las manifestaciones clínicas se deben al tipo principal de células maduras afectadas que presentan alteraciones en su crecimiento y proliferan en ausencia de factores de crecimiento hematopoyéticos externos, los megacariocitos en médula son hiperplásicos y generan mielofibrosis con complicaciones trombóticas y hemorrágicas. Los pacientes acuden a atención médica debido a coincidencias, como el conteo anormal celular en consulta de rutina o por signos y síntomas relacionadas con la expansión celular del sistema hematopoyético (por ejemplo, esplenomegalia) [7, 11].

Uno de los riesgos de estos padecimientos es su evolución a leucemia mieloide aguda (LMA) donde el desarrollo hematopoyético es bloqueado en etapas tempranas de diferenciación generando la acumulación de blastos mieloides pobremente funcionales a costa de una disminución crítica de células blancas y plaquetas; esto lleva a una tasa alta de morbilidad y mortalidad por infecciones con complicaciones hemorrágicas. Si la NMP no progresa, el paciente cursa por fibrosis medular, disipación celular y complicaciones eventuales en uno o más sitios extramedulares (bazo, hígado) y disminución en el conteo sanguíneo por la fibrosis medular [7, 11].

Un evento común en las NMPs es la activación de cinasas de tirosina; como signo patognomónico de LMC, por ejemplo, se encuentra la fusión genética *BCR-ABL* con actividad cinasa de tirosina aumentada que activa vías proliferativas y antiapoptóticas y en la que los inhibidores cinasa de tirosina (ICT) pueden revertir marcadamente la historia natural de la enfermedad. Otro ejemplo son las lesiones moleculares responsables de PV, TE y MFP, como las mutaciones en los genes *JAK2* y *MPL*, descubiertas y estudiadas recientemente, y para las que el tratamiento farmacológico específico se encuentra en fases clínicas de estudio [7].

A) NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CLÁSICAS

Las NMPs clásicas son: LMC (*BCR-ABL+*), PV, TE y MFP; la característica fenotípica más prominente es la producción excesiva de células sanguíneas diferenciadas (Tabla 2); sin embargo, su distinción no siempre es evidente debido a que la mayoría de las características clínicas de estas tres entidades son compartidas. Por esta razón, deben tomarse en cuenta los criterios diagnósticos establecidos en 2008 por la WHO en la que se hace énfasis en el estudio histológico (Tabla 3) [1, 7, 12].

Tabla 2.- Clasificación de las NMPs clásicas y las principales células afectadas^[7].

| DESORDEN MIELOPROLIFERATIVO | CÉLULA PRIMARIA INVOLUCRADA |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Leucemia Mieloide Crónica | Célula progenitora mieloide |
| Policitemia Vera | Eritrocitos |
| Trombocitosis Esencial | Plaquetas |
| Mielofibrosis Primaria | Monocitos |

Tabla 3.- Criterios en el diagnóstico de PV, TE y MFP (WHO, 2008)^[1]

| Enfermedad | Criterio Principal | Criterios Secundarios |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Policitemia Vera ^a | 1.- Hb>18.5g/dL (hombres), >16.5g/dL (mujeres) ó Hb o Ht>99 percentiles en el rango de referencia de edad, sexo o altitud de residencia ó Hb>17g/dL-1 (hombres), >15g/dL (mujeres). Si se asocia con aumento sostenido de ≥2g/dL sobre la línea base, no atribuible a deficiencia de hierro, ó masa elevada de glóbulos rojos >25% sobre el valor normal. 2.-Presencia de la mutación V617F u otra similar. | 1.- Mieloproliferación trilineal en médula ósea. 2.- Bajos niveles de eritropoyetina sérica. 3.- Crecimiento de colonias eritroides endógenas (EEC) |
| Trombocitemia Esencial ^a | 1.- Conteo plaquetario ≥450X10 ⁹ /L 2.- Proliferación de megacariocitos largos y maduros. Ausencia o escases de proliferación eritroidea o granulocítica. 3.- Presencia de la mutación V617F u otro marcador clonal o sin evidencia de trombocitosis reactiva. | |
| Mielofibrosis Primaria ^a | 1.- Proliferación de megacariocitos atípicos ^b acompañada de reticulina y/o fibrosis de colágena ó en ausencia de fibrosis colágena, los cambios en megacariocitos se acompañan de aumento en la celularidad medular, proliferación granulocítica y frecuentemente disminución en la eritropoyesis (es decir, MFP prefibrótica) 2.- Ausencia de criterios conocidos para LMC, PV, SMD u otra neoplasia mieloide. 3.- Presencia de V617F u otro marcador clonal o sin evidencia de fibrosis de médula reactiva. | 1.-Leucoeritroblastosis 2.- Aumento sérico de LDH 3.- Anemia 4.- Esplenomegalia palpable. |

^aEl diagnóstico de PV requiere la reunión al menos dos criterios principales y al menos uno de los secundarios o el primer criterio principal y al menos 2 criterios secundarios. El diagnóstico de TE requiere la reunión de los cuatro criterios principales. El diagnóstico de MFP requiere la reunión de los tres criterios principales y dos criterios secundarios.

^bMegacariocitos de pequeños a grandes con proporción aberrante núcleo/citoplasma e hipercromáticos; morfología nuclear anormal y plegada con alta densidad. Hb=hemoglobina. Ht=Hematocrito. LDH=Lactato deshidrogenasa.

LMC: Se caracteriza por tres fases. En la crónica, el dato con mayor relevancia es la leucocitosis (granulocitos, principalmente neutrófilos) de $40-300 \times 10^9/L$ también se presenta basofilia, eosinofilia, trombocitosis y variaciones del hematocrito. En la acelerada, hepatoesplenomegalia marcada y fibrosis en médula ósea. En la fase blástica se presenta infiltración de médula ósea por blastos a sangre periférica en más del 30% de los casos [13, 14, 15]. Para su diagnóstico se cuenta con el marcador patognomónico de la enfermedad, la $t(9;22)(q34;q11)$ que es identificado mediante citogenética convencional y el gen de fusión generado *BCR-ABL* que se identifica por técnicas moleculares como es la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa (RT-PCR).

PV: Afecta, principalmente, a personas entre 40 y 60 años de edad, con una prevalencia de 14 por cada millón de la población [16]. Los criterios señalados en la Tabla 2 permiten un diagnóstico temprano, frecuentemente antes de esplenomegalia, leucocitosis y masa elevada de células rojas sanguíneas; en más del 15% de los pacientes ocurre una fase pre-policitémica con trombocitosis. Los valores de hemoglobina o hematocrito elevados no siempre se relacionan directamente con el aumento en masa de células rojas; que por otro lado, puede enmascararse con valores de hematocrito aparentemente normales debido al aumento en el volumen plasmático, especialmente por esplenomegalia marcada. De esta forma, es importante la evaluación en niveles séricos de eritropoyetina (Epo) [1, 4, 11].

TE: Su diagnóstico requiere de la exclusión de otras causas sostenidas de trombocitosis (Tabla 2). Debe señalarse que la mutación *JAK2V617F* y en el gen que codifica para el receptor de trombopoyetina, *MPL* se presentan en aproximadamente el 50% y el 5% de los pacientes, respectivamente. Sin embargo, esto permite obviar la exclusión extensiva de causas reactivas de fibrosis. Para mielofibrosis post-TE los criterios diagnósticos están dados, lo que permite distinguir mielofibrosis post-TE de MFP [4].

MFP: Como en TE, debe considerarse la incidencia de las mutaciones *JAK2V617F* y en *MPL*, es importante adoptar una medición semicuantitativa de fibrosis en médula ósea en un intervalo de MF-0 (normal) a MF-3 (osteosclerosis) [4].

En pacientes con sospecha de PV, es imprescindible la evaluación de Epo sérica para minimizar obtención de resultados falsos en las pruebas moleculares y para la detección de la poco frecuente pero posible PV negativa para la mutación *JAK2V617F*. Para pacientes en éste último caso y que presentan niveles de Epo sérica sub-óptimos, debe considerarse la búsqueda de mutaciones en el exón 12 de *JAK2* y la exploración celular en médula ósea ^[1] (Figura 1).

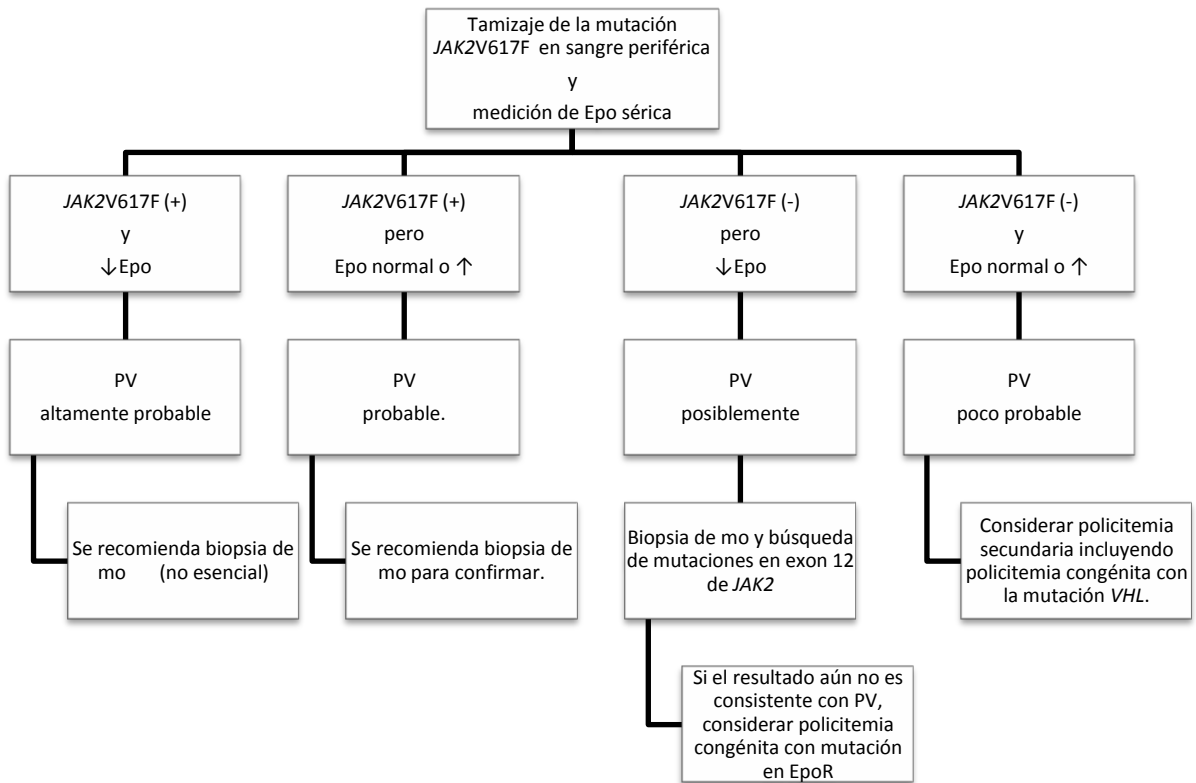


Figura 1.- Algoritmo para el diagnóstico por sospecha de Policitemia Vera (PV) ^[1].

Epo=Eritropoyetina. EpoR= Receptor de Eritropoyetina. mo=Médula ósea. VHL= von Hippel-Lindau

Debido a que la mutación *JAK2V617F* también se presenta en aproximadamente el 50% de pacientes con TE y MFP, es razonable incluir su detección en el diagnóstico de estos padecimientos en presencia de trombocitemia y fibrosis de médula ósea. La detección excluye la posibilidad de mieloproliferación reactiva pero, su ausencia no excluye la presencia de algún NMP; destacando así que, se requiere la exploración de morfología celular en médula ósea para establecer el diagnóstico de TE y MFP ^[1, 4].

Es importante señalar que debe descartarse la presencia de LMC antes de discernir entre TE y MFP especialmente en ausencia de la mutación *JAK2V617F*. Para ello, se requieren estudios citogenéticos en médula ósea para TE y MFP; así como estudios moleculares y de FISH para la detección de *BCR-ABL* en ausencia del cromosoma Filadelfia para descartar LMC ^[1] (Figuras 2 y 3).

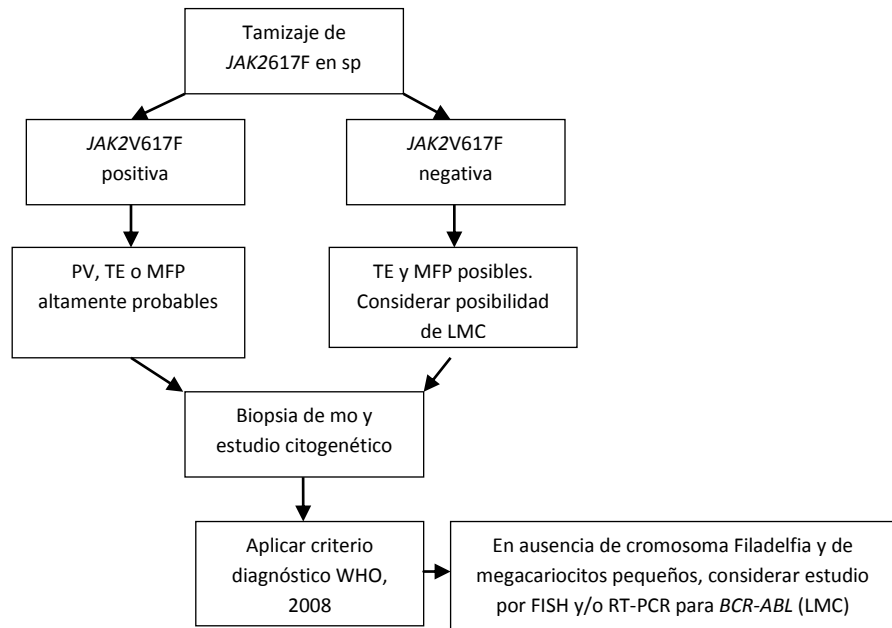


Figura 2.- Algoritmo diagnóstico por sospecha de trombocitemia esencial (TE) [1]. sp= sangre periférica. PV=policitemia vera. MFP=mielofibrosis primaria. LMC=leucemia mieloide crónica. FISH= hibridación *in situ* de fluorescencia. mo= médula ósea.

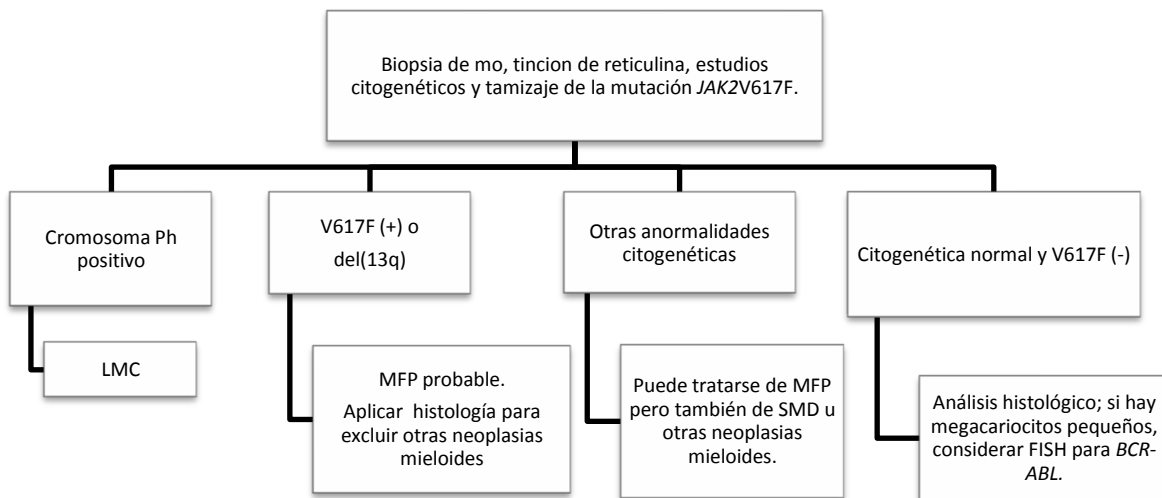


Figura 3.- Algoritmo diagnóstico por sospecha de mielofibrosis primaria (MFP) [1]. mo= médula ósea. Ph= Cromosoma Filadelfia. LMC=leucemia mieloide crónica. del=delección. SMD=Síndrome mielodisplásico. FISH= hibridación *in situ* de fluorescencia

B) NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS NO- CLÁSICAS.

El diagnóstico de NMPs no-clásicas (LEC, SHE, LNC, EM y NMP no-clasificadas) requiere, en general, la ausencia de BCR-ABL, diseritropoyesis, displasia granulocítica o monocitosis ($\geq 1 \times 10^9/L$) [4].

LEC: Se trata de un grupo limitado con casos de proliferación clonal de precursores hematopoyéticos y que resultan en eosinofilia persistente como anomalía hematológica dominante; en la actualidad, no se tienen marcadores genéticos relevantes. El criterio clínico y morfológico no ha variado con el tiempo (Figura 4). Para los casos sin demostración de clonalidad, el síndrome hipereosinofílico (**SHE**) idiopático es el principal en el diagnóstico diferencial [4].

LNC: Es considerada cuando el conteo de leucocitos en sangre periférica es $\geq 25 \times 10^9/L$, $>80\%$ de neutrófilos segmentados o bandeados, $<10\%$ de granulocitos inmaduros y $<1\%$ de mieloblastos ($<5\%$ de blastos en médula ósea). Cuando se sospecha de **EM** debe considerarse tinción de triptasa, citometría de flujo de mastocitos anormales CD25+ de médula ósea y, si es posible, la búsqueda de la mutación *KITD816V*. El diagnóstico puede llevarse a cabo en presencia de agregados en médula ósea, de mastocitos anormales morfológicamente o cuando la histología es confusa. Las **NMPs no-clasificadas** son consideradas cuando el fenotipo clínico no reúne los criterios diagnósticos para clasificarlas como clásicas [4].

EM: Primero fue considerada un desorden hematopoyético ya que su naturaleza neoplásica clonal no se había demostrado. Con el descubrimiento de mutaciones puntuales de activación en el gen *KIT* (D816V), ahora se reconoce como NMP. Las entidades clínicas consisten en mastocitosis de médula ósea y sistémica (MS) como subtipos de MS indolente, linfadenopática con eosinofilia (si se excluye el rearrreglo del gen que codifica para el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas, *PDGFRA*) como parte de mastocitosis agresiva, y MS con asociación hematológica clonal a enfermedades de líneas celulares distintas a las de mastocitos, ahora son aceptadas como variantes definitivas. Es de importancia clínica la resistencia de la mutación *KITD816V* al inhibidor de cinasas, Imatinib® [4].

La detección de eosinofilia primaria requiere la exploración en médula ósea mediante tinción de triptasa, estudio de clonas en células T e inmunofenotipificación, estudios citogenéticos y moleculares para la detección de *FIP1L1-PDGFR* (gen *FIP1 like-1*-gen del receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas); estos deben ser capaces de distinguir neoplasias mieloides asociadas con eosinofilia y **SHE**. La última categoría incluye los rearrreglos de los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* (receptor beta de plaquetas derivado del factor de crecimiento) y *FGFR1* (receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos) de neoplasias mieloides asociados con eosinofilia. En ausencia de éstos marcadores

moleculares, LEC y SHE deben ser considerados; el diagnóstico de ambos requiere conteo eosinofílico con presencia de $\geq 1.5 \times 10^9/L$ en sangre periférica, exclusión de eosinofilia secundaria, exclusión de alguna otra neoplasia mieloide aguda o crónica, y sin evidencia de anomalías fenotípicas y/o linfocitos T clonales. Además, el diagnóstico de **SHE** requiere ausencia de anomalías citogenéticas y $>2\%$ de blastos periféricos o $>5\%$ de blastos en médula ósea (**Figura 4**)^[1, 5].

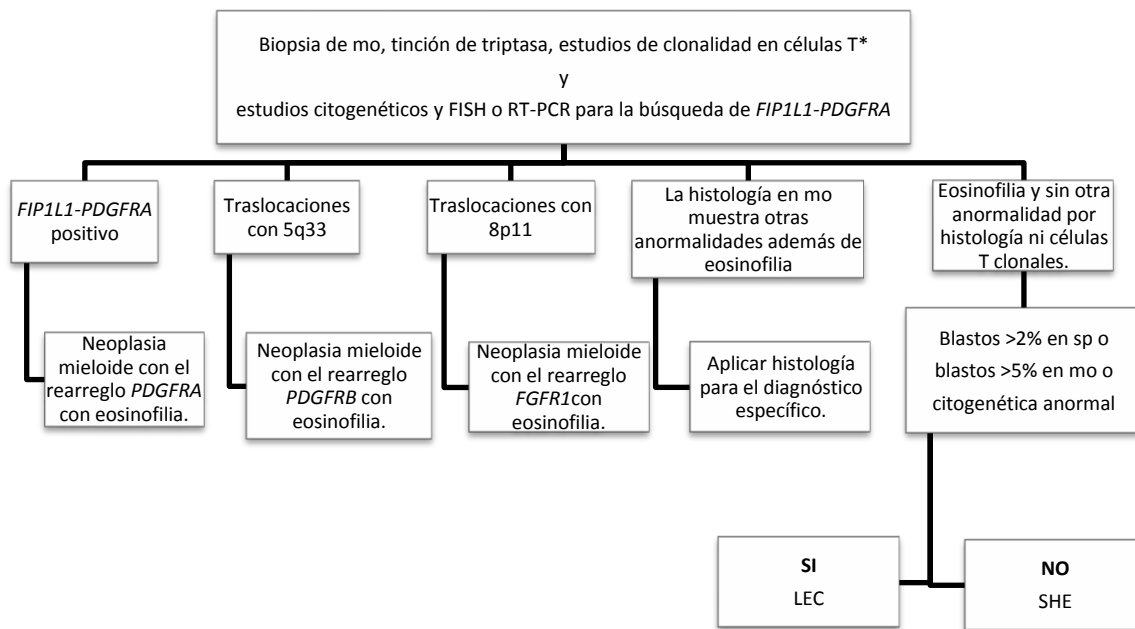


Figura 4.- Algoritmo diagnóstico para eosinofilia primaria (conteo de eosinófilos $\geq 1.5 \times 10^9/L$)^[1].
mo= médula ósea. FISH= hibridación *in situ* de fluorescencia. LEC=leucemia eosinofílica crónica.
SHE=síndrome hipereosinofílico.

2.3. BIOLOGÍA MOLECULAR

2.3.1. FAMILIA DE GENES *JAK*.

Todas las células poseen sistemas de señalización altamente especializados desde la superficie celular hasta el interior, esto permite la generación de respuestas adecuadas para efectuar procesos simultáneos de activación, represión y regulación de una gran variedad de moléculas de señalización ^[18].

Las denominadas proteínas cinasas (PC) son enzimas que catalizan la fosforilación de otras proteínas y de ellas mismas; mientras que, las fosfatasa regulan la actividad de PC mediante desfosforilación de proteínas. Las proteínas cinasa de tirosina (PCT) son PC que catalizan la transferencia de un grupo γ - fosfato del ATP (trifosfato de adenosina) a los grupos hidroxilo de residuos de tirosina específicos en la transducción de señales moleculares ^[19].

En humanos, la familia de genes que codifican para cinasas *Janus* o *Jak* se localizan en el brazo corto del cromosoma 9 (9p24) y se compone de 4 miembros: *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y *TYK2* el principal papel fisiológico de las proteínas consiste en iniciar la transducción de señales mediante receptores de la superfamilia de citocinas (Tabla 4). Estructuralmente, la familia se caracteriza por tener dos dominios similares encarados en direcciones opuestas. El origen de su nombre se debe a que *Janus* (*ianua*) es el dios romano de entradas y puertas -el inicio y el final- y es representado con dos cabezas colocadas en dirección opuesta, bifrontales (dos frentes, dos caras) ^[18, 19, 20,21].

Las proteínas *Jak* se caracterizan por presentar siete dominios homólogos llamados JH con tamaños de 120 a 130 kDa, la interacción física con las regiones citoplasmáticas cercanas a la membrana está dada por su dominio FERM (Figura 5). Mediante activación, las cinasas *JAK* pueden autofosforilarse y fosforilar cadenas del receptor y sustratos que son reclutados en el complejo de señalización; un ejemplo de sustratos comunes son las proteínas miembros de la familia de transductores de señal y activadores de transcripción (*STAT*) ^[20, 21].

JAK1 juega un papel importante en la respuesta biológica para miembros de la familia de receptores de IL6, IL2 (interleucinas 6 y 2) e IFN/IL10 (interferón/interleucina 10), se ha demostrado que su deficiencia resulta en pérdida de función de la mayoría de los receptores de IL-6. Algunas mutaciones en *JAK3* se asocian con inmunodeficiencias severas combinadas; mientras que la deficiencia de *JAK3* afecta a receptores de IL-2. La pérdida de *Tyk2* resulta en disminución parcial en la señalización por interferón α/β y mayor para la señalización por IL-12. ^[18, 19, 20, 21].

Desde el descubrimiento en 1960 del primer marcador genético específico de cáncer, el cromosoma Filadelfia (Ph) en LMC, se han empleado otros marcadores moleculares en leucemias y NMPs. La activación de *JAK* está implicada frecuentemente en transformación oncogénica y traslocaciones cromosómicas humanas resultando en la activación del gen *JAK2*. En 2005 varios grupos de investigación reportaron el descubrimiento de la mutación V617F que afecta al gen *JAK2* y que se presenta de forma adquirida en una alta proporción de pacientes con PV y otros desórdenes mieloides [19, 20].

Tabla 4.- Miembros de la familia *JAK* y sus principales características [20].

| Miembro de la familia | <i>JAK1</i> | <i>JAK2</i> | <i>JAK3</i> | <i>TYK2</i> |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Otros nombres | Janus cinasa 1 | Janus cinasa 1 | Janus cinasa 1 | Cinasa de tirosina 2 |
| PM/Datos estructurales | 132 kDa, 1142 aa | 131 kDa, 1132 aa | 125 kDa, 1124 aa | 134 kDa 1182 aa |
| Isoformas | Desconocidas | Desconocidas | JAK3M, JAK3B, JAK3S | Desconocidas |
| Especies | Vertebrados, mamífero, rata, ratón, metazoa, plantas, fungi, <i>Drosophila</i> | | | Humano, ratón |
| Dominios de organización | 7 dominios homólogos JH, 1 dominio cinasa JH1, 1 dominio pseudocinasa JH2 | | | |
| Sitios de fosforilación | Tyr ¹⁰²² , Tyr ¹⁰²³ , Tyr ¹⁰³³ | Tyr ¹⁰⁰⁷ , Tyr ¹⁰⁰⁸ | Tyr ¹⁰³³ , Tyr ⁹⁸⁰ , Tyr ⁹⁸¹ | Tyr ¹⁰⁵⁴ , Tyr ¹⁰⁵⁵ |
| Distribución en tejido | Ubicuo | Ubicuo | Hematopoyético | Ubicuo |
| Localización subcelular | Citoplasma | Citoplasma | Citoplasma | Citoplasma, núcleo |
| Patrones de unión/proteínas asociadas | Receptores de: citocinas y de factores de crecimiento | | Cadenas y comunes | Receptores de: citocinas y de factores de crecimiento |
| Activadores río arriba | IFN α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-6, OSM, IL-11, CT-1, CNTF, LIF, OSM, prolactina. | IFN γ , EPO, IL-3, IL-5, GM-CSF, IL-6, IL-11, CT-1, CNTF. | IL-2, IL-9, IL-15, IL-9, IL-15. | IFN α , IL-12, IL-13, IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1. |
| Activadores río abajo | STAT/múltiples vías | | | |
| Funciones fisiológicas | Relacionado con la vía de señalización de IFN $\alpha/\beta/\gamma$ | Transducción de señal por múltiples cinasas | Transducción de señales por familia de citocinas IL-2 | Participa en el inicio de señalización de IFN tipo I |
| Relevancia de la enfermedad | Tumorigénesis, leucemias, isquemia miocárdial | Eritropoyesis anormal, NMP, inmunosupresivas | Inmunodeficiencias severas combinadas, desórdenes linfoproliferativos | Enfermedades Inmunes. |

2.3.2. JAK2

2.3.2.1. GEN JAK2

El gen *JAK2* se localiza en el brazo corto del cromosoma 9p24, como ya se mencionó; y se compone por 25 exones que se extienden en aproximadamente 140 Kb correspondientes a 5402 pares de bases de pre-ARNm que por corte y empalme alternativo generan 6 transcritos diferentes que codifican para 4 isoformas proteicas [3, 22, 23].

2.3.2.2. PROTEÍNA JAK2

A) ESTRUCTURA.

La proteína Jak2 es una cinasa de tirosina citosólica acoplada a receptor que se localiza en la mayoría de los tejidos y está altamente conservada entre especies. Su tamaño es de 130 kDa aproximadamente y está constituida por 7 dominios homólogos altamente conservados, denominados JH; de éstos se reconocen cuatro regiones principales: (Figuras 5 y 6) [3, 11, 12, 18, 20, 21].

Región Cinasa: Se localiza en el dominio JH1, cerca del carboxilo terminal y posee actividad catalítica de cinasa de tirosina; lo que significa que puede fosforilar proteínas blanco en residuos de tirosina.

Región Pseudocinasa: Se localiza en el dominio JH2 y regula la actividad de la cinasa de tirosina (JH1) con la que comparte cierta homología pero la primera carece de algunos aminoácidos requeridos para la actividad cinasa. Se ha reportado que tiene función autoinhibitoria sobre su actividad cinasa. La mutación V617F se localiza en esta región.

Región SH2: Es el dominio de homología a Src y abarca JH3 a JH4 aproximadamente y es la región implicada con la interacción de diversos intermediarios de la señalización.

Región FERM (*four-point-one*, *e**zrin*, *r**adixin*, *m**oesin*): Abarca de JH5 a JH7, posee aproximadamente 300 aminoácidos y es responsable de la unión no covalente con el receptor en la juxtamembrana citoplasmática.

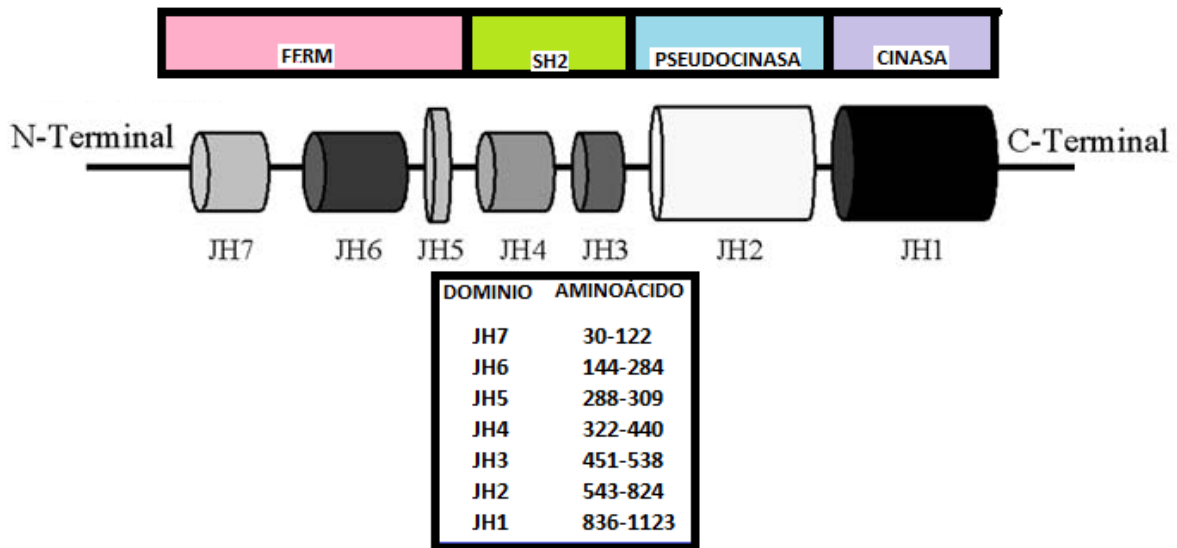


Figura 5.- Dominios estructurales de JAK2. Las cuatro regiones de actividad dentro de los siete dominios estructurales JH de Jak2. También se muestran los aminoácidos que cubre cada dominio ^[3, 18].

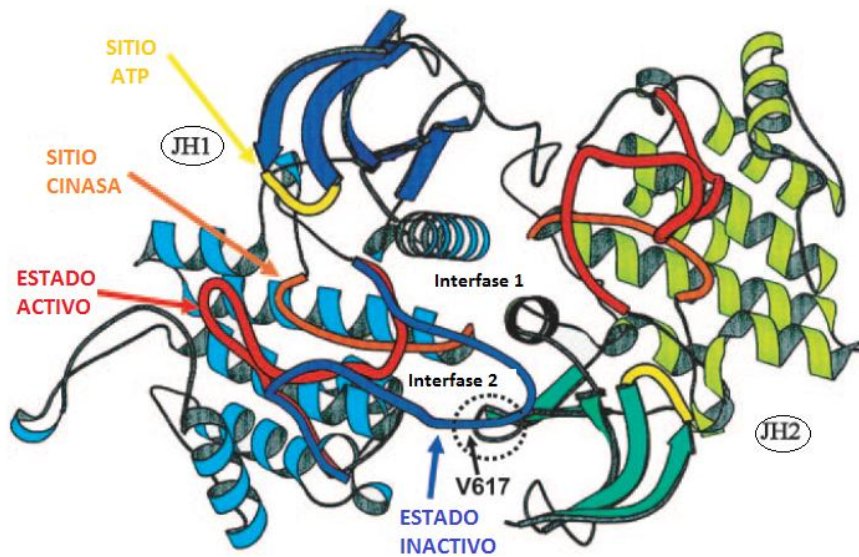


Figura 6.- Estructura propuesta para JAK2. JH1=Azul predominante, JH2=Verde predominante. Asa de activación de JH1 en sus dos posibles conformaciones: activa=rojo, inactiva=azul. Sitio cinasa=Anaranjado. Sitio de unión a ATP=Amarillo. En círculo punteado se muestra la localización de Val617 para la interacción de JH2 con JH1 ^[11].

B) FUNCIÓN.

JAK2 es un mediador en la señalización, por interacción de citocinas con sus receptores, que participa en la regulación de la expresión de genes. Por medio de la fosforilación, permite la activación de transductores de señales y activadores de transcripción (Stat); además es capaz de autofosforilarse y fosforilar simultáneamente otras proteínas requeridas en la señalización. Esto es posible por medio del dominio FERM en la región N-terminal de la proteína Jak2 que media la unión a receptores de citocinas ^[18, 19].

La activación de JAK2 dependiente de ligando no se limita a receptores de citocinas, también es posible por unión a receptores para factores de crecimiento como son eritropoyetina (Epo), factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-SCF), trombopoyetina (Tpo), IL-3 y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1); así como otros receptores con 7 dominios transmembranales a los que se unen sustancias como bradicinina, endotelina, factor activador plaquetario, hormona estimulante de α -melanocitos, isoproterenol, fenilefrina y la quimiocina CCL3 (Figura 7) ^[(3, 11, 12, 18)].

Además de su papel como mediador de la transcripción genética, JAK2 también participa como potenciador en la expresión del receptor de eritropoyetina (EpoR), sin requerir el dominio cinasa como se ha demostrado por ensayos *in vitro* ^[18].

JAK2 es una proteína involucrada en la vía de señalización JAK-STAT y el modelo aceptado actualmente, como mecanismo normal, implica la unión del ligando al complejo del receptor en la superficie celular con JAK en el dominio intracelular formando el complejo ligando-receptor-JAK2 que dimeriza y así es fosforilado por JAK2. El complejo fosforilado, a su vez, fosforila residuos específicos de tirosina en las colas citoplasmáticas del receptor, creando sitios para las proteínas Stat; que son fosforiladas por JAK en residuos de tirosina (STAT*c) que luego forma homodímeros (STAT*Dc) para ser trasladado al núcleo (STAT*Dn) donde ejerce la función de factor de transcripción mediante su unión a secuencias de reconocimiento de STAT en el ADN (Figura 7a) ^[12, 18, 24].

La regulación de la vía JAK-STAT está dada a distintos niveles: JAK2 es desfosforilada por fosfatasas de tirosina (ejm. SHP-1), degradada proteolíticamente mediante su unión con supresores de la señalización de citocinas (ej. SOCS-1); así como, inhibición de la unión ADN-Stat por inhibidores proteicos de STAT activadas (PIAS). La proteína SOCS puede bloquear directamente la actividad cinasa de la interacción Jak-Stat por unión a los residuos de fosfotirosina. En contraste, la señalización JAK-STAT es facilitada por ejemplo, por moléculas adaptadas a la transducción de señales, interacción de Stat con otras proteínas y por la familia AH2/Lnk/APS ^[22, 25, 26].

Dado que la vía JAK-STAT es esencial para la proliferación celular, supervivencia y apoptosis, las anomalías que afectan a sus moléculas miembros pueden asociarse a diferentes fenotipos de la enfermedad, como los padecimientos hematológicos. La relación se debe principalmente a la diferenciación dependiente e independiente de ligando; las mutaciones activantes en EpoR se han asociado con fosforilación constitutiva de JAK-STAT. Además, la deficiencia de JAK2 genera ausencia definitiva de eritropoyesis. Evidencias adicionales demuestran que la activación constitutiva de Stat3 ejerce sobre-regulación de elementos para el control negativo en el ciclo celular y abundancia en precursores eritroides de proteínas antiapoptóticas (ejm. BCL_{-XL}); esta última, mediante regulación negativa por inhibición inducida en JAK2 con AG490 [22].

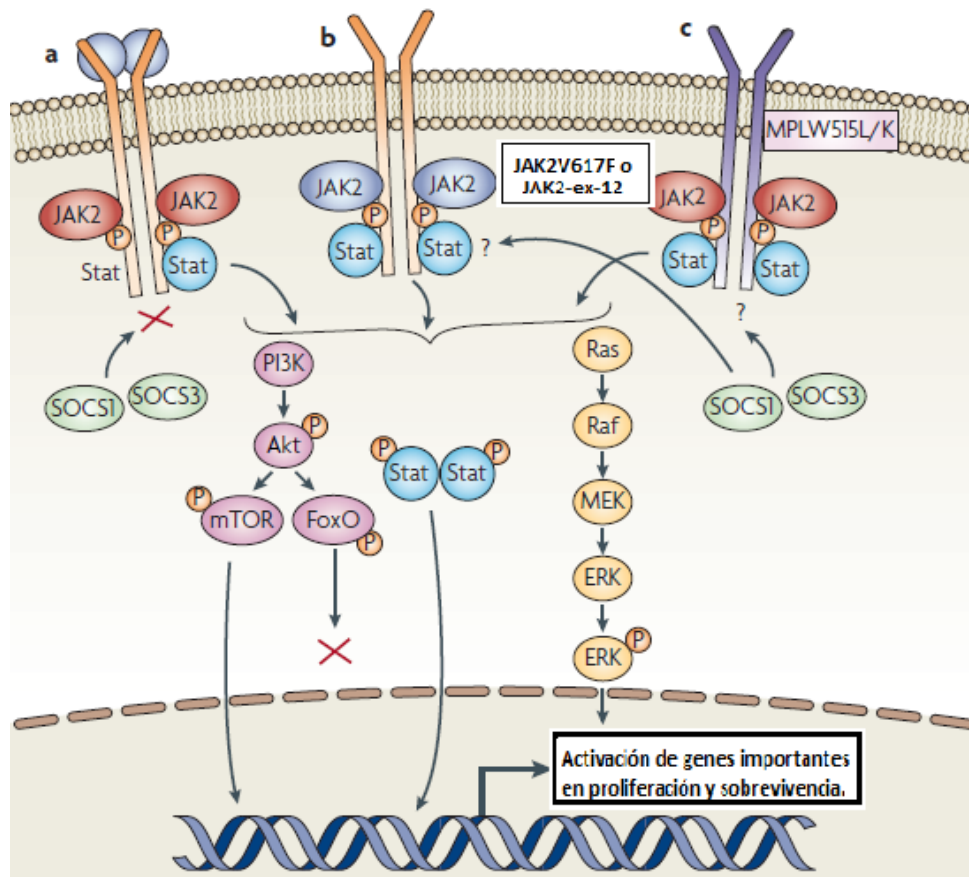


Figura 7.- Vía de señalización JAK-STAT y activación de JAK2 por mutaciones [12]. a) La unión normal de citocinas a sus receptores resulta en fosforilación de Jak2, reclutamiento transductores de señal y del activador de transcripción Stat, señalización y fosforilación proteica y activación río abajo de vías incluyendo factores de transcripción Stat, proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK) y la vía 3-cinasa fosfotidil inositol (PI3K)-Akt. b) las cinasas con mutación JAK2V617F y JAK2-ex12 se unen a receptores de citocina y son fosforiladas en ausencia de ligando generando activación independiente de ligando y activación en la señalización de las vías río abajo. c) En contraste, los receptores de trombopoyetina con la mutación MLPW515K/K son capaces de fosforilar Jak2 silvestre en ausencia de trombopoyetina, y resultando en activación de las vías de señalización río abajo de Jak2. La regulación negativa de la señalización Jak2 está mediada normalmente por supresores de la señalización de citocina (SOCS), principalmente SOCS1 y SOCS3; algunos datos indican que JAK2V617F no puede ser regulado por SOCS3.

2.3.3. MUTACIÓN JAK2V617F

A) DESCUBRIMIENTO

En 2005 se estableció la patogénesis molecular de PV, TE y MFP por varios grupos de investigación mediante la identificación de la mutación JAK2V617F como la anomalía molecular más común en la mayoría de pacientes con PV y en una proporción significativa de pacientes con MFP y TE. Las estrategias usadas se enfocaron en la secuenciación de gen *JAK2* y el estudio de los mecanismos implicados en la formación de colonias eritroides endógenas (EEC) [2, 3, 25, 27].

William Vainchenker y colaboradores [2], diseñaron un sistema de cultivo líquido para eritrocitos de pacientes con PV en el que demostraron crecimiento celular en ausencia de citocinas exógenas; entonces usaron moléculas con las que observaron que la inhibición de Jak2 conlleva a la inhibición en la proliferación eritroide. Mediante el análisis de siARN (ARN de interferencia pequeños) demostraron que la expresión de *JAK2* es requerida en la expansión celular en ausencia de citocinas y esto los condujo a la secuenciación de *JAK2* [2].

Robert Kralovics y Radek Skoda [2] encontraron que aunque la mayoría de los pacientes son heterocigotos para la mutación, algunos de ellos (principalmente con PV) son homocigotos para el alelo mutado. El grupo de Prchal demostró que, a diferencia de la mayoría de supresores de tumor en donde la pérdida de heterocigosidad (LOH) es el resultado de la delección en las copias remanentes del gen silvestre, en el cromosoma 9p24 es un evento que resulta de la recombinación mitótica en la que los pacientes poseen dos copias paternas o maternas generando duplicación del alelo mutado; a este fenómeno se le denomina disomía uniparental adquirida (UPD). Skoda y colaboradores secuenciaron los genes en la región de UPD e identificaron al alelo mutado, *JAK2V617F*. Ahora se sabe que, la UPD es el resultado en la ganancia de función de alelos homocigotos y que se encuentra presente en otros alelos oncogénicos como *FLT3* en LMA y *MPL* en MFP [2, 12].

Se ha efectuado la secuenciación de algunos genes candidatos involucrados en la señalización oncogénica de NMPs de los dominios conservados de todas las cinasas de tirosina, respectivamente; encontrando algunas mutaciones importantes en la patogénesis de estos padecimientos. Mediante el uso de herramientas genómicas de alta resolución como son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se ha facilitado el estudio de mutaciones en UPD que pueden considerarse para la identificación de mutaciones somáticas [2].

B) BASES GENÉTICAS Y CELULARES

La mutación de sentido equivocado en *JAK2* denominada *JAK2V617F* ocurre en el nucleótido 1849 del exón 14 en el cromosoma 9; es decir, en el codón 617 que se localiza en el dominio JH2. Se trata una transversión de guanina (G) por timina (T) que conduce a un cambio del aminoácido valina (V o Val) por fenilalanina (F o Phe) resultando en una proteína mutada con ganancia de función; siendo una mutación dominante en los NMPs clásicos Filadelfia (Ph) negativos [2, 3, 28, 25, 29].

La mutación se presenta en el ADN de células hematopoyéticas de pacientes con NMP pero no en la línea germinal y; se propone que se trata de una mutación somática adquirida que ocurre en progenitores hematopoyéticos oligopotentes (Figura 8) [2, 3, 12, 29].

Es importante notar la presencia persistente de *JAK2V617F* en los pacientes con PV, TE y MFP cuando se ha observado que la sustitución *in vitro* de valina por otros residuos como triptófano, metionina, isoleucina y leucina en el codón 617 también activan constitutivamente *JAK2*, pero no se presentan *in vivo*. Sin embargo, se conocen otras mutaciones activadoras en diferentes dominios de *JAK2* como T875N en JH1, deleciones y diversas en el exón 12 de *JAK2* (*JAK2-ex12*); esto provee un argumento para considerarlo como un oncogen de plataforma en la búsqueda de terapias [2, 31].

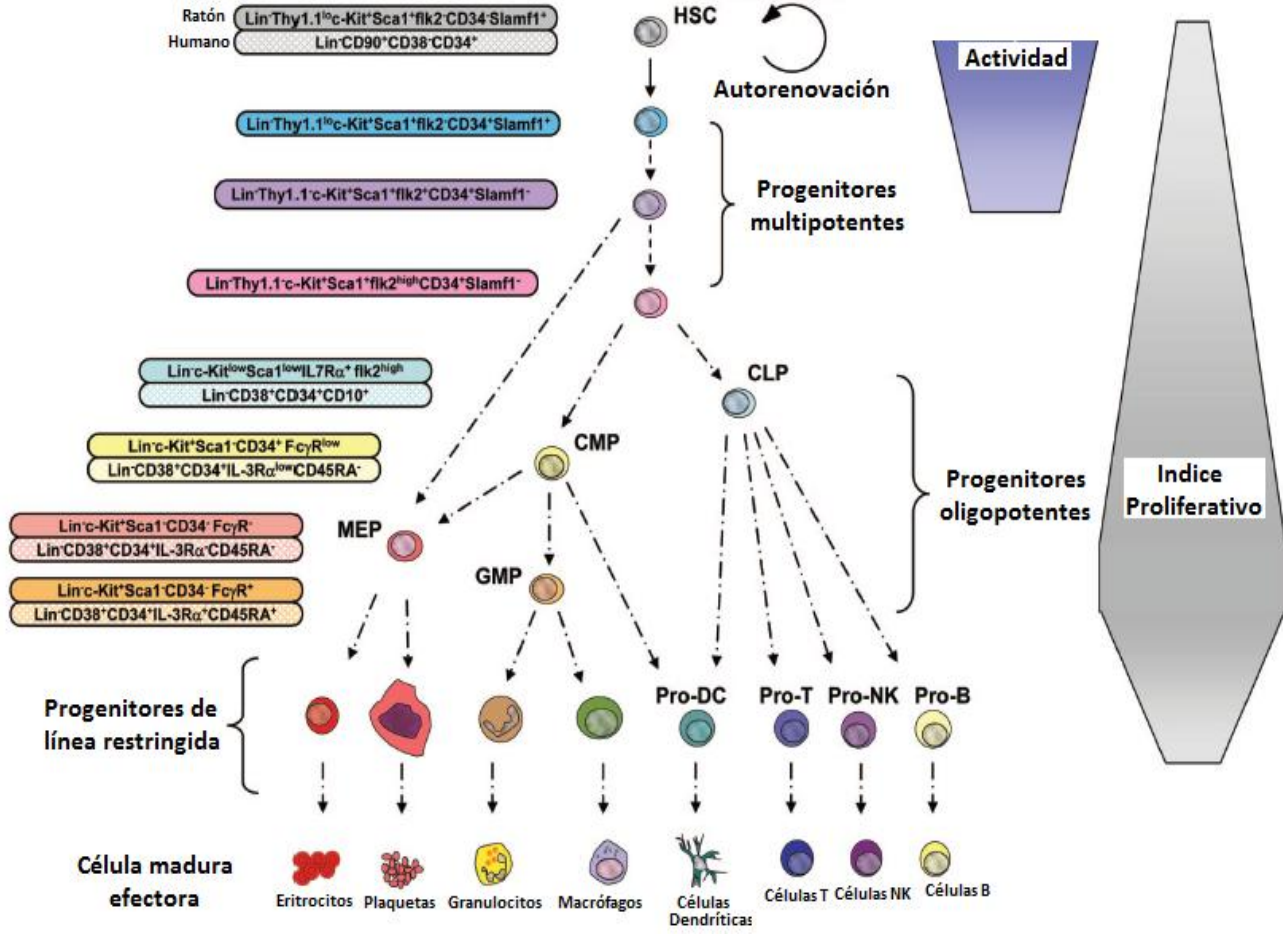


Figura 8.- Modelo del desarrollo jerárquico hematopoyético [32]. La autorenovación de células progenitoras hematopoyéticas (HSCs), de mayor jerarquía, da origen a los progenitores multipotentes, de los que a su vez surgen progenitores oligopotentes: el progenitor linfocito común (CLP) originan linfocitos B y T maduros y NK; el progenitor mielocito común (CMP) del que se originan 1) progenitores granulocito-macrófago y que se diferencian a monocitos/macrófagos y granulocitos, y 2) progenitores megacariocito/eritrocito que originan megacariocitos/plaquetas y eritrocitos. Se propone que CMP y CLP dan origen a células dendríticas. El desarrollo de progenitores oligopotentes a células sanguíneas maduras posee progenitores intermedios (no mostrados). Debe notarse que no se han resuelto totalmente las líneas de desarrollo y el grado de relación entre el modelo murino y los humanos. La diferenciación de HSC a otras células se relaciona directamente con el índice proliferativo.

C) INCIDENCIA

Se ha reportado para *JAK2V617F* una incidencia variable; del 65-97% para pacientes con PV y del 23-57% en TE y MFP; esto se atribuye, principalmente a la muestra en la que se realizó el estudio y a los métodos de detección usados durante las pruebas analíticas (Tabla 5) [10, 27, 33].

Además, *JAK2V617F* también ha sido reportada con baja incidencia, en padecimientos como LMCA, LMMC, LNC, SHE, EM, SMD y NMP atípicos, LMA-M6 y LMC (*BCR-ABL*); sin embargo, no ocurre en desórdenes linfoproliferativos, en tumores sólidos o en personas sanas [12, 22, 33, 34, 36, 37, 38].

Tabla 5.- Incidencia y porcentaje reportados por investigadores para la mutación *JAK2V617F* en NMPs clásicos [27]

| Investigador/NMP | PV | TE | MFP | Total |
|-----------------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|
| Baxter et al. [27] | 71/73 (97%) | 29/51 (57%) | 8/16 (50%) | 108/140 (77.1%) |
| Levine et al. [27] | 121/164 (73.8%) | 37/115 (32.2%) | 16/46 (34.8%) | 174/325 (53.5%) |
| James et al. [27] | 40/45 (89%) | 9/21 (43%) | 3/7 (47%) | 52/73 (71%) |
| Kralovics et al. [27] | 83/128 (64.8%) | 21/93 (23%) | 13/23 (57%) | 117/244(48%) |
| Jones et al. [27] | 58/72 (81%) | 24/59 (41%) | 15/35 (43%) | 97/166 (58.4%) |

D) CAUSAS GENÉTICAS Y ASOCIACIÓN FENOTÍPICA

La principal interrogante es el papel que ejerce esta mutación en distintos padecimientos. Para tratar de explicar la pleiotropía fenotípica de éstos desórdenes, han surgido varias hipótesis [2, 25].

- a) Dosis génica: la homocigosidad de la mutación *JAK2V617F* es el resultado de la UPD en el cromosoma 9p24; encontrándola con mayor frecuencia en PV (~33% de los pacientes) donde se observan EEC (colonias eritroides endógenas) homocigotas para la mutación. Se sugiere que UPD, además de ser un evento común en PV, ocurre tempranamente y se propone una correlación entre la carga alélica y el fenotipo de la enfermedad. Estudios *in vivo* demuestran que la sobreexpresión de *JAK2V617F* en compartimientos hematopoyéticos resulta en policitemia y leucocitosis no asociadas a trombocitosis (fenotipo eritroide); mientras que, la expresión transgénica a niveles menores resulta en trombocitosis (fenotipo megacariocítico), esto indica diferencias en la señalización constitutiva entre células homocigotas y heterocigotas. En los pacientes se ha observado relación directa entre el conteo leucocitario y tamaño del bazo en TE y MFP [2, 25, 29, 30].

- b) Modificadores de línea germinal: se sabe que los SNPs en *JAK2*, *MPL*, *EPOR* y *GCSFR* tienen influencia sobre el fenotipo. El análisis SNPs en pacientes con NMP permitieron determinar su asociación con PV y TE; lo que provee evidencia de que la variación genética es relevante en el fenotipo de NMP y de ésta manera puede relacionarse tanto con complicaciones asociadas como con la respuesta a terapias específicas ^[2].
- c) Predisposición alélica: en familias con predisposición a desarrollar NMP, la mutación *JAK2V617F* es adquirida como un alelo somático. Esto sugiere predisposición alélica que provee ventajas selectivas específicas para el desarrollo de mutaciones en las vías de señalización de *JAK2*. La relevancia está dada por la susceptibilidad de estos alelos a presentar mutaciones, como son: *JAK2V617F*, *JAK2-ex12* y *MPLW515L*; sugiriendo una fuerte selección para la activación de alelos *JAK2* en este contexto ^[2].
- d) Mutaciones somáticas adicionales: se sugiere la existencia de una fase “pre-*JAK2*” en la que se tiene una célula precursora transformada con mutaciones somáticas o heredadas que efectúa hematopoyesis clonal previos a la adquisición *JAK2V617F*, en algunos pacientes. Los datos más intrigantes proceden de pacientes con NMP positivos para *JAK2V617F* que luego se transforman en leucemia aguda con *JAK2V617F* negativo, sugiriendo la existencia de un progenitor hematopoyético “pre-*JAK2*” transformado. La identidad de estos alelos es desconocida ^(60,90). Como soporte a esta hipótesis se tiene el inicio tardío y la baja penetrancia en familias afectadas; así como, anormalidades citogenéticas en pacientes con NMP, la más notable es la deleción 20q, que de los pacientes que la portan, se encuentra en todas sus células hematopoyéticas pero sólo algunos presentan *JAK2V617F*. Así, *JAK2V617F* parece ser un evento secundario pero con alta relevancia por su papel en la patogénesis y el fenotipo de la enfermedad ^[25].

E) CONSECUENCIAS MOLECULARES Y ASOCIACIÓN FENOTÍPICA

Con respecto a la patogenicidad, en un inicio se pensó que la mutación generaba una cinasa constitutivamente activa pero debido a la complejidad molecular involucrada, los mecanismos no han sido descifrados. En la actualidad, se sugieren dos hipótesis no excluyentes; la primera supone que *JAK2* mutado interactúa con los homodímeros de receptores generando complejos constitutivamente activos; es decir, activación independientes de ligando; la segunda supone que la mutación puede generar oligomerización/activación aberrante por fosforilación persistente de *JAK2V617F* en alguna(s) de sus 49 tirosinas generando sitios de reclutamiento para proteínas con

dominios SH2, lo que se conoce como hipersensibilidad a citocinas. Además, parece ser que la mutación no elimina totalmente el mecanismo autoinhibitorio en JH2 [12, 25, 27,31].

La activación catalítica de JAK2 en ausencia de activación exógena por ligando es causada por una forma mutada y da como resultado condiciones patológicas. En condiciones normales, Jak2 posee múltiples estados de activación catalítica asociados con sus niveles relativos de fosforilación de tirosinas, por lo que la idea de que JAK2 actúe como un switch binario (encendido/apagado) ha sido modificada ya que parece poseer múltiples estados de actividad catalítica; lo que se desconoce aún, son sus consecuencias funcionales dentro de la célula. Estudios recientes sugieren que aún en ausencia de ligando y de fosforilación en asas de activación, Jak2 puede tener actividad catalítica basal; además hay evidencia de que la presencia de residuos de cinasa de tirosina fuera del asa pueden mediar cierto nivel de actividad cinasa, esto lleva a pensar que el nivel basal de actividad para JAK2 es distinto del estado de activación estimulado por ligando [18].

Se ha encontrado que JAK2 no funciona como clásicamente fue definido por la unión ligando-receptor para la activación de la vía JAK-STAT; sino que además, el nivel basal de actividad catalítica, ya definido, con baja eficiencia de utilización de ATP y autofosforilación tirosina posee consecuencias transcripcionales en la célula y por tanto, algún papel en la mediación de la expresión genética [18].

2.3.4. OTRAS ANORMALIDADES GENÉTICAS EN NMPs

Aunque *JAK2V617F* es la mutación predominante en NMPs negativos para *BCR/ABL*, se han descrito otras mutaciones menos frecuentes y se ha postulado la existencia de un progenitor hematopoyético mutado pre-*JAK2V617F* ya que no se han detectado NMPs negativos para *JAK2V617F* lleguen a ser positivos durante el curso de la enfermedad [12, 34].

El dominio pseudocinasa (JH2) de *JAK2* es un punto crítico y susceptible de mutaciones, predominantemente en los exones 12, 13, 14 y 15 que abarcan la región N-terminal, lo cual lleva a pensar que muchas de ellas son mutaciones de activación; sin embargo, debe considerarse que algunas otras pueden representar polimorfismos que no influyen en la patogénesis [12, 34].

En cerca del 3% de pacientes con PV y negativos para *JAK2V617F* se ha descrito la existencia de mutaciones puntuales de sentido equivocado, heterocigotas y somáticas (**Figura 9**); además de mutaciones puntuales en tándem, deleciones e inserciones en el exón 12 de *JAK2* (*JAK2-ex12*) ubicadas entre los residuos críticos de mutación, 537-543; pero, existen otras cercanas a esta región como T514M que ocurre en el exón 12 (asa de activación). Los ensayos *in vitro* han demostrado que estas mutaciones generan el crecimiento de colonias independientes de estimulación por Epo y en los pacientes se observan con frecuencia niveles normales de Epo y policitemia aislada que generan

activación independiente de citocinas; es decir, un fenotipo no relacionado al observado para *JAK2V617F* pero con las mismas consecuencias moleculares [1, 2, 12, 29, 34].

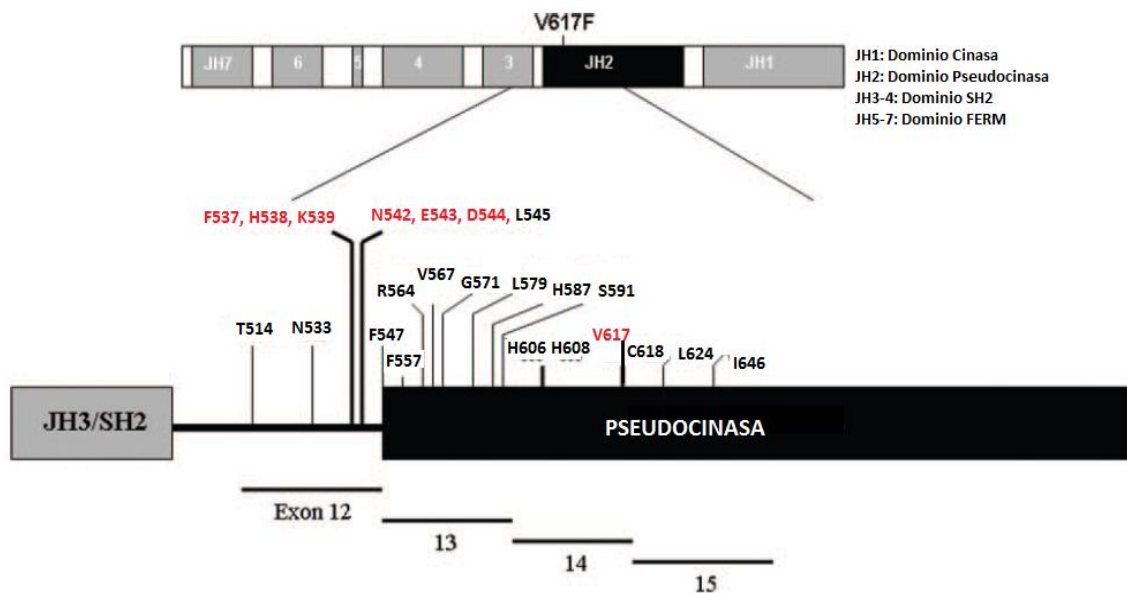


Figura 9.- Diagrama esquemático de la estructura genética y las mutaciones en *JAK2*^[34]. Se muestran todas las mutaciones conocidas para el gen *JAK2*; mostrando en rojo las descubiertas recientemente y V617F considerada por su relevancia.

En el exón 13 se reportó por primera vez^[34] una mutación puntual en R564, de la que aún se desconoce su impacto en la actividad cinasa de *JAK2*. La mutación G571 puede causar cambios conformacionales, por encontrarse adyacente a Y570, sitio de fosforilación, que podría resultar en actividad cinasa constitutiva. También se han detectado nuevas mutaciones puntuales en exón 15, L624P y I645V (**Figura 9**)^[34].

Aunque la mayoría de las mutaciones son puntuales, existen otras como la delección que elimina completamente el exón 14 y que fue descubierta durante el diseño de oligonucleótidos para la detección de V617F; y la delección de nucleótido F557 en el exón 13 (**Figura 9**) que provoca cambio en el marco de lectura (*frameshift*) y terminación temprana, generando cambios significativos en la proteína Jak2^[34].

Las mutaciones en el receptor de trombopoyetina *MPL* no se han encontrado en PV, pero si en pacientes con MFP (~5%) y TE (~1-9%); con al menos 5 variantes (*MPLW515L*, *MPLW515K*, *MPLS505N*, *MPLA506T* y *MPLA519T*) involucradas en la vía de señalización JAK-STAT y generando, en modelos animales, el fenotipo típico de un NMP con o sin la mutación *JAK2V617F* [1, 2, 12, 29, 39].

Un aspecto importante a analizar, surge a partir de la interrogante de porque los pacientes sin mutaciones en *JAK2* ni *MPL* poseen dependencia evidente de la vía

proliferativa *JAK2*; el dato más convincente proviene de ensayos clínicos con inhibidores de *JAK2* para pacientes sin las mutaciones, observando sensibilidad a dosis similares que en los pacientes con las mutaciones [2].

Además, se sabe que los pacientes con PV, TE y MFP poseen riesgo, aunque bajo, de desarrollar LMA como evento secundario y con transformación de *JAK2V617F* positivo a negativo; ya que, los estudios citogenéticos y clonales sugieren que las células *JAK2V617F* positivos y *JAK2617F* negativos con LMA provienen de la misma clona [12].

También se han descrito múltiples mutaciones en el gen supresor de tumor *TET2* que ocurren en pacientes tanto positivos como negativos para *JAK2V617F* y se plantea que la adquisición de la mutación ocurre antes que *JAK2V617F*; sin embargo, los análisis se han realizado en grupos pequeños de pacientes [9, 29].

En pacientes con NMPs también se han encontrado mutaciones en el gen *ASXL1* y para las cuales aún se desconocen sus consecuencias clínicas, como ocurre en la mayoría de las mutaciones conocidas [9].

Otra anomalía reportada en aproximadamente el 21% de pacientes con PV familiar es la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el brazo corto del cromosoma 9 (9p), detectada mediante mapeo de microsatélites y secuenciación. [3, 39, 40, 66]

Es claro que se requieren estudios de funcionalidad para explicar el papel de estas mutaciones en la actividad desregulada de *JAK2* y su contribución en la leucemogénesis; sin embargo, los polimorfismos dentro de la vía JAK-STAT contribuyen con la variabilidad fenotípica y proveen evidencia de que los pacientes con factores constitutivos influyentes se inclinan hacia cierto fenotipo [34, 39].

Aunque las anomalías citogenéticas son frecuentes en PV (13-29%), MFP y TE (>5%), no se han identificado aberraciones específicas. Entre otras, se ha encontrado delección en el brazo largo del cromosoma 20 [del(20q)] en células hematopoyéticas, pero sólo algunas de ellas portan el alelo *JAK2V617F*; este evento se presenta durante la progresión de la enfermedad en pacientes bajo tratamiento, lo que indica que se trata de un evento secundario y que las mutaciones precedentes a *JAK2V617F* son distintas de las que contribuyen al desarrollo de NMPs familiares. Estos datos sugieren que las mutaciones somáticas alternativas que resultan en activación de la señalización de *JAK2* contribuyen en la patogénesis de los NMPs negativos para *JAK2V617F*. En resumen, la mutación *JAK2V617F* indica no ser el evento primario en los NMPs pero es altamente relevante en la patogénesis y fenotipo de la enfermedad [3, 12, 25, 39, 40]

También se ha reportado aberraciones numéricas (trisomía) en los cromosomas 1, 8 y 9; delecciones de los cromosomas 5q, 13q y 20q; y ganancias frecuentes en 9p. Además de un rearrreglo no balanceado recurrente entre los cromosomas 9 y 18 [der(9;18)] generando la monosomía 18p [3, 39].

El desarrollo tumoral se considera el resultado de la evolución clonal efectuado por la adquisición secuencial de mutaciones somáticas. El papel de las aberraciones cromosómicas comunes puede estar relacionado con estados tempranos de evolución clonal o establecer el primer evento que genera una clona capaz de evolucionar. De forma similar a los eventos mutacionales, muchos de los citogenéticos pueden resultar en fenotipos hematológicos no detectables que conduzcan a distintos fenotipos [39].

Investigaciones recientes se han direccionado al estudio de los cambios epigenéticos y factores genéticos que pueden heredarse. Los epigenéticos sugieren que la hipermetilación de los genes *SOCS3*, supresores de la señalización, se encuentran relacionados con MFP y TE en pacientes negativos para *JAK2V167F* [29].

2.3.5. TRATAMIENTO DE NMPs

Los inhibidores de *JAK2* se encuentran divididos en dos categorías, los de clase I son selectivos de *JAK2* y los de clase II, desarrollados para el tratamiento de otros padecimientos proliferativos, son no selectivos de *JAK2* pero poseen la capacidad de inhibir al blanco (*off-target*) [29].

La terapia disponible actualmente contra NMPs se lleva a cabo con hidroxiaurea, un agente que evita la síntesis de ADN por inhibición de la ribonucleótido reductasa; sin embargo, el interferón pegilado es menos tóxico y ha mostrado gran eficacia. Los datos por tratamiento con hidroxiaurea indican que para MFP, la sobrevida es de aproximadamente 6 años y con riesgo de transformación a LMA de 10 años. En PV, la sobrevida media puede exceder los 15 años para TE puede llegar a ser similar que la edad promedio normal [29].

Hasta el momento, la terapia convencional no es curativa ni previene evolución clonal y sólo posee efectividad hematológica; es decir, reducción de la esplenomegalia, mejora en el conteo leucocitario, ganancia de masa corporal y desaparición de los síntomas constitutivos; sin embargo, el número de pacientes evaluados aún es pequeño, no se han considerado otros parámetros asociados a mielofibrosis presente en la mayoría de los pacientes [2, 12, 25].

Para el tratamiento de NMPs *BCR-ABL* negativos la inhibición de *JAK2* hiperactivo parece ser prometedor, pero los efectos de la mayoría de los fármacos inhibidores aún se encuentran en fases de estudio, principalmente I y II. Los ensayo *in vitro* sugieren que los inhibidores de *JAK2* serán efectivos en pacientes con mutaciones *JAK2-ex12* o en *MPL*; sin embargo, la relevancia de *JAK2V617F* para terapias comunes de NMPs no es clara; por lo que, es necesaria la realización de estudios para la búsqueda de *JAK2V617F*, como guía para las decisiones en el tratamiento de NMPs. Además, es importante considerar los eventos adversos a largo plazo, mediante reevaluación constante de los datos obtenidos, como son la toxicidad o la resistencia; algunos estudios reportan la evolución a leucemia

mieloide aguda en pacientes con algún NMP positivo para *JAK2V617F* luego de ser tratados con inhibidores cinasa ^{(48, 60, 67, 90) [2, 12, 25, 41]}.

Dada la exitosa utilidad clínica de Imatinib® en el tratamiento de pacientes con LMC (*BCR-ABL*), LEC (*FIP1L1-PDGFR*) y NMPs (*PDGFRB*), se ha buscado el desarrollo de inhibidores específicos y potentes de *JAK2* para el tratamiento de NMPs. Los ensayos *in vitro* han mostrado inhibición del crecimiento de líneas celulares mutadas de *JAK2V617F* a concentraciones nanomolares; lo que indica posibilidad de generar alta potencia a concentraciones farmacológica. Dada la importancia de la señalización de *JAK2*, debe evitarse la toxicidad hematopoyética y no hematopoyética, además de minimizar la inhibición de *JAK3* para evitar pérdida de función asociada con inmunodeficiencia combinada severa (IDCS) ^[12].

Actualmente, sólo el tratamiento con un inhibidor de *JAK2* (INCB018424) ha pasado a estudios de fase III y existen algunos otros en fases I y II de estudio. Junto con ellos, los inhibidores desacetilasa de histona e inhibidores de cinasa aurora se encuentran en ensayos clínicos y de forma general, los datos clínicos aún son limitados ^[29].

I. INCB018424 (Incyte, Ruxolitinib)

Se trata de una molécula pequeña con afinidad competitiva al asa de unión de ATP en la cinasa blanco. Es un inhibidor altamente selectivo de *JAK2* biodisponible oralmente y potente. Mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, ha mostrado actividad contra *JAK2V617F*. Datos previos (*American Society of Hematology* [ASH, 2007-2008]) reportan la selectividad por *JAK2* y que una dosis de 2X25 mg, en comparación con dosis mayores, es más efectiva para reducir la esplenomegalia, los síntomas constitutivos y un aumento en el índice de masa corporal (IMC); más del 93% de los pacientes mostraron un rápida reducción de esplenomegalia de la línea base del bazo de más de 20 cm durante el primer mes de tratamiento independiente del estado mutado de *JAK2* ^[25, 29].

Además, los niveles de citocinas disminuyen significativamente y el conteo leucocitario de células CD34+ periféricas disminuyen pero interesantemente el nivel de *JAK2V617F* en sangre periférica muestra sólo una disminución modesta, también las citocinas IL1b, IL1RA, IL6, IL8, TNF α , TNFRII, proteína C reactiva y leptina muestran niveles disminuidos; así como niveles aumentados de colesterol total, lo que sugiere la disminución en el hipercatabolismo y estado proinflamatorio Sin embargo, las mejorías no fueron asociadas con una reducción significativa en la carga tumoral de *JAK2V617F*, esto muestra carencias en la erradicación de la clona mutada ^[25, 29].

Los agentes fueron bien tolerados sin presentar toxicidad significativa no hematológica. La evaluación global de estos resultados, hace que INCB018424 se encuentre en ensayos clínicos de fase III (Novartis) ^[29, 67].

II. XL019 (Exelixis)

Es una molécula pequeña que se une competitivamente al sitio de unión a ATP de varias cinasas. Los estudios extensos en líneas celulares y pruebas clínicas de fase I en pacientes muestran que se trata de un inhibidor potencial y efectivo para *JAK2* y menor para otras cinasas relacionadas [25].

Clínicamente, el tratamiento con XL019 resultó en reducción significativa de la esplenomegalia y de la leucocitosis, estabilización en los niveles de hemoglobina, mejora en el conteo de CD34+ y disminución de los síntomas constitutivos (10/11 pacientes con *JAK2V627F*). Interesantemente, la reducción de esplenomegalia estuvo limitada al grupo de pacientes positivos para *JAK2V617F* y se observó reducción en la carga del alelo *JAK2V167F*. Los estudios preclínicos mostraron una actividad elevada del fármaco en una gran variedad de líneas celulares y ensayos con cinasas. Aún no se tienen datos precisos acerca de los efectos clínicos, pero ha mostrado ser bien t

olerado y efectivo clínicamente [25].

XL019 fue estudiado en fase I, Los pacientes positivos para *JAK2V617F* y *MPLW515F* tuvieron esplenomegalia reducida y síntomas constitucionales mejorados. Además, se observó reducción de blastos circulantes (10-19%) en 3 de cada 4 pacientes [29].

Desafortunadamente, debido a la neurotoxicidad reversible central o periférica, las investigaciones para XL019 no seguirán adelante [29].

III. TG101348 (TargeGen)

Es un medicamento disponible comercialmente (Sanofi-Aventis®) por su efectividad en ciertas formas leucemicas, linfomas y otros padecimientos hematológicos [68].

TG101348 es un inhibidor potente y selectivo de *JAK2* (332 veces más que en *JAK3* y 35 veces más que en *JAK1*), es biodisponible oralmente; los efectos observados en el modelo murino para PV han mostrado reducción en el conteo leucocitario, hematocrito y tamaño del bazo, así como capacidad para inhibir selectivamente el crecimiento de colonias hematopoyéticas portadoras de *JAK2V617F* [25].

En cuanto al tratamiento de NMPs clásicas como PV y MFP, el fármaco se encuentra en pruebas de fase II y se han reportado algunos eventos adversos en los individuos como náuseas y dolor abdominal; los datos de carga del alelo *JAK2V617F*, niveles de hemoglobina y fibrosis en médula ósea aún no están disponibles [25, 68].

IV. CEP701 (Lestaurtinib, Cephalon)

Actualmente es comercializado para el tratamiento de LMA; sin embargo por ser un fármaco inhibidor de cinasas de tirosina competitivo, se encuentra en estudios de fase II para el tratamiento de MFP. Hasta el momento, se ha observado reducción del tamaño del bazo con mejoría en el conteo de neutrófilos y plaquetas; el tiempo medio de respuesta fue de 3 meses y no se ha identificado cambios en la carga de *JAK2V617F*, disminución en la fibrosis de médula ósea o algún tipo de respuesta citogenética. Muchos de los resultados de fase II aún se encuentran pendientes, pero se sugiere que este agente también disminuye la carga alélica de *JAK2V617F* [29].

V. ITF2357

Es un inhibidor de la histona desacetilasa y de líneas celulares positivas para *JAK2V617F* en concentraciones nanomolares; mediante estudios pre-clínicos ha mostrado inhibición selectiva sobre *JAK1* y *JAK3* y en los de fase II los pacientes han mostrado tolerancia con grados de toxicidad hematológica menores a 4. La toxicidad no hematológica provocó diarrea, fatiga, náuseas y dolor abdominal [29].

2.3.6. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA MUTACIÓN *JAK2V617F*

La identificación de la mutación *JAK2V617F* ha generado un gran interés, en los últimos años. El desarrollo de métodos moleculares auxiliares en el diagnóstico han sido muy útiles para su aplicación clínica [78]. A continuación se muestran los métodos que hasta el momento han sido aplicados para su detección:

A) Secuenciación Directa de ADN.

Los primeros estudios para la identificación de *JAK2V617F* se efectuaron por secuenciación directa del templado de ADN genómico y/o de ADNc amplificados por PCR y usando la variante terminadora en seco (BigDye®) (Figura 10). En este método se realiza una reacción de extensión con un templado de ADN amplificado usando una mezcla de ddNTPs y el producto es leído por un detector estándar de fluorescencia multiondas (por ejemplo, ABI Prism 3100-Avant y Applied Biosystem) luego de electroforesis capilar en gel. Aunque este método provee información detallada y es considerado un método de visualización directa posee una sensibilidad limitada, especialmente cuando hay baja carga de alelo mutado [10, 27, 42].

Los experimentos sobre ADN han mostrado que la mayoría de mutaciones puntuales son detectadas si se tiene más del 20% del ADN mutado con respecto al ADN silvestre; esto es relevante en el estudio de NMPs ya que las muestras de sangre y de médula ósea contienen una mezcla de elementos hematopoyéticos normales y neoplásicos^[10].

Los estudios para determinar la especificidad de detección con respecto a *JAK2* (G>T) mediante una serie de experimentos con células las líneas TF-1 eritroleucémica (normal) y HEL eritroleucémica (mutada), se observó falla en la detección del alelo mutado cuando estaba presente en un porcentaje menor al 5% con respecto al del ADN total. Cuando se usó ADN mutado homocigoto diluido en ADN de una persona sana la sensibilidad fue menor, pues se requería al menos un 10% de carga alélica mutada^[10].

La secuenciación directa es útil cuando se usa como técnica de investigación; sin embargo no es confiable para su aplicación en la práctica clínica ya que es relativamente laboriosa, costosa en tiempo dinero y requiere equipo especializado que no siempre se encuentra disponible. En algunos casos, el esfuerzo extra de la secuenciación, puede resultar en resultados falsos debido a la baja carga alélica^[10, 43].

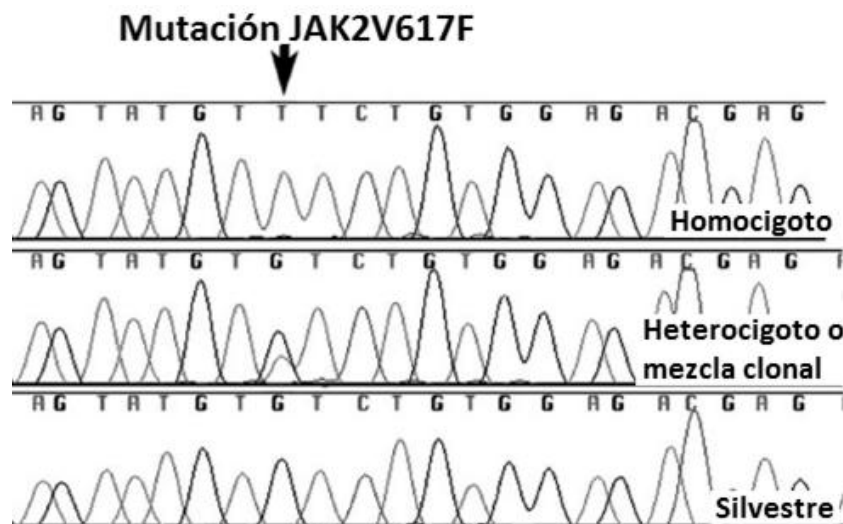


Figura 10. Electroferogramas para la detección de *JAK2V617F*^[10]. Se muestran los diferentes electroferogramas obtenidos en muestras de pacientes homocigoto y heterocigoto para *JAK2V617F* y de una persona sana en la que no hay sustitución de G por T.

B) PCR específico de alelo (sistema de amplificación refractaria de mutaciones [ARMS])

Esta técnica es conocida bajo distintos nombres como son “PCR específico de alelo” (AS-PCR) o “PCR de oligonucleótido específico de secuencia” o “Sistema de amplificación refractaria de mutaciones (ARMS) y explota la propiedad de alineamiento de los oligonucleótidos en una reacción de PCR para su extensión por medio de la enzima ADN polimerasa. La elección de oligonucleótidos específicos que se unen sólo en donde la mutación puntual está presente en el ADN, permiten la amplificación de un fragmento para la detección de *JAK2V617F* y no del alelo silvestre ^[10, 26, 44].

Es necesario contar con un control en el mismo tubo de reacción (control interno) para asegurar que la ausencia del producto buscado no se deba a alguna falla en el proceso de extracción o en la reacción de PCR, antes que considerar la ausencia de la mutación en la muestra. Cuando los amplicones generados son visualizados en gel de agarosa y la mutación está presente, se observan dos fragmentos de distinto tamaño correspondientes al alelo silvestre y al mutado; la presencia única del alelo silvestre indica ausencia de la mutación. La principal ventaja de este método es su alta sensibilidad, correspondiente al 0.01% de alelo mutado con respecto al total. En algunas pruebas se usa la 5'-carboxifluoresceína para facilitar la resolución del producto de PCR por cromatografía ^[10, 45].

C) PCR en tiempo real (Q-PCR) y curva de fusión de ADN.

El monitoreo por PCR en tiempo real de los productos acumulados durante los ciclos térmicos son importantes como un método cuantitativo en la detección de mutaciones, como ocurre para el transcrito de fusión *BCR-ABL* en LMC. En ésta técnica, se unen al ADN moléculas fluorescentes como SYBR Green I de forma inespecífica o sondas oligonucleotídicas de forma específica; las moléculas fluorescentes son incorporadas durante la fase exponencial de la reacción de PCR y su acumulación es monitoreada. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de amplicón presente en el tubo que al mismo tiempo es dependiente de la cantidad de templado blanco presente al inicio de la reacción ^[10, 46].

Las curvas fusión de ADN pueden usarse en conjunto con PCR tiempo real ya que se basan en el principio de que la hibridación de las cadenas complementarias de ADN es mucho más fuerte en presencia una pareja ideal oligonucleótido-templado, comparadas con las parejas oligonucleótido-templado que poseen cierto grado de falta de unión (*mismatching*). Para explotar esta propiedad, se amplifica por Q-PCR un fragmento de ADN genómico corto y que incluya el sitio con la mutación; luego se analiza, por

gradiente, para detectar a que temperatura se rompe la interacción de la dos cadenas ^[10]. En la mezcla de reacción, se incluyen dos sondas de hibridación fluorescente para los oligonucleótidos no unidos (sentido y antisentido); una sonda posee un fluoróforo donador (como 3'-fluoresceína tag) y la otra, un fluoróforo receptor (como 5'-LC Red 640 tag). Las sondas se unen al ADN con una distancia de una base y durante la curva de evaluación post-fusión, la proximidad produce transferencia de energía de fluorescencia resonante con emisión de luz que es detectada ^[10].

La temperatura en el tubo de reacción es aumentada continuamente durante la fusión, por lo que, las sondas se disocian del producto de PCR acumulado en función de su avidéz de unión; entonces, la fluorescencia disminuye. Para comprender este concepto, se ejemplifica el caso de *JAK2* donde la sonda que se une al ADN mutado posee una base no complementarias (*mismatch*) que se disocia a 55° C y la sonda unida al ADN silvestre se disocia a 65° C, permitiendo la distinción entre ambas clonas (**Figura 11**). La sensibilidad detectada para este ensayo es de 1-10% de detección para en ADN mutado en una mezcla con ADN silvestre ^[10, 27].

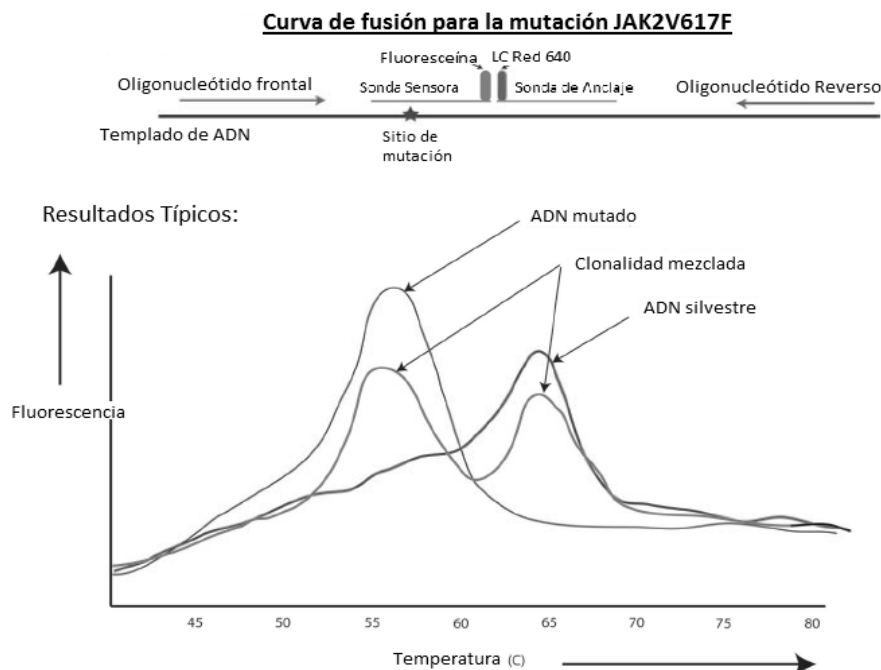


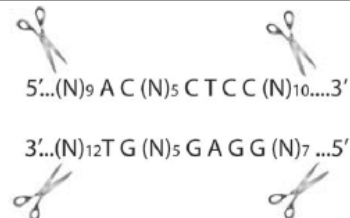
Figura 11.- Curva de fusión para la detección de *JAK2V617F*^[10]. Se muestran los resultados típicos generados en las muestras de pacientes. Las sondas se muestran en la parte superior. Cuando las sondas de fluorescencia (fluoresceína y LC Red 640) se unen al templado de ADN, se lleva a cabo la transferencia de fluorescencia por transferencia electrónica que luego se interrumpe por la fusión del ADN, facilitando la detección del producto.

D) Polimorfismos en Fragmentos Largos de Restricción (RFLP)

La mutación *JAK2V617F* no crea algún sitio de corte para las endonucleasas de restricción conocidas. Sin embargo, elimina un sitio de reconocimiento en la secuencia silvestre de *JAK2* reconocido por la enzima de restricción *BsaXI*, derivada de *Bacillus stearothermophilus* 25B. (Figura 12). Aunque la eliminación de un sitio de restricción no es tan satisfactoria como la creación de un nuevo sitio, debido a la reacción de ruptura enzimática negativa que puede generarse en ausencia de la mutación o por falla en el procedimiento de digestión, esto puede ser útil como un primer paso de análisis. La sensibilidad reportada es de aproximadamente el 20% en el ADN mutado mezclado en ADN silvestre [10].

El análisis por RFLP es simple, económico y es útil como una técnica de escaneo; y su principal importancia radica en que se trata de un ensayo con especificidad elevada. Los resultados anormales generalmente requieren confirmación por otras técnicas. Este ensayo es usado generalmente como un paso inicial para la detección de *JAK2V617F*, que luego es seguido por química de fluorescencia DYE para su confirmación; su principal ventaja radica en que se trata de un ensayo altamente específico. [10,45].

Sitios de reconocimiento y ruptura para la endonucleasa de restricción *BsaXI*



Secuencia relevante de *JAK2* en ADN genómico:

Silvestre:
AAATTATGGAGTATGTGTCTGTGGAGACGA
Mutado:
AAATTATGGAGTATGTTCTGTGGAGACGA

Figura 12. Sitios de reconocimiento para la endonucleasa de restricción en el gen *JAK2* que puede ser usado para la detección de la mutación *JAK2V617F*[10]. La mutación resulta en pérdida de un sitio de reconocimiento que es usual. Los amplicones de PCR no digeridos luego de incubación con *BsaXI* pueden ser detectados de formas distintas como son electroforesis, electroferografía o cromatografía.

E) Pirosecuenciación

Es un método de genotipificación rápida que depende de la liberación de pirofosfato (PPi) cuando un dNTP es incorporado a la cadena de ADN en crecimiento durante su polimerización a partir de un templado (**Figura 13**). Luego, el PPi sirve como sustrato; en presencia de adenosina 5'fosfosulfato es convertido cuantitativamente a ATP por la ATP sulfurilasa. El ATP conduce la conversión, mediante la luciferasa, de luciferina a oxiluciferina que emite luz visible para ser detectada por una cámara. Los dNTPs no incorporados y el exceso de ATP son degradados por la apirasa ^[10].

Las ventajas de la pirosecuenciación son: 1) detección de la secuencia de interés en tiempo real; 2) no requieren procedimientos post-análisis y; 3) es semicuantitativa, lo cual permite la estimación de la tasa alélica. La pirosecuenciación efectuada con el sistema automatizado PSQ HS 96 muestra una sensibilidad de 5 a 10% del alelo mutado en presencia de ADN silvestre. Sin embargo, no representa una prueba de elección para su aplicación clínica ya que es un método relativamente caro ^[10].

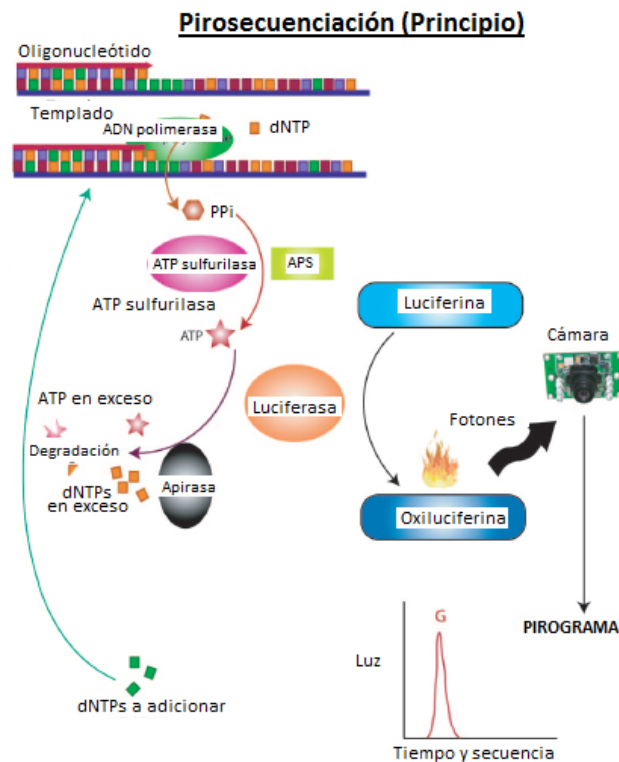


Figura 13.- Principio esquemático de la pirosecuenciación ^[10]. Se detallan en forma esquematizada los pasos del proceso de pirosecuenciación para la generación del pirograma que corresponde a una gráfica de interpretación directa.

F) Otras técnicas para la detección de mutaciones.

Existen muchas otras técnicas para la detección de la mutación *JAK2V617F*; a nivel de ADN se propone la aplicación de polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP), electroforesis en gel por gradiente desnaturizante (DGGE), cromatografía en líquidos de alta resolución desnaturizante (dHPLC), ensayo de extensión de oligonucleótido de un solo nucleótido (Pronto), etc.

De esta forma por dHPLC, por ejemplo, se puede detectar la mutación en ADN genómico con una sensibilidad de 1-2%; sin embargo, las mutaciones detectadas por dHPLC, DGGE y SSCP deben ser confirmadas con otra técnica. De forma análoga a la secuenciación, dHPLC, DGGE y SSCP son sensibles a otras mutaciones; mientras que otras como: ARMS, curva de fusión de ADN y RFLPs, son dirigidas a la búsqueda de una mutación en específico [10].

Adicionalmente, existe una modalidad combinada en la que se lleva a cabo una reacción de PCR para la amplificación de la región de interés, y luego clonando en un vector específico; cada una de las clonas pueden ser cosechadas y luego secuenciadas; obteniendo así una mayor sensibilidad para la detección de la mutación aún cuando la carga de alelo mutado sea muy baja [69].

También pueden aplicarse técnicas con el uso de proteínas para la detección del producto mutado *JAK2V617F*, pero estas son generalmente laboriosas y el acceso a estos recursos está limitado; por lo que no son los ensayos preferidos de aplicación [10].

3. OBJETIVOS

A) Generales

- Estandarizar el método de reacción en cadena de la polimerasa específico de alelo (PCR específico de alelo) para el estudio de la mutación *JAK2V617F* presente en pacientes con neoplasias mieloproliferativas clásicas.
- Estandarizar el método de reacción en cadena de la polimerasa acoplado a polimorfismo de fragmentos largos de restricción (PCR-RFLP) para el estudio de la mutación *JAK2V617F* en pacientes con neoplasias mieloproliferativas clásicas.

B) Particulares

- Implementar en LAOH, S.C. los métodos PCR específico de alelo y PCR-RFLP como una prueba complementaria para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas clásica.
- Determinar la incidencia de la mutación en pacientes mexicanos con NMPs.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras seleccionadas correspondieron a pacientes con sospecha diagnóstica de neoplasias mieloproliferativas y fueron médula ósea y/o sangre periférica.

Las muestras procesadas para extracción de ADN por 3 métodos: automatizado (*QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN®*), salino y orgánico (*TRizol®*). A partir de jeringas o tubos con heparina y/o de tubo con EDTA como anticoagulantes, y se uso médula ósea o sangre periférica indiferentemente.

Se evaluó la cantidad y la calidad del ADN extraído por espectrofotometría a 260nm (y a 280nm para medición de proteínas como factor de comparación) y electroforesis en gel de agarosa, respectivamente. Se consideraron como muestras viables para los ensayos, aquellas con cantidades mayores a 50 µg/mL de ADN de alto peso molecular.

Las muestras de ADN fueron amplificadas por PCR específico de alelo, al menos por duplicado y usando muestras obtenidas por diferente método; después fueron amplificadas por PCR acoplado a RFLP usando, de ser posible, las muestras con cantidades de ADN mayores a 100 µg/mL. Posteriormente se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los fragmentos visualizados y positivos para *JAK2V617F*, por al menos, uno de los métodos fueron obtenidos del gel y purificados por método automatizado (*QIAquick Gel Extraction Kit®*) para someterse a secuenciación directa y así, corroborar los resultados obtenidos.

4.2. PACIENTES.

Se incluyeron 80 muestras de pacientes recibidas en LAOH, S.C con sospecha clínica de neoplasias mieloproliferativas (*BCR/ABL* negativas) contra LMC (*BCR/ABL* positiva), en el periodo de agosto de 2010 a mayo de 2011.

Para verificar y/o descartar LMC se evaluó el gen de fusión *BCR/ABL* por RT-PCR y/o búsqueda de cromosoma Filadelfia por cariotipo en las 80 muestras de los pacientes, siendo positivo en 25 muestras; lo que confirma el diagnóstico de LMC (*BCR/ABL* positivo). El resto de las muestras, es decir, 55 pacientes fueron negativas para el gen de fusión; por lo que, se consideraron como NMP (*BCR/ABL* negativas).

4.3. MUESTRAS.

Se trabajó con muestras de médula ósea (mo) y/o sangre periférica(sp), con heparina y/o EDTA como anticoagulante. Se realizó extracción de ADN por tres métodos: automatizado (*QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN®*), salino y/u orgánico (*TRIZOL®*); dependiendo de la cantidad de muestra disponible.

4.4. EXTRACCIÓN DE ADN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD

4.4.1. Métodos de extracción.

A) Automatizado

Se usó el kit de extracción de ADN, *QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN®* con 200 µL de sangre periférica total o de médula ósea total en heparina y/o EDTA como anticoagulante.

Columnas *QIAamp*: Columnas con membrana de sílice.

AW1 y *AW2*: Amortiguadores de lavado para purificar del ADN obtenido.

AE: Amortiguador para conservar la muestra en solución (puede ser sustituido por agua).

El esquema del procedimiento se muestra a continuación:

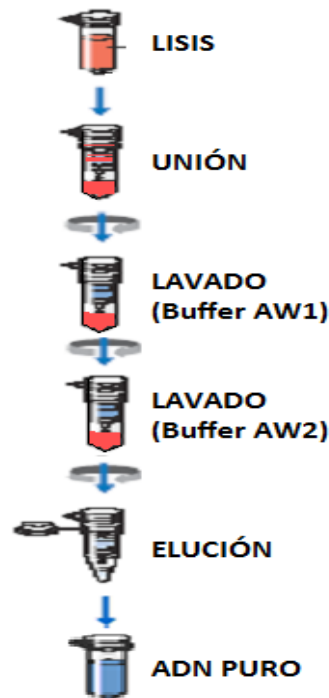


Figura 14.- Diagrama esquematizado del proceso automatizado para la extracción de ADN.

El producto de ADN en solución se conservó en refrigeración hasta y después de su uso.

B) Salino

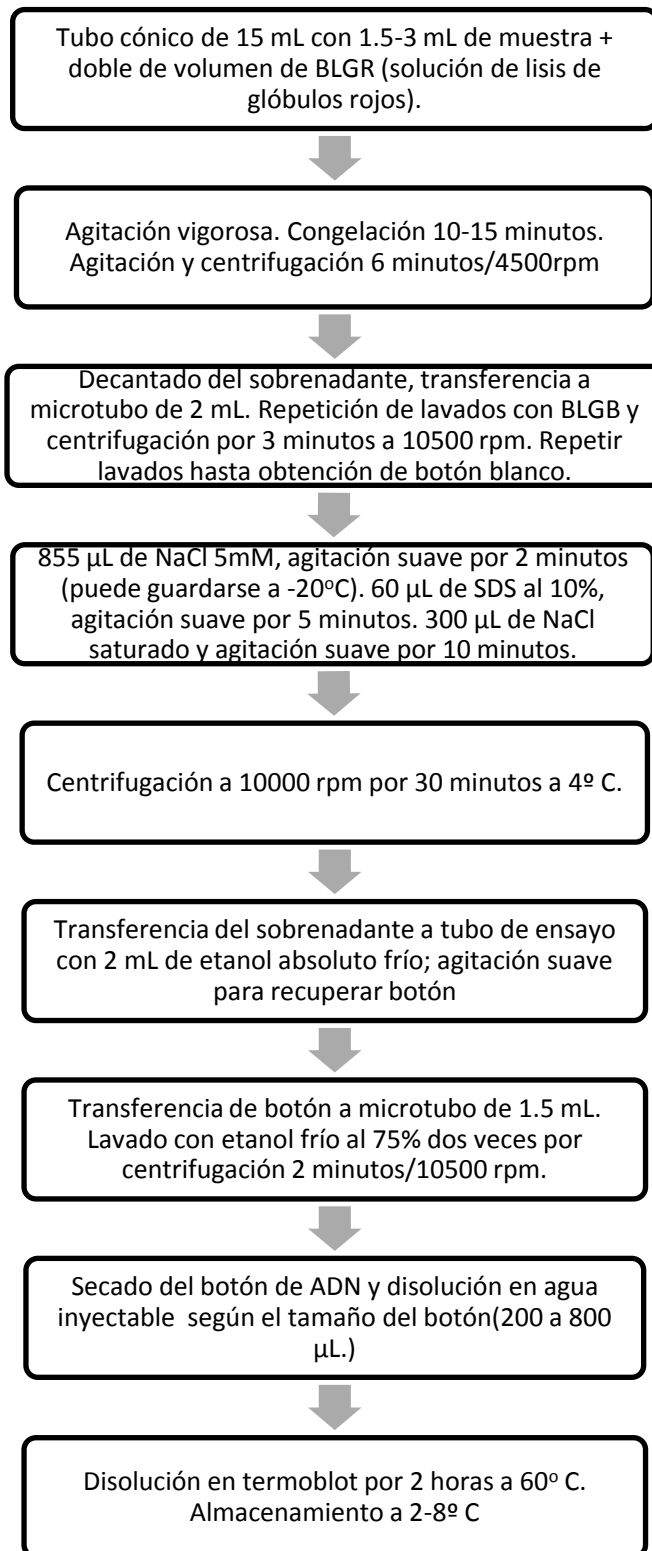


Figura 15.- Diagrama esquematizado del proceso salino para la extracción de ADN

c) Orgánico

Para los casos en los que la muestra de sangre periférica y/o médula ósea ya había sido usada para la extracción de ARN (para la búsqueda de *BCR/ABL*) por método orgánico (*TRIZOL*®), se utilizó la fase orgánica remanente para la extracción de ADN; el procedimiento completo se muestra a continuación:

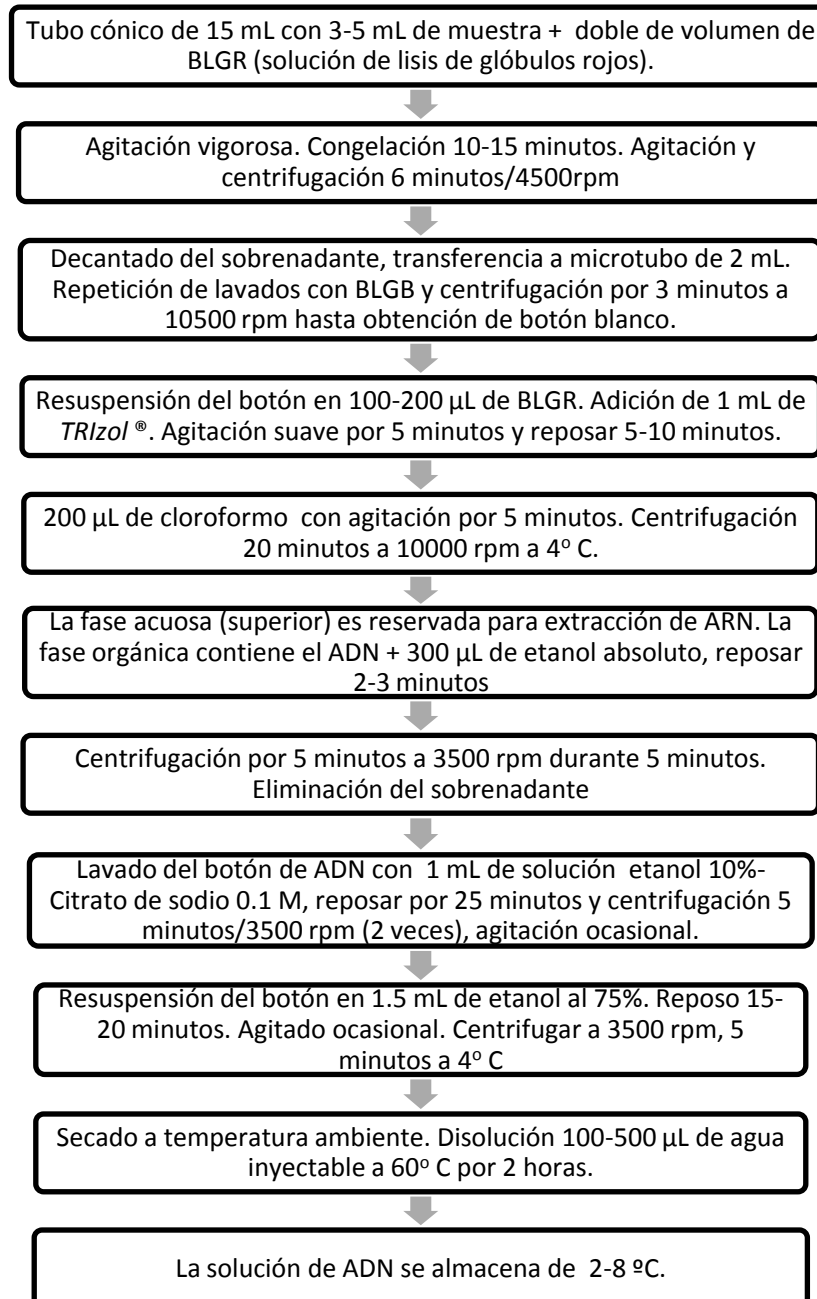


Figura 16.- Diagrama esquematizado del proceso orgánico para la extracción de ADN. *Todas las soluciones se preparan con agua tratada con DEPC y esterilizada por autoclave.

4.4.2. Evaluación de la Calidad.

A) Cualitativo.

Esta evaluación se llevó a cabo mediante la visualización de 5 µL de los productos de ADN extraídos en gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE o TBE 1X y teñido con bromuro de etidio; y observados bajo la luz UV del transiluminador corridos por electroforesis a 175 Volts por 25 minutos.

Una banda bien definida cercana al pozo del gel indica ADN de alto peso molecular viable para su análisis. Las bandas tenues o barridas indican la presencia de un producto con calidad baja; es decir, poco o degradado, respectivamente

B) Cuantitativo.

Esta evaluación permite determinar la cantidad de ADN genómico extraído mediante su cuantificación por espectrofotometría a 260 nm. Se realizó una dilución de 1/20 (5 µL de producto en 95 µL de agua inyectable) y se leyó la absorbancia usando un blanco de agua.

Las muestras también fueron leídas a 280 nm para determinar la concentración proteica.

Las cantidades en µg/mL se determinaron de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\frac{A_m}{A_{std}} * FD * [Std] = [m]$$

Donde:

A_m= Absorbancia de la muestra a 260 nm

A_{std}= Absorbancia del estándar a 260nm= 1.00

FD= Factor de dilución = 20

[Std]= Concentración del estándar = 50 µg/mL para ADN

[m]= Concentración de la muestra (µg/mL)

Para determinar si la muestra era adecuada se prefirió una absorbancia mayor a 0.1 para ADN.

Además, se calculó la relación:

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = 1.7 - 1.9$$

para estimar la pureza y calidad de la muestra.

4.5. ESTANDARIZACIÓN DEL PCR ESPECÍFICO DE ALELO.

La estandarización del método de PCR específico de alelo se realizó mediante reacciones simples partiendo de protocolos y procesos conocidos para esta metodología, para la amplificación de los productos^[45].

Para las reacciones se usaron controles negativos de personas sanas (sin la mutación *JAK2V617F*), los casos de pacientes con cantidades distintas de ADN genómico determinadas como se indicó en el punto 4.3 y un blanco de agua.

Los oligonucleótidos usados para dicha reacción son los siguientes:

R1 (Reverso Común): 5'- CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA-3'

F1 (Frontal silvestre): 5'- ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG-3'

F2 (Frontal mutado): 5'-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT-3'

Por ensayo y error, el único parámetro que se varió fue la cantidad de oligonucleótidos; disminuyendola de 2,00 μL para R1 y 1,00 μL para F1 y F2 a 0,40 para R1 y 0,2 para F1 y R2; observando la misma sensibilidad con cantidades menores y la eliminación de inespecificidades por el exceso de oligonucleótidos. El resto de los parámetros (cantidad de ADN, concentraciones, temperaturas y tiempos de PCR) no requirió variaciones adicionales a las establecidas inicialmente.

Los fragmentos generados fueron de 364pb como control normal en todas las muestras y uno de 203 pb en los casos con la mutación *JAK2V617F*.

Las condiciones de reacción determinadas se presentan a continuación:

A) Cantidades de Reactivos para la reacción de PCR

Tabla 6.- Reactivos y cantidades de la reacción de PCR específico de alelo.

| Reactivo | Cantidad (μL) para 1 muestra | Concentración Final |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|
| Agua inyectable | 11.08 | ----- |
| Amortiguador 5X | 4 | 1X |
| dNTP's 2.5mM | 2 | 0.25mM |
| R1 10 μM | 0.4 | 0.2 μM |
| F1 10 μM | 0.2 | 0.1 μM |
| F2 10 μM | 0.2 | 0.1 μM |
| Polimerasa GoTaq® 5U/ μL | 0.12 | 0.03 U/ μL |
| ADN (50-415 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 2 | 5,0-41,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

B) Condiciones de termociclación para la reacción de PCR

| | | |
|--------|--------|-------------|
| 94°C → | 11 min | |
| 94°C → | 30 seg | } 36 ciclos |
| 58°C → | 30 seg | |
| 72°C → | 30 seg | |
| 72°C → | 6 min | |
| 4°C → | α | |

4.6. ESTANDARIZACIÓN DEL PCR ACOPLADO A RFLP.

La estandarización del método de PCR acoplado a RFLP se realizó mediante una reacción simple de PCR a partir de protocolos y procesos conocidos para esta metodología y variando las cantidades de reactivos, sustratos y las temperatura de alineación, por ensayo y error, para la amplificación de los productos ^[45]. Para la reacción de restricción con la enzima *BsaXI* se siguieron las indicaciones proporcionadas por el proveedor.

Durante las reacciones se usaron controles negativos de personas sanas (sin mutación *JAK2V617F*), los casos de ADN de los pacientes a analizar y un blanco de agua. Las muestras usadas para la reacción de amplificación debían contener preferentemente más de 100 µg ADN/mL para generar productos detectables por corte con la enzima de restricción.

Los oligonucleótidos usados para dicha reacción son los siguientes:

R2 (Reverso): 5'- ACC TTC TAC TTT TAA CTT CAT TGC TTT CCT-3'

F1 (Frontal): 5'- ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG-3'

Los fragmentos generados por amplificación correspondieron a un producto de 410 pb y luego del corte enzimático con *BsaXI*, los fragmentos fueron de 206 pb, 174 pb y 30 pb para los casos normales, cuando la mutación estaba presente entonces la enzima no reconocía el sitio de corte y se observó adicionalmente el de 410 pb. Cabe mencionar que el fragmento de 30pb no se observó por su tamaño pequeño que coincidía con el sitio de localización de los reactivos excedentes o remanentes.

Las condiciones para la reacción determinadas se presentan a continuación:

A) Cantidades de Reactivos para la reacción de PCR

Tabla 7.- Reactivos y cantidades de la reacción de PCR simple.

| Reactivo | Cantidad (μL) para 1 muestra | Concentración Final |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|
| Agua inyectable | 11.68 | _____ |
| Amortiguador 5X | 4 | 1X |
| dNTP's 10mM | 0.4 | 0.2 mM |
| R2 50 μM | 0.4 | 1 μM |
| F1 50 μM | 0.4 | 1 μM |
| Polimerasa GoTaq® 5U/ μL | 0.12 | 0.03 U/ μL |
| ADN (50-415 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 3 | 7,5-62,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

B) Condiciones de termociclación para la reacción de PCR simple

| | | | |
|--------|----------|---|-----------|
| 94°C → | 11 min | } | 35 ciclos |
| 94°C → | 30 seg | | |
| 58°C → | 30 seg | | |
| 72°C → | 30 seg | | |
| 72°C → | 6 min | | |
| 4°C → | α | | |

C) Condiciones para reacción de restricción con la enzima *BsaXI*

Los fragmentos amplificados por PCR simple, se sometieron a corte por enzima de restricción bajo las siguientes condiciones:

Tabla 8.- Reactivos y cantidades de la reacción de restricción con *BsaXI*.

| Reactivo | Cantidad (μL) para 1 muestra | Concentración Final |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|
| Agua inyectable | 6 | _____ |
| Amortiguador NEB 10X | 2 | 1X |
| Enzima <i>BsaXI</i> 2U/ μL | 2 | 0,2 U/ μL |
| Producto de PCR (7,5-62,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 10 | 3,75-31,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

**Incubación por 1 hora 10 minutos a 37° C.

4.7. PURIFICACIÓN.

Algunos de los casos resultantes positivos para la mutación *JAK2V617F* por los ensayos de PCR específico de alelo y PCR-RFLP fueron sometidos a purificación automatizada (*QIAquick Gel Extraction Kit*[®]). También se secuenció un caso negativo, como control.

Se obtuvieron de 2 a 3 bandas de ADN, por cada caso positivo y se siguió el procedimiento automatizado (**Figura 17**):



Figura 17.-Purificación automatizada de ADN (*QIAquick Gel Extraction Kit*[®]). Diagrama representativo del proceso automatizado para la extracción de ADN a partir de geles de agarosa.

A continuación se indican los reactivos utilizados y su función:

Columnas *QIAquick*: Columnas para la separación por afinidad con membrana de sílice. Dependen del pH y la concentración de sales.

QG: Amortiguador que solubiliza el gel de agarosa y condiciones de absorción óptimas (ácidas y alta concentración de sales). Contiene un indicador de pH en el que un color amarillo ($\text{pH} \leq 7.5$) indica condiciones óptimas para la absorción de ADN y un color violeta o anaranjado ($\text{pH} > 7.5$) requiere la adición de unas gotas de acetato de sodio 3M para acidificar.

PE: Amortiguador que permite el lavado de la muestra para la eliminación de oligonucleótidos e impurezas como sales, enzimas, nucleótidos libres, agarosa, colorantes, bromuro de etidio, aceites, y detergentes (DMSO, Tween® 20). *PE* contiene etanol para la eliminación de sales por centrifugación.

EB: Amortiguador (Tris*Cl 10mM, pH=8.5) para la elución eficiente de ADN (condiciones básicas y concentración baja de sales). En este caso, no se usó dicho amortiguador y se substituyó por agua para evitar inhibición de reacciones subsecuentes de la secuenciación.

4.8. SECUENCIACIÓN.

Los productos purificados se enviaron al Instituto de Fisiología Celular, UNAM para someterse a reacción de Big Dye® y secuenciación directa.

5. RESULTADOS

En el periodo de agosto de 2010 a mayo de 2011 se procesaron en el laboratorio, para este fin, 80 muestras de pacientes con sospecha clínica de neoplasias mieloproliferativas clásicas. En la **Tabla 9** se observa el tipo de muestras empleadas y el anticoagulante en el que se encontraban y en la **Tabla 10** los métodos de extracción efectuados, así como el intervalo de concentración que se determinó por espectrofotometría (260nm); los datos corresponden a las 80 muestras analizadas.

Tabla 9.- Tipo de muestra y anticoagulante usados. Se muestra el tipo de muestra y el anticoagulante usados para las muestras de los 80 pacientes analizados. mo=médula ósea; sp=sangre periférica

| Tipo de Muestra | mo | sp | mo/sp |
|-----------------|----------|------|---------------|
| N=80 | 32 | 38 | 10 |
| Anticoagulante | Heparina | EDTA | Heparina/EDTA |
| N=80 | 11 | 21 | 48 |

Se obtuvo ADN por al menos uno de los tres métodos ya descritos: 4 por método automatizado (QIAcube®), 1 por extracción salina, 8 por extracción orgánica (TRIzol®), 10 por salino y orgánico, 11 por automatizado y salino, 5 por automatizado y orgánico y 41 por los tres métodos (**Tabla 10**).

Se llevó a cabo la evaluación de la calidad de ADN de todas las muestras por visualización en gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE 1X como se muestra en la **Figura 18**.

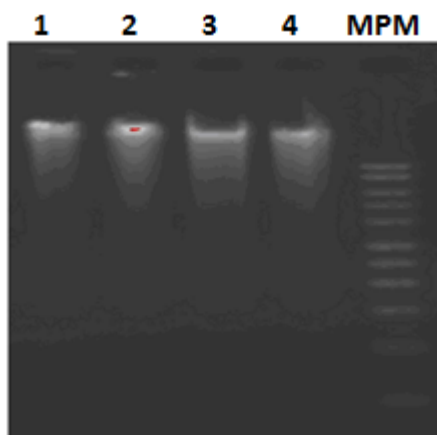


Figura 18.- ADN genómico de alto peso molecular visualizado por electroforesis en gel de agarosa. De izquierda a derecha, los pozos 1-4 corresponden al ADN genómico de muestras diferentes, en el pozo 5 se colocó un marcador de peso molecular comercial (MPM) que va de 100 en 100 pares de bases observando que el producto es >1000 pb.

También cuantificó en ADN presente en todas las muestras extraídas, encontrando las siguientes cantidades: 7-256 µg/mL por método automatizado, 33-415 µg/mL por método salino y 5-319 µg/mL por método orgánico (**Tabla 10**).

Tabla 10.- Método de extracción de ADN efectuado. Se muestran los métodos de extracción de ADN llevados a cabo para las muestras de los 80 pacientes analizados; el intervalo de concentración se refiere a todas las muestras extraídas por dicho método. A=automatizado; S=Salino; O=Orgánico.

| Método de Extracción | Número de Muestras | Intervalo de Concentración |
|------------------------------|--------------------|----------------------------|
| | N=80 | µg/mL |
| Automatizado | 4 | 7-256 |
| Salino | 1 | 33-415 |
| Orgánico | 8 | 5-319 |
| Salino/Orgánico | 10 | |
| Automatizado/Salino | 11 | |
| Automatizado/Orgánico | 5 | |
| Automatizado/Salino/Orgánico | 41 | |

Se analizó una de las muestras por cada caso mediante la reacción de PCR específico de alelo para la detección de la mutación *JAK2V617F*.

Luego se revisó cuales de las muestras habían presentado algún transcrito de fusión del gen *BCR-ABL* y/o cromosoma Filadelfia por cariotipo (como se mencionó en la sección 4.1.), que generan positividad para el NMP clásico denominado LMC; se encontró que de las 80 muestras totales, 25 fueron LMC (*BCR-ABL*) positivas de las cuales, 2 poseían la mutación *JAK2V617F* simultáneamente ^[55,88] (Figura 19).

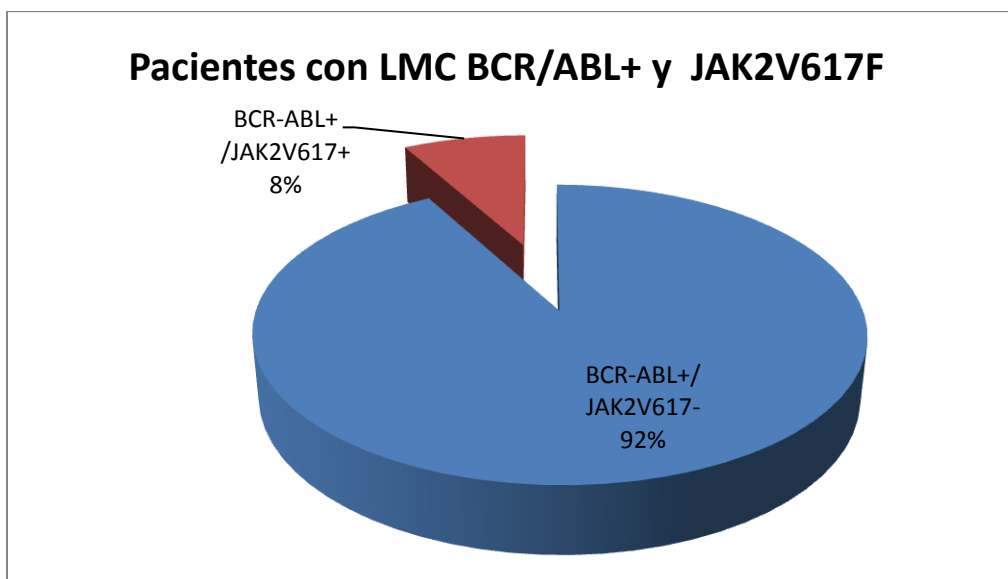


Figura 19.- Pacientes con LMC positivos para la mutación JAK2V617F. De los 25 pacientes positivos para *BCR-ABL*, 2 poseían adicionalmente la mutación *JAK2V617F*, lo cual corresponde al 8%

Los dos casos positivos correspondían a muestras de sangre periférica, una de un paciente femenino con 55 años de edad y la otra de uno masculino con edad de 60 años. Las características de los pacientes *BCR-ABL+/JAK2V617F+* se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11.- Datos de pacientes con NMP (*BCR-ABL+/JAK2V617F+*). Se muestran los datos de los pacientes y controles; así como el diagnóstico clínico de NMP y los métodos de extracción empleados. Abreviaturas: A=Método de extracción automatizado, S= Método de extracción salino, O= Método de extracción orgánico.

| Caso | Control A | Control B | Control C | 1 | 2 |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Edad | 41 | 24 | 23 | 55 | 60 |
| Género | M | F | M | F | M |
| Diagnostico Clínico | Ninguno | Ninguno | Ninguno | SXMPC | SxMPC |
| Fase de la enfermedad | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Basal | Basal |
| Tipo de transcrito | Ninguno | Ninguno | Ninguno | b3a2+ | b3a2+ |
| Carga BCR-ABL/BCR | Ninguno | Ninguno | Ninguno | 4.8% | 12.5% |
| Cariotipo | 46, XY | 46,XX | 46,XY | 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[8]/ Hiperdiploidía (>50 cromosomas)[5]/46,XX[7] | 46,XY,t(9;22)(q32;q11)[16/mo] |
| Tipo de muestra | sp | sp | Sp | Mo | sp, mo |
| Anticoagulante | EDTA | Heparina | Heparina | EDTA | EDTA, Heparina |
| Método de extracción | S | S, O | S, O | O, A | S, O, A |

El caso 1, mostrado en la Tabla 11, *BCR-ABL(+)/JAK2V617F(+)* fue secuenciado para corroborar los resultados generados por ambos métodos estandarizados, el electroferograma generado se muestra en la Figura 20.

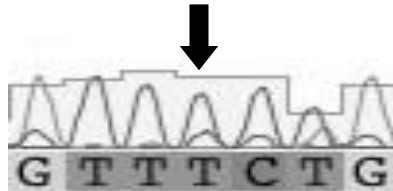


Figura 20.- Fragmento del electroferograma de *JAK2* en el paciente #1 *BCR-ABL+/JAK2V617F+*. Se indica, con una flecha, la base nitrogenada mutada con la transversión de guanina por timina que dá origen a *JAK2V617F*.

Por otro lado, se obtuvieron 55 muestras que correspondieron a pacientes adultos con NMPs negativos para la fusión *BCR-ABL* que se encontraba en un intervalo de edades de 21-88 años y con promedio de 66.3 años; de ellos, 29 fueron femeninos (52.7%), 23 masculinos (41.8%) y para 3 pacientes no se obtuvo este dato (5.5%).

De las 55, se obtuvo el ADN de 14 muestras en anticoagulante EDTA, 7 en heparina y 34 en ambos; además, 25 correspondieron a sangre periférica, 23 a médula ósea y 7 de ambos tipos de muestra.

Todas las anteriores se evaluaron mediante una reacción PCR específico de alelo (Figura 21) en una muestra distinta a la analizada en el primer ensayo siempre que fue posible (es decir, obtenida por un método de extracción diferente) para cada caso. Después se sometieron a la prueba de PCR acoplada a RFLP (Figura 22), obteniendo resultados concordantes a los observados en el primer caso. Adicionalmente, se usaron 3 controles de ADN negativos para *JAK2V617F* extraídos de personas sanas, a partir de anticoagulante EDTA, del género femenino con 41, 24 y 23 años de edad.

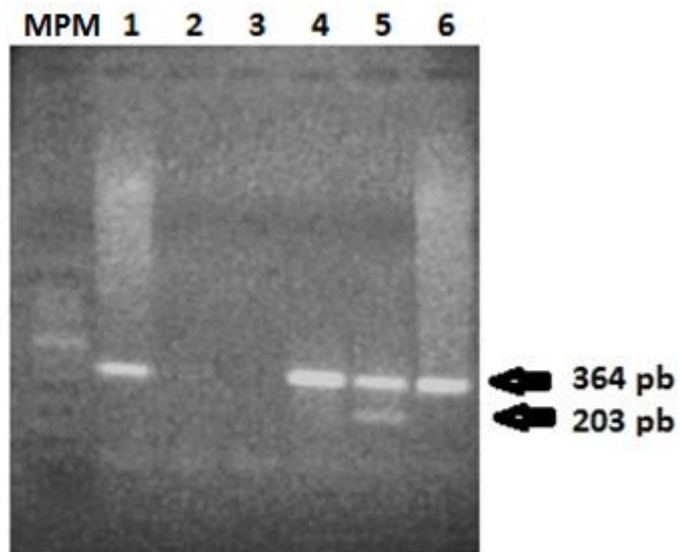


Figura 21.- PCR específico de alelo. De izquierda a derecha: MPM) Marcador de peso molecular de 100pb, 1) Control negativo, 2) Muestra no valorable, 3) Blanco de agua 4) Caso negativo, 5) Caso positivo (*JAK2V617F*), 6) Caso Negativo.

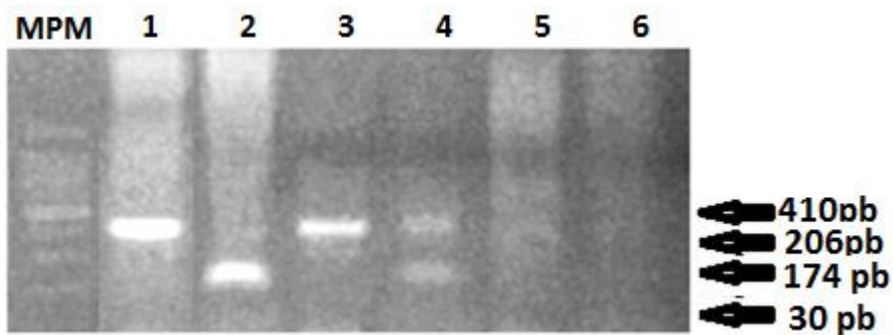


Figura 22.- PCR acoplado a RFLP. De izquierda a derecha: MPM) Marcador de peso molecular de 100pb, 2 y 3) Control negativo, 4,5) Caso positivo (*JAK2V617F*), 6 y 7) Blanco de H₂O. En los pozos 1,3 y 5 se muestran los casos luego de someterse a reacción de PCR. En 2,4 y 6 se observan las muestras luego de someter a digestión con la enzima *BsaXI*.

Mediante ambos ensayos se detectó la mutación *JAK2V617F* en 16 pacientes (29%) y los 39 restantes (71%) fueron negativos para la mutación (Figura 23).

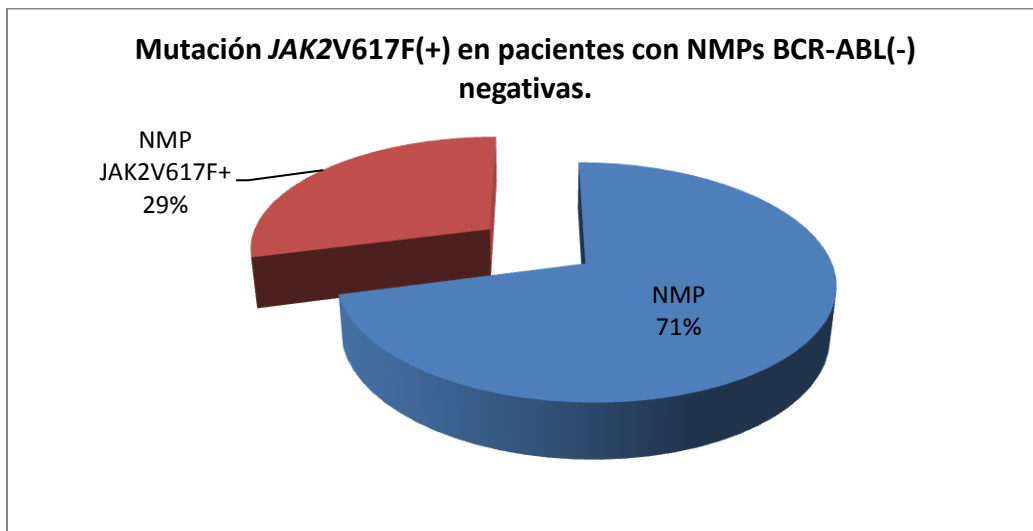


Figura 23.- Mutación *JAK2V617F* en pacientes con NMPs (negativos para *BCR-ABL*). De los 55 pacientes con NMPs y negativos para *BCR-ABL*, 16 poseían la mutación *JAK2V617F* que corresponde al 29%.

Las características de los 16 casos positivos tanto para PCR específico de alelo como para PCR-RFLP se muestran en la Tabla 9. De estos, 11 correspondieron a muestras de sangre periférica, 4 a médula ósea y 1 de ambos tipos de muestras; y 6 se encontraban anticoagulante EDTA, 3 en heparina y 7 en ambos tipos de anticoagulante. Además, 1 caso se extrajo por método automatizado, 5 por método orgánico, 3 por salino y automatizado; y 7 por salino, orgánico y automatizado.

Tabla 12.- Datos de pacientes con NMP (negativos para *BCR-ABL*). Se muestran los datos de los pacientes y controles; así como el diagnóstico clínico de NMP y los métodos de extracción empleados. Abreviaturas: A=Método de extracción automatizado, S= Método de extracción salino, O= Método de extracción orgánico.

| Caso | Edad | Género | Dx. Clínico | Muestra | Anticoagulante | Método de Extracción |
|---------|------|--------|-------------|---------|----------------|----------------------|
| Control | 41 | M | Ninguno | sp | EDTA | S |
| Control | 24 | F | Ninguno | sp | Heparina | S,O |
| Control | 23 | M | Ninguno | sp | Heparina | S,O |
| 1 | 63 | M | NMP | sp | EDTA | O |
| 2 | 85 | ? | LMC vs TE | sp | EDTA | O |
| 3 | 62 | F | NMP | sp | EDTA | O |
| 4 | 88 | M | TE | mo | EDTA | O |
| 5 | 72 | F | NMP | sp | Heparina | A |
| 6 | 65 | F | NMP | sp | EDTA | O |
| 7 | 62 | F | NMP | mo | EDTA, Heparina | S, O, A |
| 8 | 78 | ? | NMP | sp | EDTA | S, O, A |
| 9 | 56 | F | NMP | sp | EDTA, Heparina | S, O, A |
| 10 | 72 | M | NMP | sp | Heparina | S, A |
| 11 | 63 | F | NMP | sp | EDTA, Heparina | S, O, A |
| 12 | 70 | M | NMP | mo | EDTA, Heparina | S, O, A |
| 13 | 36 | F | NMP | mo, sp | EDTA, Heparina | S, O, A |
| 14 | 77 | F | PV | mo | Heparina | S, A |
| 15 | 42 | M | NMP | sp | EDTA | S,A |
| 16 | 70 | M | NMP | sp | EDTA, Heparina | S, O, A |

Dichos pacientes presentaron edades de 36 a 88 años, con un promedio de 57.5 años; y de ellos, 11 (65%) fueron femeninos y 6 masculinos (35%) (Figura 24).

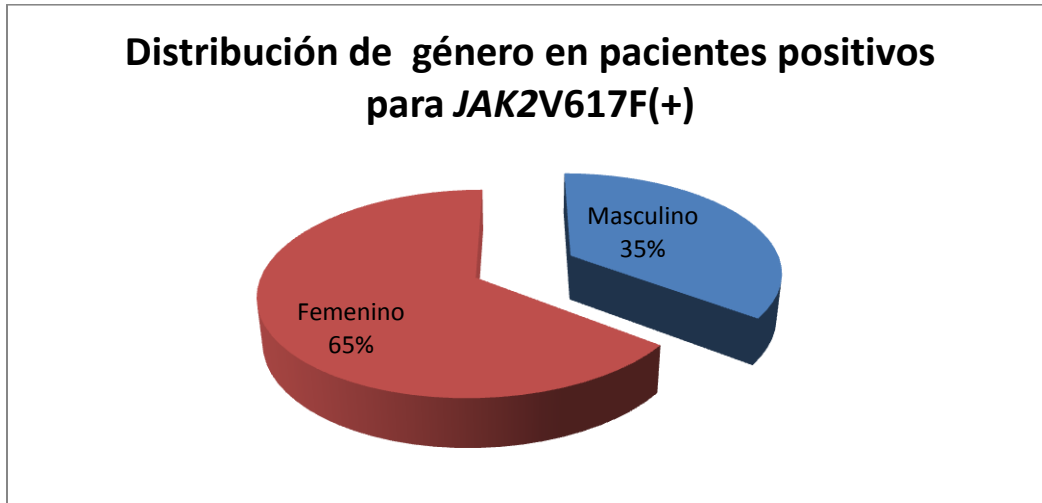


Figura 24.- Distribución de género en pacientes positivos para JAK2V617F. La mutación se presentó en el 65% del género femenino y sólo en el 35% de pacientes masculinos.

Finalmente, 9 de las 16 muestras positivas para estos NMP clásicos se secuenciaron para la corroboración de resultados y se encontró la sustitución de guanina (G) por timina (T) en los 8 casos. Las muestras corresponden a los pacientes 1-9 de la Tabla 12; en orden ascendente, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo (Figura 25).

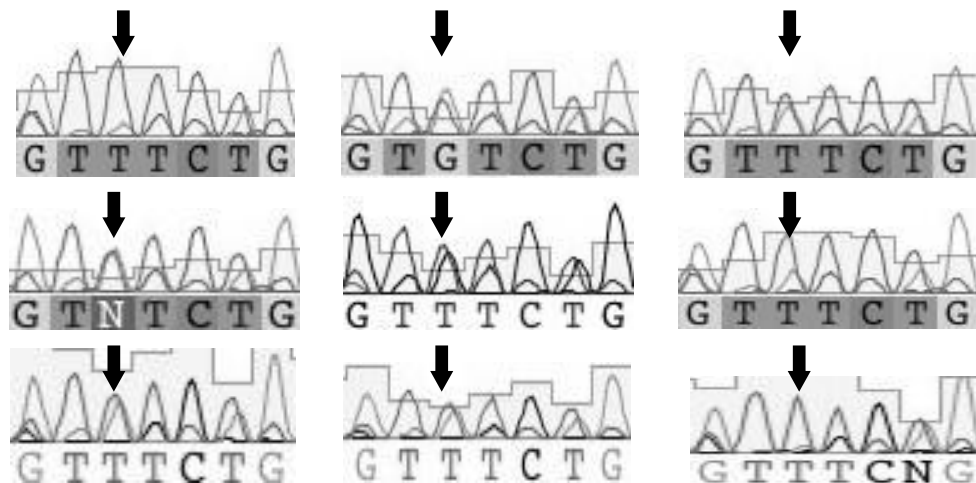


Figura 25.- Fragmentos de los 9 electroferogramas de JAK2 en NMPs. Se indica, con una flecha, la base nitrogenada mutada por la transversión de guanina/timina, dando origen a JAK2V617F por la transversión en los 9 casos secuenciados que corresponden a los pacientes 1-9 de la Tabla 12 (de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) con NMPs negativas para BCR-ABL.

De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: en el segundo fragmento de la Figura 25, se encuentra la base G (normal) pero al analizar la gráfica se observa el pico de T (mutado) en la misma posición (pero no indicado por presentarse en proporción ligeramente menor); en el cuarto fragmento se observa una letra “N”, pero nuevamente en la gráfica se observa el pico que corresponde a T (mutado).

Adicionalmente, uno de los casos negativos para *JAK2V617F* también fue secuenciado usando los oligonucleótidos frontal y reverso, observando la presencia de la base silvestre, guanina (G) (Figura 26).

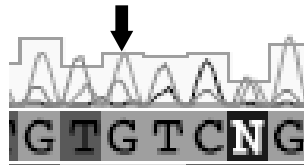


Figura 26.- Fragmento del electroferograma de *JAK2* en un NMP negativo para *JAK2V617F*. Se indica, con una flecha, la base nitrogenada normal (G) en uno de los pacientes que resultó negativo para *JAK2V617F* tanto por PCR específico de alelo como para RFLP.

6. DISCUSIÓN.

Como ya se ha mencionado, el gen *JAK2* posee un papel importante en las vías de señalización celular relacionadas con mecanismos de proliferación y apoptosis; de esta forma, cualquier anomalía que en éste ocurra afectará en alguna forma el fenotipo involucrado en el crecimiento y desarrollo normal de las células. La adquisición de mutaciones diversas y variadas en dicho gen se han relacionado con muchas patologías, entre ellas las neoplásicas que producen aumento en los procesos proliferativos y/o disminución en los apoptóticos.

En el año 2005 surgieron varios reportes relacionados con el estudio de la mutación *JAK2V617F* en pacientes con NMPs, sugiriendo su presencia en los padecimientos clásicos negativos para el gen de fusión *BCR-ABL*, un indicador patognomónico de LMC; sin embargo, en años subsiguientes se han reportado casos aislados para la detección simultánea de *JAK2V617F* con la fusión *BCR-ABL* en LMC, siendo esta última el marcador genético debido a la traslocación recíproca y balanceada entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)].

La mayor incidencia reportada con valores de hasta el 97% de *JAK2V617F* en pacientes, corresponde al padecimiento denominado policitemia vera pero a pesar de su relevancia no se considera un marcador genético específico de la enfermedad pues también se presenta en alrededor del 50% de los pacientes con trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria; además de incidencia mucho menor en otros síndromes mieloproliferativos. PV, TE y MFP poseen características comunes debido a que la proliferación celular descontrolada se origina por la mutación en un progenitor oligopotente común de la línea mieloide y que genera diferentes fenotipos pero con algunas características similares por el tipo principal de células diferenciadas y presentes en circulación periférica (detectadas por técnicas histológicas y citométricas).

En este trabajo se detectó la mutación *JAK2V617F* que ocurre en el exón 14 de *JAK2* y que de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OMS (2008) se considera un criterio principal para la identificación de NMPs clásicas y negativas para *BCR-ABL*; además en nuestro país no existen datos disponibles con respecto a la incidencia de la mutación y representa un candidato importante como blanco terapéutico en el diseño y desarrollo de fármacos para el tratamiento futuro de estos padecimientos ya que actualmente no se cuenta con fármacos específicos y sólo existe un grupo pequeño de moléculas en estudios clínicos principalmente de fase II y una sola molécula reportada en fase III.

Aunque en torno a este tema no hay información ni evidencias concretas, se hipotetiza que *JAK2V617F* no es la mutación primaria en dichos desórdenes y que existe una mutación "pre-*JAK2*"; sin embargo, 1) se desconoce(n) la(s) mutación(es) iniciadora y

precedentes a ella y 2) *JAK2V617F* está relacionada con el fenotipo de la enfermedad y es de gran interés por las razones mencionadas en el párrafo anterior.

Siendo así, el presente trabajo se ha enfocado en la estandarización de dos métodos, uno con alta sensibilidad (PCR específico de alelo) y el otro altamente específico (PCR acoplado a RFLP) para la detección de *JAK2V617F*, partiendo de protocolos previamente reportados y adaptando a las condiciones del laboratorio en el que se llevaron a cabo las pruebas [45].

Durante la estandarización se usaron de 5 a 7 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de neoplasias mieloproliferativas y con datos de negatividad para el gen de fusión *BCR-ABL*. Para el control de los ensayos (PCR específico de alelo y acoplado a RFLP), en cada prueba se usó un blanco de agua y un control negativo de una persona sana (sin la mutación *JAK2V617F*).

Para la obtención de ADN se realizó la extracción a partir de muestras de médula ósea y/o de sangre periférica ya que existen reportes de estudios previos en los que no se han detectado diferencias significativas en cuanto a la carga mutacional por comparación entre ambos tipos de muestra [60]; se extrajeron aplicando de 1 a 3 de los métodos descritos previamente en dependencia de la cantidad de muestra disponible.

Posteriormente, para el control de calidad del proceso se evaluaron cada uno de los productos obtenidos mediante visualización en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1X, los productos de buena calidad y útiles para los ensayos posteriores se observaron como se ejemplifica en la Figura 17; sin embargo, bandas muy tenues o con un barrido de ADN en el gel representan un producto con poca cantidad y degradado, respectivamente.

También se evaluó la cantidad de los productos a través de su cuantificación espectrofotométrica a 260 nm porque, como es sabido, los ácidos nucleicos poseen en el rango de luz UV un máximo a dicha absorbancia debido a su estructura cíclica de enlaces dobles conjugados. Se realizó adicionalmente la lectura de absorbancia a 280nm para la medición de proteínas presentes y, de acuerdo a relación A_{260}/A_{280} , se consideró si la muestra era o no óptima para su uso en ensayos posteriores, además de tomar en cuenta la cantidad (considerando una concentración teórica o estándar de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Mediante la cuantificación de las 80 muestras y para todos los métodos de extracción se encontraron cantidades de 7-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por método automatizado, 33-415 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por el salino y 5-319 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por el orgánico, dicha variabilidad es atribuida al tiempo que llevaba la muestra de ser extraída, el grado de mieloproliferación en los pacientes y de la forma en que se efectuó el proceso mismo de extracción (Tabla 10).

Con el método estandarizado PCR específico de alelo se evaluaron tres muestras: una positiva y una negativa para *JAK2V617F* y un control negativo mediante diluciones seriadas de 180- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, visualizando bandas muy similares (en cuanto a intensidad) en el gel de agarosa para el ensayo; para PCR-RFLP se encontró que algunas muestras con

cantidades de ADN menores a 100 µg/mL el fragmento era amplificado pero indetectable después del corte con la enzima de restricción *BsaXI*, por lo que se estableció usar muestras con cantidades mayores a 100 µg/mL. Con respecto a esta información puede decirse que el método específico de alelo tiene sensibilidad elevada y puede asegurarse que aunque se tengan muestras con carga baja de alelo mutado la misma será detectada, pues, en una muestra que tenía 7 µg/mL la mutación fue observada; como desventaja para PCR-RFLP el hecho de que los fragmentos no sean observados en muestras con concentraciones bajas se atribuye a que la cantidad amplificada es digerida en fragmentos de menor tamaño que, en ocasiones (por positividad) son divididos en dos tamaños de banda (digerida/no digerida) perdiendo sensibilidad de detección visual; sin embargo, PCR-RFLP se trata de un método altamente específico.

Como ya se mencionó, en las muestras donde se tenían más de 300 µg/mL de producto se observó una inhibición de las reacciones de PCR, optando por diluir las muestras a cantidades entre 100-200 µg/mL; sin embargo, gracias a que la mayoría de los casos fueron extraídos por más de un método, éste no representó un problema mayor.

La identificación de *JAK2V617F* requirió la amplificación de un fragmento de ADN correspondiente al gen *JAK2* que incluyera el sitio susceptible a la mutación *JAK2V617F*, y que, como se sabe, ocurre en el exón 14 haciendo posible el uso de ADN genómico.

Las cantidades y condiciones de reacción para los dos métodos estandarizados, se muestran en la sección de resultados. Debido a la elevada sensibilidad en el ensayo de PCR específico de alelo fue posible el uso de cualquier muestra observando amplificación óptima tanto del fragmento control (364pb) como del fragmento mutado (203pb) y para PCR-RFLP se seleccionaron las muestras con más de 100 µg/mL y aunque en casos con cantidades menores si fue valorable el resultado, se prefirió esta estrategia.

Una vez establecidos los criterios de inclusión de muestras valoradas, se sometió una de cada paciente al ensayo PCR específico de alelo y posteriormente, al revisar los resultados del transcrito de fusión *BCR-ABL* y/o cromosoma Filadelfia, se encontró que la mutación *JAK2V617F* estaba presente 2 de los 25 pacientes positivos para LMC, como alteración adicional. Los reportes disponibles ^(5, 88) sugieren que *JAK2V617F* se encuentra en la misma clona que genera la t(9;22) y por tanto la fusión *BCR-ABL*, pero que *JAK2V617F* ocurre antes. En la literatura se encontraron reportes de casos aislados en esta situación; sin embargo, los resultados aquí obtenidos (8% *BCR-ABL+//JAK2V617F+*) conducen a cuestionar la incidencia.

Se pretende la búsqueda de *JAK2V617F* en una población mayor de pacientes con LMC en diferentes fases de la enfermedad, el seguimiento de los que no presentan *BCR-ABL* pero si *JAK2V617F* (para comprobar la hipótesis de que la segunda mutación ocurre antes); así

como la relación de *JAK2V617F+ / BCR-ABL+* con el fenotipo de la enfermedad y la respuesta al tratamiento con Imatinib®, ampliamente usado en LMC.

Luego de las pruebas por PCR específico de alelo, las muestras fueron sometidas a PCR acoplado a RFLP, encontrando coincidencias en los 2 resultados positivos para *JAK2V617F*; como prueba adicional, una de las muestras positivas fue secuenciada (Figura 20) de manera que: 1) se comprobó la positividad a *JAK2V617F* obtenida en ambas pruebas y 2) se verificó la confiabilidad en la aplicación de ambos métodos.

De los 55 casos restantes con diagnóstico clínico de NMPs, los datos revisados mostraron negatividad para la t(9;22) y/o la fusión *BCR-ABL*. Entonces, una muestra distinta a la primera, en los casos posibles, fue sometida a una segunda prueba de PCR específico de alelo y al ensayo por PCR-RFLP, encontrando la presencia de *JAK2V617F* en 16 pacientes que corresponde a una incidencia del 29%, este valor no puede ser comparado, en forma estricta, con los valores porcentuales ya conocidos para cada padecimiento (PV, TE, MFP) de forma individual debido a que no fue posible obtener los datos clínicos acerca del diagnóstico final para cada caso; sin embargo, se pretende continuar con este estudio y llevar a cabo la recolección de información mayor para establecer la incidencia en los pacientes de la población mexicana.

Existe un estudio realizado en nuestro país por PCR específico de alelo, de población mestiza, del año 2006 ^[19] en el que, mediante el estudio de diversas enfermedades hematológicas (líneas linfocítica y mielocítica), se encontró una incidencia de *JAK2V617F* del 8.5%. Al obtener la incidencia sólo de los cuatro NMPs clásicos, se encontró un valor de 23%; muy parecido al obtenido en este estudio del 21.5%, a pesar de que el tamaño de la muestra en el estudio revisado fue de 27 pacientes en comparación con el nuestro de 80 pacientes.

En las tablas 11 y 12 se muestran los datos de los pacientes positivos para *JAK2V617F*, los métodos de extracción empleados y los resultados de sus muestras. Es importante resaltar que todos los pacientes fueron adultos y que durante ese periodo no se recibieron ni evaluaron muestras de niños con sospecha clínica de NMP.

El mayor porcentaje obtenido por presencia de la mutación *JAK2V617F*, de NMPs clásicos y negativos para *BCR-ABL*, corresponde al género femenino con una incidencia del 65%, a pesar de que en el grupo de estudio los porcentajes entre género eran muy similares: 52.7% en mujeres contra 41.8% en hombres, además de que en el 5.5% restante no se obtuvo el dato de ésta característica. Se considera importante que la incidencia entre géneros sea evaluada en una población mayor de pacientes y evaluar si existe alguna relación entre el género, la incidencia de la mutación y el fenotipo de la enfermedad.

El ensayo de PCR específico de alelo mostró amplificación en muestras con hasta 5 µg/mL de ADN genómico, tanto del fragmento control de *JAK2* (364pb) como del fragmento mutado (203 pb); en la literatura se reporta una sensibilidad del 0,01% y, en análisis

posteriores, por PCR en tiempo real se pretende la búsqueda del límite de detección tanto en líneas celulares como en muestras analizadas.

En cuanto a los métodos de extracción se puede decir que cualquiera de los tres es de utilidad para su aplicación por PCR específico de alelo, pero para la prueba de PCR-RFLP son convenientes las extracciones salina y orgánica ya que, mediante el método automatizado, por lo general, se obtienen muestras muy puras pero en baja concentración generando en ocasiones resultados poco claros o no valorables.

Con respecto a los anticoagulantes, se sabe que el EDTA es la mejor opción para muestras con aplicación en biología molecular, sobretodo si se someten a reacciones con enzimas ya que los componentes químicos de otros anticoagulantes que no son eliminados durante los métodos de extracción pueden inhibir algunas reacciones enzimáticas; sin embargo, en este caso no se observó influencia del anticoagulante usado. En la Tabla 12 de resultados puede verse que se generaron resultados similares en las muestras de un mismo paciente y tomadas con uno u otro tipo de anticoagulante, tanto para resultados positivos como negativos por PCR específico de alelo; pero para PCR-RFLP aunque el ensayo sólo se realizó una vez, se ve aún en muestras con heparina, los resultados coinciden con los de las muestras en EDTA.

Con respecto a los métodos estandarizados, debe tomarse en cuenta que, como en todo ensayo analítico, existe el riesgo de generar resultados falsos, sobretodo cuando son de sensibilidad elevada. Para el caso de PCR específico de alelo el riesgo de falsos positivos puede generarse por la unión inespecífica del oligonucleotido para el alelo mutado en la secuencia normal; para PCR-RFLP también pueden generarse falsos positivos cuando el tiempo de digestión con la enzima es insuficiente ya que la enzima sólo reconoce un fragmento en la secuencia normal y la digiere, pero no cuando la mutación está presente.

Finalmente, y como prueba para corroboración de los resultados obtenidos, los 9 primeros casos, de los 16 casos positivos para *JAK2V617F* y 1 de los 39 negativos, fueron secuenciados, mostrando la sustitución de guanina (silvestre) por timina (mutado) en la posición 1849 de la secuencia de ADN genómico de *JAK2* mutado, y no así en la muestra normal. Así se demostró, que los dos métodos estandarizados son técnicas confiables, y con sensibilidad y especificidad elevadas para el estudio de *JAK2V617F*.

A pesar de que la OMS (en su actualización 2008) considera la identificación de *JAK2V617F* como un criterio principal en el diagnóstico de NMPs muchos autores sugieren que los métodos altamente sensibles no poseen aplicación clínica y que se prefiere el uso de métodos menos sensibles como secuenciación y dHPLC; sin embargo, la búsqueda de esta mutación es útil para determinar la incidencia y la prevalencia en nuestro país, ampliar la información acerca de su relación con el fenotipo de la enfermedad y es un campo importante de estudio para el diseño y desarrollo de opciones farmacológicas usando a la

cinasa de tirosina generada por *JAK2* como blanco farmacológico que resultaría útil en el tratamiento por inhibición en la proliferación de la clona mutada de forma similar al éxito generado por Imatinib® en el tratamiento de LMC que permite lograr remisión hematológica y citogenética del padecimiento.

En el tratamiento de pacientes con NMP positivos para *JAK2V617F* se ha observado que el tratamiento con Imatinib® no genera efectos positivos en los pacientes si no al contrario, parece ser un estimulante para la generación de anormalidades citogenéticas adicionales en los cariotipos de los pacientes; sin embargo, se ha encontrado remisión hematológica en los pacientes con otras mutaciones como las del exón 12 de *JAK2* haciendo relevante, nuevamente, el uso de fármacos inhibidores y específicos para *JAK2*; recordando que en la actualidad, sólo una molécula se encuentra en ensayos clínicos de fase III.

Como estudios posteriores, en las áreas de biología molecular y farmacología se han considerado:

- 1) El análisis de la mutación en muestras de plasma, ya que la literatura reporta mayor carga de alelo mutado en este tipo de muestras aumentando así la sensibilidad y haciendo más confiables otros métodos como la secuenciación o los mismos aquí estandarizados, pero con baja carga mutacional.
- 2) Los cuantitativos para *JAK2V617F* mediante PCR en tiempo real para determinar la carga de alelo mutado y establecer relaciones por respuesta a diferentes tratamientos.
- 3) La búsqueda de mutaciones en todos los exones de *JAK2* en pacientes con NMPs.
 - 4) El uso de microarreglos para establecer relaciones génicas y su efecto en las vías de señalización implicadas.
 - 5) El estudio y correlación de alteraciones citogenéticas adicionales en NMPs.
 - 6) El establecimiento de una base de datos con la mayor información posible y la generación de información que posea aplicabilidad clínica para mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Un punto más de relevancia a considerar es la resistencia al tratamiento y la generación de mutaciones adicionales con fenotipo resistente, que seguramente será identificada en el futuro; lo que hace pensar en las vías de señalización implicadas y el desarrollo de nuevos ensayos de identificación para estas clona.

7. CONCLUSIONES.

- La estandarización de los métodos de PCR específico de alelo y de PCR-RFLPs en muestras de pacientes con NMP permite la detección de la mutación *JAK2V617F* con sensibilidad elevada; demostrado mediante un método de corroboración adicional, la secuenciación.
- No existen diferencias significativa para la detección entre muestra de médula ósea o de sangre periférica; así como entre las tomadas en anticoagulantes EDTA o heparina.
- Las NMP se encuentran con frecuencia elevada en pacientes adultos y, en este trabajo, no se identificó su presencia en niños.
- La incidencia de *JAK2V617F* fue del 8% de las muestras analizadas correspondientes a pacientes con LMC en fase crónica; lo que indica que puede presentarse con una mayor frecuencia a la reportada.
- La detección de *JAK2V617F* en NMPs, como prueba de rutina en el laboratorio representará una herramienta útil en el diagnóstico de los pacientes.
- Es necesario ampliar las investigaciones en torno a este tema ya que, en nuestro país no existen datos de incidencia para la población mexicana.

Este estudio continúa realizándose en LAOH, S.C para la obtención de mayor información clínica, la colección de una población mayor y establecer relaciones de los datos analíticos y clínicos en torno a *JAK2V617F*.

8. REFERENCIAS

- [1] Teferi, A. and Vardiman, J.W. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**, 14–22.
- [2] Kilpivaara, O. and Levine, R.L. (2008) JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia* **22**, 1813–1817.
- [3] James, C., Ugo, V., Casadevall, N., Constantines S., and Vainchenker, W. (2005) A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* **11**, 546-554
- [4] Konnie, M., and Fend F. (2009) Changed concepts and definitions of myeloproliferative neoplasms (MPN), myelodysplastic syndromes (MDS) and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in the updated 2008 WHO classification. *J Hematopathol* **2**, 205–210
- [5] Schwarz, J., Penka, M., Indrak, K., Pospisilova, D., Pytlık, R., Dulcıcek, P., Doubek, M., Kren, L., and Campr, V. (2008) The WHO 2008 classification of Ph myeloproliferative disorders: statement of the Czech MPD Working Group. *Leukemia* **22**, 2118–2119.
- [6] Vardiman, J., Harris, N. and Brunning, R. (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292-2302.
- [7] Radich, J. (2010) The Molecular Biology of Myeloproliferative Disorders. *Cancer Cell* **18**, 7-8
- [8] Bryder, D., Rossi, D. and Weissman, I. (2006) Hematopoietic Stem Cells. The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell. *Am J Pathol* **169**, 338–346.
- [9] Wahab, O., Manshour, T., Patel, K., Harris, K., Yao, J., Hedvat, C., Heguy, A., Bueso, C., Kantarjian, H., Levine, R., and Verstovsek, S. (2010) Genetic Analysis of Transforming Events That Convert Chronic Myeloproliferative Neoplasms to Leukemias. *Cancer Res* **70**, 447–52.
- [10] Steensma, D. (2006) JAK2 V617F in Myeloid Disorders: Molecular Diagnostic Techniques and Their Clinical Utility A Paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn* **8**, 397–411.
- [11] Kaushansky, K. (2005) On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* **105(11)**, 4187-4190.

[12] Levine, R., Pardanani, A., Tefferi, A. and Gary D. (2007) Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* **7**, 673-683.

[13] M.M. and Greer, J.P. *Wintrobe's clinical hematology*, (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009).

[14] Aguayo, A. and Couban, S. (2009) State-of-the-art in the management of chronic myelogenous leukemia in the era of the tyrosine kinase inhibitors: evolutionary trends in diagnosis, monitoring and treatment. *Leuk Lymphoma* **50 (2)**, 1-8.

[15] Lichtman, M.A. and Williams, W.J. *Williams hematology*, (McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York, 2006).

[16] Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz S. and Zhao, Z. (2005) Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *J Biol Chem* **280(24)**, 22788–22792.

[17] Polycythemia Vera

(http://www.ils.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/spanish/pdf/sp_polycythemiavera) (2007) The Leukemia & Lymphoma Society 1-10

Consultado el 8 de diciembre de 2010.

[18] Tiffany A., Sayeski W. and Sayeski, P. (2006) Jak2 Tyrosine Kinase A Mediator of Both Housekeeping and Ligand-Dependent Gene Expression? *Cell Biochem Biophys* **44**, 213-222

[19] Riuz, G., Garcés, J., Reyes, V., Ruiz, G., Navarro, M, González M. (2006) The Janus Kinase 2 (JAK2) V617F mutation in hematological malignancies in México. *Rev Invest Clin* **58(5)**, 458-461.

[20] JAKs.

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=S8188|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPECi.

Consultado el 18 de enero de 2011.

[21] Schindler, C. (2002) JAK-STAT signaling in human disease. *J. Clin. Invest.* **109**, 1133–1137.

[22] Tefferi, A. and Gilliland, G. (2005) JAK2 in Myeloproliferative Disorders is Not Just Another Kinase. *Cell Cycle* **4(8)**, 1053-1056.

[23] Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

<http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/JAK98.html>.

Consultado el 3 de febrero de 2011

[24] Hong, W., Park, I., Lee, E., Jong K. and Lee D. (2009) Comparative analysis of the JAK/STAT signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a

systems approach from *The Seventh Asia Pacific Bioinformatics Conference*. *BMC Bioinformatics* **10(1)**, S53.

[25] Webersinke, G., and Rumpold, H. (2009) Pathogenetic and clinical impact of JAK2 mutations in chronic myeloproliferative diseases. *Memo* **2**, 89–93.

[26] McLornan, D., Percy, M. and McMullin, M. (2006) JAK2 V617F: A Single Mutation in the Myeloproliferative Group of Disorders. *Ulster Med J* **75(2)**, 112-119.

[27] Timothy, C. and Greiner, MD. (2006) Diagnostic Assays for the JAK2 V617F Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol* **125**, 651-653.

[28] Lens, D., Muxi, P., Brugnini, A., Trías, N. and Pierri, S. (2007) Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. *Rev Med Urug* **23**, 122-125.

[29] Chen, A. and Prchal, J. (2010) JAK2 kinase inhibitors and myeloproliferative disorders. *Curr Opin Hematol* **17**, 110–116.

[30] Passamonti, F. and Rumi, E. (2009) Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica* **94(1)**, 1-10.

[31] Staerk, J., Kallinb A., Royer Y., Diaconu C., Dusa A., Demoulinb, B., Vainchenker W. and Constantinescu S. (2007) JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathologie Biologie* **55**, 88–91.

[32] Bryder, D., Rossi, D. and Weissman I. (2006) Hematopoietic Stem Cells. The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell. *Am J Pathol* **169**, 338–346.

[33] Fröhling, S., Lipka, D., Kayser, S., Scholl, C., Schlenk, R., Döhner, H., Gilliland, D., Levine, R. and Döhner K. (2006) Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood* **107**, 1242-1243.

[34] Ma, W., Kantarjian, H., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, Z., Verstovsek, S., and Albitar, M. (2009) Mutation Profile of JAK2 Transcripts in Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasias. *J Mol Diagn* **11**, 49–53.

[35] Krämer, A. (2008) JAK2-V617F and BCR-ABL—Double Jeopardy?. *Leuk Res* **32**, 1489–1490

[36] Krämer, A., Reiter, A., Kruth, J., Erben, P., Hochhaus, A., Müller, M., Cross, N., Jones A., Ho, A. and Hensel, M. (2007) JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* **8**, 658–60.

[37] Ribeiro, M., Lima, J., Megumi, M., Dorlhiac, P., Fischer, D. and Bendit, I. Simultaneous detection of JAK2 V617F mutation and Bcr-Abl translocation in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol* **88**, 243–245.

- [38] Levine, R., Loriaux, M., Huntly, B., Loh, B., Beran, M., Stoffregen, E., Berger, R. and Clark, J. (2005) The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **106**, 3377-3379.
- [39] Kralovics, R. (2008) Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms *Leukemia* **22**, 1841–1848.
- [40] Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A., Teo, S., Tiedt, R., Passweg, J., Tichelli, A., Cazzola, M. and Skoda R. (2005) A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med* **352**, 1779-90.
- [41] Langabeer, S., Ni, F., Ainle E., Conneally, E. and Lawler, M. (2007) Incidence and significance of the JAK2 V617F mutation in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Ir J Med Sci* **176**, 105–109.
- [42] Hardin, S. (2001) DNA Sequencing. *Encyclopedia of Life Sciences and Nature Publishing Group Introductory Article*, 1-6
- [43] Wilton, S. (2002) Direct Sequencing of PCR Products. *Encyclopedia of Life Sciences and Nature Publishing Group Introductory Article*, 1-8.
- [44] Metzker, M. and Caskey, T. (2001) Polymerase Chain Reaction (PCR) *Encyclopedia of Life Sciences and Nature Publishing Group Secondary Article*, 1-9.
- [45] Iland, H., Hertzberg, M., and Marlton, P. Myeloid Leukemia. Methods and Protocols. Métodos de detección de V617F en JAK2 en desórdenes mieloproliferativos humanos. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2006. pp 253-263
- [46] Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Strömbom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**, 95–125.
- [47] Schnittger, S., Bacher, U., Haferlach, C., Geer, T., Müller, P., Mittermüller, J., Petrides, P., Schlag, R., Sandner, R., Selbach, J., Rainer H., Werner, H., Wehmeyer, J., Kern, W and Haferlach, T. (2009) Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica* **94**, 414-418.
- [48] Goldin, L., Björkholm, M., Kristinsson, S., Samuelsson, J. and Landgren, O. (2009) Germline and somatic JAK2 mutations and susceptibility to chronic myeloproliferative neoplasms. *Genome Medicine* **1**, 55.1-55.3
- [49] Means, R. (2010) JAK2 V617F and the evolving paradigm of polycythemia vera. *Korean J Hematol* **45**, 90-4.
- [50] Williams, D., Kim, A., Rogers, O., Spivak, J. and Moliterno, A. (2007) Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol.* **35(11)**, 1641–1646.

- [51] Pesu, M., Laurence, A., Kishore, N., Zwillich, S., Chan, G., and O'Shea, J. (2008) Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol Rev.* **223**, 132–142.
- [52] Abdel, O., Manshouri, T., Patel, J., Harris, K., Yao, J., Hedvat, C., Heguy, A., Bueso, C., Kantarjian, H., Levine, R. and Verstovsek, S. (2010) Genetic analysis of leukemic transformation of chronic myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res.* **70(2)**, 447–452.
- [53] Sayyah, J. and Sayeski, P. (2009) Jak2 Inhibitors: Rationale and Role as Therapeutic Agents in Hematologic Malignancies. *Curr Oncol Rep.* **11(2)**, 117–124.
- [54] Walz, C., Cross, N., Van-Etten R. and Reiter, A. (2008) Comparison of mutated ABL1 and JAK2 as oncogenes and drug targets in myeloproliferative disorders. *Leukemia* **22**, 1320–1334.
- [55] Ammatuna, E., Ottone T., Zaza, S., Lavorgna, S., Grillo, R., Curzi, P., Panetta, P., Federici, G., Amadori, S., and Lo-Coco, F. (2007) Diagnostic refinement of chronic myeloproliferative disorders and thrombocytoses of unknown origin by multiple RT-PCR and capillary electrophoresis of BCR-ABL rearrangements and JAK2 (V617F) mutation. *Ann Hematol* **86**, 355–361.
- [56] Langabeer, S., Ni F., Conneally E and Lawler. (2007) Incidence and significance of the JAK2 V617F mutation in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Ir J Med Sci* **176**, 105–109
- [57] Ma, W., Kantarjian, H., Zhang, X., Yeh, C., Zhang, J., Verstovsek, S., O'Brien, S., Giles, F., Albitar, M. (2010) Plasma levels of JAK2 mRNA in patients with chronic myeloproliferative diseases with and without V617F mutation: implications for prognosis and disease biology. *Int. Jnl. Lab. Hem.* **32**, 95–102.
- [58] Greiner, T. (2006) Diagnostic Assays for the JAK2 V617F Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol* **125**, 651-653.
- [59] Vannucchi, A. (2010) JAK2 Mutation and Thrombosis in the Myeloproliferative Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep* **5**, 22–28.
- [60] Larsen, T., Pallisgaard, N., Møller, M., and Hasselbalchh. (2008) Quantitative assessment of the JAK2 V617F allele burden: equivalent levels in peripheral blood and bone marrow. *Leukemia* **22**, 194–195.
- [61] Bars, H., Boulland, M., Bareau, B., Grosbois, B., Corolleur, M., Lamy, T., and Fardel, O. (2010) Comparison of JAK2 V617F burden quantitation by two different quantitative-polymerase chain reaction methods. *Int. Jnl. Lab. Hem.*, 1-3.
- [62] Samanta, A., Lin, H., Sun, T., Kantarjian, H. and Arlinghaus, R. (2006) Janus Kinase 2: A Critical Target in Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Res* **66(13)**, 6468-72.

[63] Kiladjiana, J., Casadevallb, N., Vainchenker, V. and Fenauxa, P. (2007) The first international meeting on V617F JAK2 mutation and its relevance in Philadelphia negative myeloproliferative disorders. *Pathologie Biologie* **55**, 85–87.

[64] Rayburg, M., Davies, S., Mehta, P., Crockett, M. and Jodele, S. Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients. *Br J Haematol* **142**, 668–680.

[65] Griesshammer, M., Struve, S. and Barbui, T. (2008) Management of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders in pregnancy. *Blood Reviews* **22**, 235–245.

[66] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=15858187>

Consultado el 12-junio-2011

[67] http://www.incyte.com/drugs_product_pipeline.html

Consultado el 14-junio-2011

[68] http://www.pharmatimes.com/Article/10-06-30/Sanofi_to_buy_TargeGen_for_560_million.aspx

Consultado el 14-junio-2011.

[69] Soverini, S., Vitale, A., Poerio, A., Gnani, A., Colarossi, S., Lacobucci, I., Cimino, G., Elia, L., Lonetti, A., Vignetti, A., Paolini, S., Meloni, G., Maio, V., Papayannidis, C., Amabile, M., Guarini, A. Baccarani, M., Martinelli, G. and Foà, R. (2011) Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients already harbor BCR-ABL kinase domain mutations at low levels at the time of diagnosis. *Haematologica* **96(4)**, 552-557