

Detección de la mutación JAK2 V617F en neoplasias mieloproliferativas en población ecuatoriana por reacción en cadena de la polimerasa alelo específica

Mutation detection JAK2 V617F in myeloproliferative neoplasms ecuadorian population in polymerase chain reaction allele specific

Alfredo Campoverde Cisneros^{1*}

William Oliveros Alvear²

Inés Reyes Peña³

Bella Maldonado Guerrero⁴

Edgar Becerra Navarrete⁵

Verónica Ullauri Zambrano⁵

Esteban Villa Cárdenas⁶

Iralda Espinoza Calle⁷

Washington Ladines Castro⁸

Jennifer Chacón Vélez⁹

Mauro Arcentales Cayamcela¹⁰

1. Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca.
2. Servicio de Hematología OmniHospital, Blood Center. Guayaquil-Ecuador.
3. Servicio de Hematología Hospital Kennedy. IDYTES. Guayaquil-Ecuador.
4. Servicio de Hematología SOLCA. Guayaquil-Ecuador.
5. Hospital José Carrasco Arteaga del IESS. Cuenca-Ecuador.
6. Hospital José Carrasco Arteaga del IESS. Cuenca-Ecuador
7. SOLCA. Cuenca-Ecuador.
8. Clínica San Francisco. Guayaquil-Ecuador.
9. Asistente Bioncogen
10. Carrera de Laboratorio Clínico. Escuela de Tecnología Médica. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador.

*Autor para correspondencia: alfredo.campoverde@ucuenca.edu.ec

RECIBIDO: 14/04/2017

APROBADO: 16/11/2017

RESUMEN

En el año 2005, cinco grupos de investigación independientes describieron la asociación de la mutación V617F en el gen que codifica a la quinasa janus 2 (JAK2) con varias Neoplasias Mieloproliferativas (NMP), incluyendo la Policitemia Vera (PV), la Trombocitosis Esencial (TE) y la Mielofibrosis Primaria (MFP). El presente estudio tuvo como objetivo detectar la mutación JAK2 V617F en pacientes ecuatorianos a través de la reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (AS-PCR). El diseño de la investigación fue descriptivo de corte transversal e incluyó un total de 40 pacientes, 20 con NMP

ABSTRACT

In 2005, five independent research groups reported the association of V617F mutation in the gene encoding the janus kinase 2 (JAK2) Myeloproliferative Neoplasms Small (NMP), including polycythemia vera (PV), Essential thrombocytosis (ET) and primary myelofibrosis (MFP). This study aimed to detect the JAK2 V617F mutation in Ecuadorian patients through chain reaction polymerase allele specific (AS-PCR). The research design was descriptive cross-sectional and included a total of 40 patients, 20 with NMP and 20 controls attending the various services Haematology Health Institutions participating.

y 20 controles que acudieron a los distintos Servicios de Hematología de las Instituciones de Salud participantes. El material genético fue extraído y posteriormente amplificado por AS-PCR, mientras que el análisis clínico-hematológico de las NMP fue realizado por hematólogos especializados mediante examen clínico, morfológico y pruebas hematológicas como hemograma y citometría de flujo. La frecuencia de la mutación JAK2 V617F encontrada fue del 50% con un índice de confianza del 95%. Los pacientes con mayor presencia de la mutación (35%) fueron aquellos con PV, seguido de pacientes con TE (15%), siendo la edad promedio 45 años. Estos datos confirman que la mutación JAK2 V617F es frecuente en las NMP y se ha convertido en el marcador molecular tanto de la PV, TE y MFP. De igual forma con este estudio se ha demostrado que la AS-PCR es un método de diagnóstico rápido, fácil y rentable.

Palabras clave: JAK2 V617F; Neoplasias Mieloproliferativas (NMP); Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); Policitemia Vera (PV); Trombocitemia Esencial (TE); Mielofibrosis Primaria (MFP).

Genetic material was extracted and then amplified by AS-PCR, while the clinical hematology of NMP was performed by using specialized clinical, morphological and hematological tests such as blood counts and flow cytometry examination hematologists. The frequency of the JAK2 V617F mutation found was 50% with a rate of 95% confidence. Patients with a greater presence of the mutation (35%) were those with PV, followed by patients with TE (15%), the average age being 45. These data confirm that the JAK2 V617F mutation is prevalent in NMP and has become the molecular marker of both the PV, ET and MFP. Likewise, this study has shown that the AS-PCR method is a quick, easy and cost-effective diagnosis.

Keywords: JAK2 V617F; Myeloproliferative Neoplasms (NMP); Polymerase Chain Reaction (PCR); Polycythemia Vera (PV); Essential Thrombocytosis (TE); Primary Myelofibrosis (MFP).

INTRODUCCIÓN

Los síndromes mieloproliferativos crónicos, ahora llamados neoplasias mieloproliferativas (NMP), comprenden, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2008, las siguientes entidades: leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria (MFP), leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica, mastocitosis y las NMP inclasificables (Amaru Lucana y Vera Carrasco, 2016).

Janus kinase 2 es un miembro de la familia Janus de tirosina-quinásas citosólicas no receptoras, que incluye a JAK1, JAK3 y TYK2, la mutación JAK2V617F fue identificada en el año

2005 por varios grupos de investigación independientes, como una mutación recurrente en pacientes con NMP no leucémicas como PV, TE y MP (Amor-Vigil et al., 2013).

La mutación puntual está localizada en el exón 14 del gen Janus kinase 2 (JAK2) y juega un papel clave en la transducción de la señal JAK y como activador de la ruta de la transcripción (STAT). En la autofosforilación después de la activación de las moléculas ligando, JAK2 recluta moléculas STAT que luego se fosforilan y se translocan en el núcleo para actuar como factores de transcripción. La localización en la región 9p24 del cromosoma 9 descrita corresponde a una sustitución de una guanina por una timi-

na en el exón 14, posición 1849, que provoca el cambio del aminoácido valina por fenilalanina del codón 617 (V617F) produciendo activación del dominio tirosin-quinasa presente en más de 90% de los pacientes con policitemia vera (PV) y aproximadamente el 60% de los pacientes con trombocitemia esencial (ET) o mielofibrosis primaria (PMF) (Ancochea et al., 2014).

El gen JAK2 se clonó por primera vez en 1989 a partir de la biblioteca de ADNc de una línea celular hematopoyética murina. JAK2 tiene dos dominios importantes: JH1 y JH2. JH1, situado cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína, es el dominio quinasa activo y posee los residuos de tirosina, que están fosforilados cuando se activa JAK2. JH2, un dominio quinasa similar, carece de actividad real quinasa, más bien parece ejercer un efecto inhibitorio sobre JH1, confiere un crecimiento independiente de citosinas en las líneas celulares y se asocia con eritropoyetina y el crecimiento independiente de células primarias (Angona et al., 2015; Angona Figueras, 2017; Badrawy e Ibrahim, 2013).

JAK2 V617F está presente en diversos elementos hematopoyéticos mieloides, incluyendo precursores mieloides, pero no ha sido identificado en otros tejidos. Como se mencionó anteriormente, se ha identificado en tres de las NMP más comunes, en particular, la mutación V617F está presente en más del 90% de los casos de PV y en aproximadamente 50- 60% de las TE MFP. Esta mutación también se detecta en una pequeña fracción de otras neoplasias mieloides tales como la leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mieloides aguda y el síndrome mielodisplásico (Cano et al., 2014; Cervantes et al. 2013).

Para la detección de la mutación JAK2 V617F se han desarrollado varios métodos basados en la PCR que dependen tanto de la sensibilidad así como de de rapidez y facilidad de interpretación, dentro de estos se encuentran: PCR

alelo específica (AS-PCR), PCR para polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), análisis de fusión de alta resolución (HRM) que está siendo investigado y recientemente el método detector de enfriamiento (QP) una nueva técnica capaz de detectar polimorfismos de nucleótido único y mutaciones. Estos métodos poseen sensibilidades que van desde 0,01% a 5%, y cada uno tiene sus propias ventajas y desventajas, por ejemplo, no son lo suficientemente sensibles y dan resultados ambiguos, otros son sensibles, pero no específicos dan falsos positivos, algunos requieren de mucho tiempo y trabajo, o necesitan de equipo y reactivos especializados y costosos (Cano et al., 2014; Cruz Alemán et al., 2015)

De acuerdo con algunas investigaciones la AS-PCR constituye uno de los mejores métodos para la detección de la mutación JAK2 V617F los datos obtenidos demuestran 100% en términos de sensibilidad y especificidad se obtiene el 100% catalogando como una herramienta de gran diagnostico; mientras que QP es el método ideal en términos de rapidez y facilidad de interpretación, además de ser recomendado para la detección de JAK2 V617F dentro de los hospitales (Deadmond y Smith-Gagen, 2015)

El descubrimiento de la mutación JAK2 V617F ha llevado a la evaluación de varios medicamentos que presentan una actividad inhibitoria contra los miembros de la familia JAK principalmente contra JAK1 y JAK2, así se ha creado una terapia dirigida específicamente contra las NMP con excelentes resultados en el uso del Jakavi-Ruxolitinib (Novartis Oncology-Suiza). (Didone et al., 2015)

Considerando la importancia de la mutación de JAK2 V617F en pacientes con NMP y la ausencia de información sobre su prevalencia en Ecuador, se realizó este estudio con el objetivo de detectar mencionada mutación en pacientes ecuatorianos utilizando técnicas de

biología molecular como la AS-PCR, además de relacionar los datos obtenidos con la edad, sexo y diagnóstico hematológico del paciente y recomendar al médico tratante la mejor alternativa diagnóstica y terapéutica de inhibidores JAK para la monitorización y seguimiento de las NMP.

Investigaciones Internacionales

COREA 2014. Centro Médico Asan, Seúl desde enero de 2003 hasta abril de 2013. El estudio incluyó a 150 pacientes atendidos con los siguientes resultados 84 pacientes con ET, 50 pacientes con PMF, 7 pacientes con mielofibrosis post-vera policitemia (PV) post-ET o, y 9 pacientes con otras neoplasias mieloides con trombocitosis. Se investigaron los pacientes coreanos con trombocitemia esencial ET y mielofibrosis primaria PMF para determinar la prevalencia y correlaciones clínicas y de laboratorio de CALR / JAK2 / MPL mutaciones. De los 84 pacientes ET, CALR mutaciones se detectaron en 23 (27.4%) y se asociaron con trombocitosis y leucopenia que la mutación el JAK2 entre 50 pacientes PMF, CALR mutaciones se detectaron en 11 (22.0%) y también se asociaron con trombocitosis y mostraron una tendencia a una menor tasa de anomalías citogenéticas que la JAK2 mutación, V617F (Macrogen, 2017).

CHINA 2014, Primer Hospital Afiliado de la Universidad Soochow, Jiangsu Instituto de Hematología, Ministerio de Salud clave Laboratorio de Trombosis y Hemostasia, Hematología centro de innovación colaborativa, se realizó el seguimiento de 617 sujetos cuya edad radica entre 15 a 95 años, 399 (64,7%) presentan mutación JAK2 (V617F), 140 (22,7%) tenía una CALR exón 9 indel, 25 (4,0%) llevado a una mutación MPL (W515), y 53 (8,6%) no presentan mutación JAK2 , CALR, y MPL (la denominada triple negativo PMF). Los pacientes con CALR mutación tenían un menor riesgo de desarrollar anemia,

trombocitopenia y leucocitosis en comparación con otros subtipos. También tenían un menor riesgo de trombosis en comparación con los pacientes que llevan JAK2 (V617F) (Espínola Cano et al., 2014).

FRANCIA, Universite Paris-Saclay, Gustave Roussy, Paris, en el 2013, era evidente que el 55% de ET y 65-70% de los casos PMF estaban vinculados a JAK2 V617F y MPL. La activación de la vía del receptor de citoquina / JAK2 era una característica común. Más del 90% de no BCR-ABL MPNs están claramente impulsado por una activación de JAK2 anormal, especialmente el receptor de citosina / vías de JAK2. Los estudios genómicos demostraron que PMF es una forma más avanzada de la MPN, pero con una redundancia molecular con ET (Ancochea et al., 2014).

PAKISTÁN, Department of Hematology and Blood bank, Liaquat National Hospital and Medical College, Karachi, en este estudio fue determinar la prevalencia de la mutación V617F JAK-2 en pacientes paquistaníes con PV de 26 pacientes en el periodo comprendido entre enero de 2010 a diciembre de 2014. Se encontró que la frecuencia de JAK2 V617F positivo 92,3%. En general, el 30,7% de los pacientes eran asintomáticos y 69,3% restante se presentó con enfermedad sintomática y no hay correlación de JAK2 V617F podría establecerse con la edad o el sexo. La frecuencia de mutación JAK2 V617F en nuestros pacientes con PV fue similar a los reportados internacionalmente. La detección de la mutación en todos los casos sospechosos PV podría ser beneficioso en la diferenciación de pacientes con eritrocitosis reactiva y clonal (Brodsky et al., 2015).

POLONIA, Departamento de Hematología y los Trasplantes de la Universidad Médica de Gdansk, Gdansk, 2016 el estudio se realizó a un grupo de 90 pacientes consecutivos con diagnóstico de sospecha de la policitemia vera.

En el 91% de los casos, la JAK2 se identificó la mutación V617F. El resto de pacientes JAK2 V617F-negativas se sometieron a examen para JAK2 exón 12 por secuenciación directa de productos de PCR y la técnica de clonación. Estos exones 12 constituían el 50% de PV JAK2 grupo negativo V617F y 4,4% (de 90) de todos los pacientes con PV (JAK2 V617F-positivas y JAK2 V617F-negativo). Esto demuestra que la prevalencia de JAK2 mutaciones (V617F y en el exón 12) en los casos de PV (Kim et al., 2015)

ESPAÑA, en el Servicio de Hematología del Hospital del Mar de Barcelona, entre octubre de 1985 y diciembre de 2012 se diagnosticaron de forma consecutiva 214 pacientes. Las principales características clínico-biológicas de los pacientes en el momento del diagnóstico la edad media en el momento del diagnóstico fue de 64 años y predominio femenino (73%). El 54,5% de los pacientes presentaban algún FRCV, siendo el más frecuente la hipertensión arterial (HTA). En el momento del diagnóstico, el 66,4% de los pacientes se hallaban asintomáticos, y el 7% presentaba esplenomegalia palpable (Kim et al., 2013)

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, EE.UU en el periodo de 1973-2011 los datos obtenidos reflejan que las mujeres más jóvenes tenían un 13-33% más de riesgo de ET y que las mujeres menores de 34 tenían un 58% más de riesgo PMF, con relación a los hombres de raza negra, 35-49 años de edad con un riesgo más alto ET, también tenían un 69% más alto PMF riesgo relativo a los blancos (Leszczynska et al., 2016).

Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, Ciudad de México, se realizó la selección de 38 pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas atendidos de 2001 a 2014 que contaran con resultado del estudio para identificar la mutación JAK2 V617F. con los siguientes datos 55% (con trombocitemia esen-

cial, 32% con mielofibrosis primaria y 13% con policitemia vera. JAK2 V617F se reportó en 45% de los casos. La ausencia o existencia de JAK2 V617F no influyó en el cuadro clínico inicial, la detección de JAK2 V617F facilita el diagnóstico e incluso se dispone de tratamientos dirigidos a este blanco; sin embargo, en la población mexicana no es tan frecuente su manifestación.(18)

En el Servicio de Hematología de la Clínica Colón, Mar del Plata, Argentina,2016. Se incluyeron 33 pacientes con diagnóstico de PV, TE, MP, LMC y poliglobulia. Está descrito que alrededor de un tercio de los pacientes con PV, 20 a 30% de aquellos con MP y menos del 5% con TE, son homocigotas para la mutación JAK2 V617F. En el presente estudio en todos los casos en los que se ha encontrado la presencia de JAK2 V617F fue en estado heterocigota, de modo que en ninguno de los pacientes estudiados se ha llegado a la pérdida de heterocigosidad (Cano et al., 2014).

COLOMBIA. En el área de consulta externa de hematología del Hospital de San José desde enero de 2005 hasta mayo de 2010 un total de 34 pacientes con neoplasias mieloproliferativas (NM) cromosomas Filadelfia negativas fueron identificados. El principal diagnóstico encontrado fue de trombocitemia esencial en 17 pacientes (50%), policitemia Vera Rubra en seis pacientes (17.6%), neoplasia mieloproliferativa asociadas a eosinofilia en seis pacientes (17.6%), mielofibrosis primaria en tres pacientes (8.8%) Y neoplasias mieloproliferativas no clasificables en dos pacientes (5.8%). Las complicaciones más frecuentemente encontradas en esta serie son los eventos tromboticos venoso (Solano et al., 2012).

BOLIVIA, La Paz, En la región andina, comprendida por Bolivia, Perú, Ecuador y Chile, millones de habitantes residen a más de 2.500 msnm. En Bolivia, alrededor de 2.000.000 habitantes residen en las ciudades de La Paz y El

alto; y se considera que existen más de 150.000 pacientes con eritrocitosis patológicas. Esta enfermedad neoplásica se caracteriza por una mutación del gen JAK-2 V617F, esta mutación permite la fosforilación continua (hiperactivación) de JAK2 y STAT5, factores de transcripción involucrados en la eritropoyesis y que dan como resultado una eritropoyesis incrementada. La incidencia de las eritrocitosis patológicas en la región andina varía de acuerdo a la población, ocupación y lugar de residencia. Por ejemplo, en las ciudades de La Paz y El Alto (3.600 y 4.000 msnm) se considera una incidencia del 10% de la población. Los datos históricos de la incidencia de la Policitemia Vera se encuentran alrededor de 1 por cada 100.000 habitantes por año (Mex, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se obtuvieron 40 muestras de sangre periférica 20 de pacientes con diagnóstico confirmado de NMP y 20 controles los mismos que fueron seleccionados aleatoriamente de la población general. Las muestras fueron obtenidas de los distintos Servicios de Hematología de las Instituciones de Salud participantes como la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA), Hospital Luis Vernaza, Clínica Kennedy, Omnihospital, Hospital del IESS Cuenca, Hospital de la Armada de la ciudad de Guayaquil. El ADN fue extraído y procesado en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular Bioncogén de la ciudad de Cuenca, el análisis clínico, hematológico, así como la morfología fue realizado por médicos hematólogos especializados apoyándose para el diagnóstico en pruebas hematológicas como hemograma y citometría de flujo.

Extracción de ADN

El ADN fue aislado de muestras de sangre periférica recogidas en tubos al vacío de 5 ml con anticoagulante EDTA liofilizado (Vacutainer-USA), utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard Genomic (Promega-USA) según las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C hasta que se pudo realizar el análisis (Nolan y Bustin, 2013).

Reactivos para la AS-PCR

Los reactivos utilizados para la PCR fueron Platinum Taq DNA Polimerasa, 10X Buffer 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl y 50 mM de Cloruro de Magnesio. (Invitrogen-USA), mezcla de dNTP's 100 mM. (Life Technologies-USA), Microtubos de reacción de 0,2 mL. (Applied Biosystems-USA) Primer JAK2F (5'AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT3'), Primer JAK2F/IC (5'ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG 3'), Primer JAK2R (5'CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA 3') (Invitrogen-USA) (Ono et al., 2012).

Reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (AS-PCR)

La amplificación se realizó utilizando un termociclador (Verity, Applied Biosystems-USA), las condiciones fueron las siguientes: desnaturación inicial a 94 °C por 2 minutos; 36 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, terminando con una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Se incluyó siempre en todas las reacciones un control negativo que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación y donde se sustituye el molde de ADN por agua destilada ultrapura (GIBCO-USA). Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de

agarosa ultrapura al 2% (Invitrogen-USA), TAE1X Buffer: 40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.3 (Invitrogen-USA), teñido con bromuro de etidio 10 mg/mL (Promega-USA) y visualizados en una lámpara de rayos ultravioleta (UVP-USA) a través de un analizador digital de geles (Clever Scientific-UK).

La mutación JAK2 V617F se detectó mediante AS-PCR, diseñada de forma que se utilizan tres primers o cebadores diferentes. El cebador JAK2 F es específico para el alelo mutante y el cebador JAK2 F/IC se encuentra en todos los individuos independientemente de la presencia o no de la mutación, por lo que constituye un control interno de la reacción. De esta forma, en todos los individuos se amplifica un producto de 364 pares de bases (pb) con los cebadores JAK2 F/IC y JAK2 R, y solamente en los individuos que presentan la mutación en estudio se obtiene un producto de 203 pb utilizando los cebadores JAK2 F y JAK2 R (Ono et al., 2012; Cano et al., 2014; Quintana et al., 2014).

Análisis Estadístico

Las variables discretas fueron operacionalizadas en número de casos (n) y porcentajes (%) y las continuas en promedio \pm desviación estándar ($X \pm DE$). Para validación de la prueba se utilizó Epidat versión 3.1 en español para Windows™ un software para análisis epidemiológico de datos tabulados producido por la Xunta de Galicia, con aval de la Organización Panamericana de la Salud. Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo de la prueba positiva y negativa e Índice de Youden con su respectivo IC 95 %. Se incluyen como criterio de comparabilidad entre los grupos la distribución según sexo mediante la prueba χ^2 de Pearson y la diferencia de promedios de edad mediante la prueba t de Student. Se consideraron significativos los valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

En todos los pacientes se amplificó un producto de 364 pb con los cebadores JAK2 F/IC y JAK2 R, y solamente en los pacientes que presentaron la mutación en estudio se obtuvo un producto de 203 pb utilizando los cebadores JAK2 F y JAK2 R, como observamos en la figura 1.

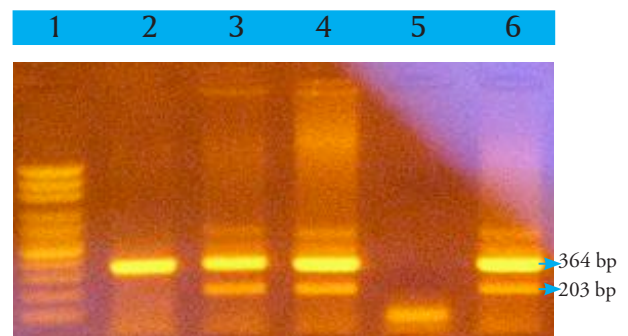


Figura 1. AS-PCR de JAK2. 1 marcador de peso molecular, 2 control individuo sano, 3-4 pacientes Jak2 V617F +, 5 control negativo y 6 control positivo

Para confirmar la mutación JAK2 V617F los amplicones fueron debidamente amplificados en el laboratorio y enviados a secuenciar a la compañía (Macrogen-USA) (Figura 2), utilizando el método del dideoxinucleótido de Sanger (Raedler, 2015).

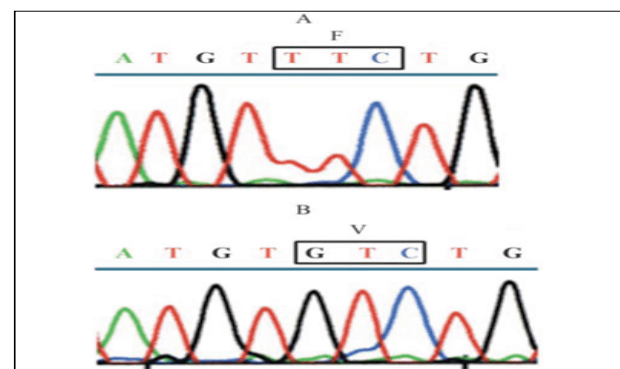


Figura 2. Secuenciamiento. Se observa la sustitución de una G por una T en el nucleótido 1849 resultando en la mutación V617F. Fuente: Macrogen-USA.

La prevalencia de la mutación JAK2 V617F del presente estudio fue del 50%, mientras que el otro 50% correspondió a los pacientes empleados como controles negativos (Tabla 1).

Tabla 1. Validación de la prueba

Prueba Dx	Enfermos	Sanos	Total
Positiva	20	0	20
Negativa	0	20	20
Total	20	20	40

Del total de pacientes portadores de la mutación JAK2 V617F el 22,5% pertenecieron al sexo femenino mientras que el 27,5% fueron de sexo masculino. La edad promedio de ambos sexos fue de $45,1 \pm 5,1$ años (Tabla 2).

Tabla 2. Características demográficas

Variable	Enfermos	Sanos	P-valor
<i>Sexo [n(%)]</i>			
Femenino	9 (22,5)	11 (27,5)	0,527
Masculino	11 (27,5)	9 (22,5)	
<i>Edad (años)</i>			
Promedio \pm DE	45,1 \pm 5,1	42,1 \pm 5,5	0,332

Los casos positivos para la mutación JAK2 V617F se identificaron en dos de las tres NMP más comunes, el 35% correspondieron a PV, mientras que el 15% a TE.

Tabla 3. Características clínicas

Variable	n	Porcentaje
<i>Enfermos</i>		
Policitemia Vera	14	35,0
Trombocitosis	6	15,0
<i>Sin enfermedad (controles)</i>	20	50,0
Total	40	100

La sensibilidad y especificidad al igual que los valores predictivos positivo y negativo según el índice de Youden tuvo el máximo valor (100%) lo que otorga una utilidad suprema a la prueba.

DISCUSIÓN

En este estudio se ha logrado identificar la mutación JAK2 V617F en el 50% de los pacientes con NMP, el otro 50% corresponden a los controles los cuales fueron negativos. En efecto, la Tabla 1 muestra que los 20 diagnósticos fueron verdaderos positivos en la discriminación de los resultados por tanto los 20 restantes también fueron verdaderos negativos.

Este resultado es similar al obtenido en investigaciones de países asiáticos, una realizada en Korea en el año 2012 por Kim et al, con una prevalencia del 56,4%, otra efectuada en Taiwan entre noviembre del 2007 y septiembre del 2011 por Lin et al, con una prevalencia del 67% (Ho et al., 2012; Ricardo et al., 2013).

La prevalencia de la mutación varía de acuerdo con diferentes grupos de investigación y poblaciones, estas diferencias se atribuyen a la variación étnica, al tamaño de la muestra y a los diferentes métodos moleculares empleados para confirmar los estudios de prevalencia (Ricardo et al., 2013).

La edad media de los pacientes JAK2 V617F positivos fue de 45 años (Tabla 2), sin embargo, éstas edades no fueron significativamente diferentes con las edades de los pacientes negativos ($P = 0,33$). Este resultado es parecido al obtenido en Irán en el año 2010 por Parisa et al, con una edad media de 48 años; pero difiere de los obtenidos entre los años 2007 a 2011 en Taiwan por Lin et al y en Oklahoma por Zhao et al, cuyas edades promedio fueron de 53,5 y 69 años respectivamente. Referencias de estas investigaciones han encontrado que el porcen-

taje de pacientes mutados y la carga de JAK2 V617F, aumenta progresivamente con la edad, lo cual es consistente con el hecho de que las NMP ocurren sobre todo en las personas adultas mayores. (Ricardo et al., 2013; Rumi et al., 2014; Sultan et al., 2016).

La prevalencia de la mutación JAK2 V617F en PV y TE es mucho mayor que MFP (Tabla 3), siendo identificada en un 35% de pacientes con PV y un 15% con TE, que corresponden a 14 y 6 casos respectivamente. Resultados similares se obtienen en México en el año 2005 por Ruiz et al, quien analizó 70 pacientes y obtuvo 6 casos positivos siendo la PV la de mayor prevalencia con 4 casos positivos, TE 1 caso y MFP 1 caso, y en la universidad de Polonia en el año 2009 Siemiakowska et al analizó 34 pacientes de los cuales 6 presentaron la mutación, 4 corresponden a PV, 1 a TE y 1 a MFP (Shan et al., 2014; Ancochea et al., 2014).

La identificación de la mutación V617F en el gen JAK2 representa un importante avance en el conocimiento de la patogenia de los síndromes mieloproliferativos. Debido a la alta frecuencia en que esta mutación a sido encontrada en la PV y en menor grado en la TE, se ha postulado que la detección de esta mutación tendría un fuerte impacto en el diagnóstico, la clasificación y el tratamiento de estas entidades. Distintos grupos de investigación, dentro de ellos Lens et al han propuesto incorporar la detección de esta mutación como un test diagnóstico de primera línea cuando nos encontramos con un hematocrito mayor a 51% o frente a sospecha de PV, dado que la detección del JAK2 V617F tiene 100% de valor predictivo positivo del diagnóstico de PV (Ordoñez, 2016).

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, es posible plantear las siguientes

conclusiones con respecto a las 40 muestras analizadas:

La AS-PCR resultó ser un método de diagnóstico in vitro altamente sensible para la detección de la mutación JAK2 V617F, además de ser rápido, fácil y rentable,

La prevalencia de la mutación JAK2 V617F en este estudio donde puntualmente se analizó individuos mestizos confirmados hematológicamente fue del 50%, el otro 50% al tratarse de individuos sanos obviamente fue negativo.

El 22,5% de los casos positivos pertenecieron a pacientes de sexo femenino; mientras que el 27,5% fueron pacientes de sexo masculino. En ambos casos la edad promedio fue de 45 años.

La mutación JAK2 V617F fue identificada en pacientes con PV con un porcentaje del 35% correspondiente a catorce casos; mientras que el 15% se les asigna a pacientes con TE en un número de seis casos.

RECOMENDACIONES

Considerando la importancia de la mutación JAK2 V617F y la ausencia de información sobre su prevalencia en población ecuatoriana, es oportuno realizar las siguientes recomendaciones:

Además de la AS-PCR necesitamos valorar la carga alelica del JAK2 la misma que se realiza por Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR) o conjuntamente con PCR utilizando enzimas de restricción (RFLP).

Para un mejor seguimiento de las NMP, otros estudios sugieren el análisis combinado de la AS-PCR con el método Quenching probe (QProbe), aumentando así la especificidad y la sensibilidad. Además de que reduce sustancialmente el coste de la instalación de PCR en tiempo real este método permite la cuantifica-

ción precisa incluso en presencia de productos de PCR no específicos, debido a que el uso de la sonda no fluorescente 3' de cola aumenta de manera significativa la especificidad. Este método también es aplicable a genotipificación de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). El secuenciamiento masivo de siguiente generación (NGS) nos permitirá hacer un barrido molecular de todos los genes relacionados con estas patologías hematológicas abarcando así un mayor número de genes mediante la utilización de paneles específicos lo cual mejorará ostensiblemente el diagnóstico en el laboratorio.

En lo que respecta a la terapia es muy importante realizar la monitorización de los inhibidores específicos tirosina cinasa de JAK1 y JAK2 como el Jakavi-Ruxolitinib lo que nos permite la monitorización y la respuesta al tratamiento (Zhao et al., 2014; Vainchenker et al., 2016; Promega Corporation, 2017).

Declaración de conflicto de intereses

El autor declara no tener conflicto de intereses, siendo él totalmente responsable de todas las decisiones editoriales y de contenido y no recibió apoyo financiero o de otro tipo de compensación en relación con la elaboración del documento.

Agradecimientos

El autor agradece la colaboración del Programa de Biotecnología de la Universidad de Guayaquil a Concepto Azul S.A y al respetable cuerpo médico de las diversas Instituciones de Salud.

LITERATURA CITADA

Amaru Lucana, R., & Vera Carrasco, O. (2016).

Guía para el diagnóstico y tratamiento de las eritrocitosis patológicas en la altura. *Revista Médica La Paz*, 22(2), 70-77.

Amor-Vigil, A. M., Díaz-Alonso, C. A., Garrote-Santana, H., Suárez-González, Y., Fernández-Delgado, N., & Modesto Ávila-Cabrera, O. (2013). Introducción del estudio molecular de la mutación JAK2V617F en neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL negativas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(4), 398-406.

Ancochea, À., Álvarez-Larrán, A., Morales-Indiano, C., García-Pallarols, F., Martínez-Avilés, L., Angona, A., ... & Besses, C. (2014). The role of serum erythropoietin level and JAK2 V617F allele burden in the diagnosis of polycythaemia vera. *British journal of haematology*, 167(3), 411-417.

Angona, A., Alvarez-Larrán, A., Bellosillo, B., Martínez-Avilés, L., Garcia-Pallarols, F., Longarón, R., ... & Besses, C. (2015). Trombocitemia esencial: características iniciales y factores de riesgo de supervivencia y trombosis en una serie de 214 pacientes. *Medicina Clínica*, 144(6), 247-253.

Angona Figueras A. (2017) Caracterización de los progenitores hematopoyéticos CD34+ en las neoplasias mieloproliferativas y su papel en la evolución de la carga mutacional [Ph.D. Thesis]. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona-España.

Badrawy, H., & Ibrahim, A. (2014). JAK-2V617F Mutation in Acute Leukemia (South Egypt Experience). *International Blood Research & Reviews* 2(1): 1-7.

Cano, A. E., Mendoza, S. S., Lugo, A. A., & Thiel, S. F. (2014). Detección de la mutación JAK2V617F en pacientes con sospecha clínica de neoplasia mieloproliferativa sin expresión leucémica. Estudio preliminar. In *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas* 47 (2): 41-50.

Cervantes, F., Mesa, R., & Harrison, C. (2013). JAK inhibitors: beyond spleen and symptoms?. *Haematologica*, 98(2), 160-162.

Cruz Alemán, S. A., Larios Roque, A. B., & Caldera Suazo, U. J. (2016). Estandarización de la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2

V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendidos en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo febrero-octubre 2015. [Ph.D. Thesis]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.

Deadmond, M. A., & Smith-Gagen, J. A. (2015). Changing incidence of myeloproliferative neoplasms: trends and subgroup risk profiles in the USA, 1973–2011. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 141(12), 2131-2138.

Didone, A., Nardinelli, L., Marchiani, M., Ruiz, A. R. L., de Lima Costa, A. L., Lima, I. S., ... & Bendit, I. (2016). Comparative study of different methodologies to detect the JAK2 V617F mutation in chronic BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *Practical Laboratory Medicine*, 4, 30-37.

Espínola Cano, A. F., Sánchez Mendoza, S., Ayala Lugo, A., & Figueredo Thiel, S. J. (2014). JAK2V617F mutation detection in patients with clinical suspicion of myeloproliferative neoplasm without leukemic expression. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, 47(2), 41-50.

Kim, B. H., Cho, Y. U., Bae, M. H., Jang, S., Seo, E. J., Chi, H. S., ... & Lee, K. H. (2015). JAK2 V617F, MPL, and CALR mutations in korean patients with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Journal of Korean medical science*, 30(7), 882-888.

Kim, H. R., Choi, H. J., Kim, Y. K., Kim, H. J., Shin, J. H., Suh, S. P., ... & Shin, M. G. (2013). Allelic expression imbalance of JAK2 V617F mutation in BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *PloS one*, 8(1), e52518.

Leszczynska, A., Grzenkiewicz-Wydra, J., Chmielewska-Gorycka, L., Bieniaszewska, M., & Hellmann, A. (2016). Detection of JAK2 Exon 12 Mutations in JAK2 V617F-Negative Polycythemia Vera Patients by Cloning Technique. *Acta haematologica*, 136(2), 123-128.

Lim, K. H., Chen, C. G. S., Chang, Y. C., Chiang, Y. H., Kao, C. W., Wang, W. T., ... & Cheng, H. I.

(2017). Increased B cell activation is present in JAK2V617F-mutated, CALR-mutated and triple-negative essential thrombocythemia. *Oncotarget*, 8(20), 32476-32491.

Mex, R. H. (2016). Implicaciones clínicas y de pronóstico de la mutación JAK2 V617F en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas. *Revista de*, 17(3), 161.

Nolan, T., & Bustin, S. A. (Eds.). (2013). *PCR technology: current innovations*. CRC press.

Ono, A., Okuhashi, Y., Takahashi, Y., Itoh, M., Nara, N., & Tohda, S. (2012). Advantages of the quenching probe method over other PCR-based methods for detection of the JAK2 V617F mutation. *Oncology letters*, 4(2), 205-208.

Quintana, S., Schoenfeld, E., Di Gerónimo, V., Martín, N., & Pagani, F. (2014). Detección de la mutación V617F del gen JAK2 mediante análisis de disociación de alta resolución. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 447-455.

Raedler, L. A. (2015). Jakafi (Ruxolitinib): first FDA-approved medication for the treatment of patients with polycythemia vera. *American health & drug benefits*, 8(Spec Feature), 75.

Ho, C. L., Wu, Y. Y., Hung, H. M., Chang, P. Y., Kao, W. Y., Chen, Y. C., & Chao, T. Y. (2012). Rapid identification of heterozygous or homozygous JAK2 V617F mutations in myeloproliferative neoplasms using melting curve analysis. *Journal of the Formosan Medical Association*, 111(1), 34-40.

Ricardo, A., Miguez, H., Peñaloza, R., Torres, G., Vera, O., Velarde, J., ... & Cuevas, H. (2013). Eritrocitosis patológica de altura: Caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Revista Médica La Paz*, 19(2), 5-18.

Rumi, E., Pietra, D., Pascutto, C., Guglielmelli, P., Martínez-Trillos, A., Casetti, I., ... & Sant'Antonio, E. (2014). Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*, 124(7), 1062-1069.

Shan, Y., Gnanasambandan, K., Ungureanu, D., Kim, E. T., Hammarén, H., Yamashita, K., ... & Hub-

bard, S. R. (2014). Molecular basis for pseudokina-
se-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine ki-
nase. *Nature structural & molecular biology*, 21(7),
579-584.

Solano, J. C., Casas, C. P., Abello, V., & Solano,
M. H. (2012). Características clínicas y paraclínicas
de las neoplasias mieloproliferativas crónicas cro-
mosoma Filadelfia negativas. *Acta Médica Colom-
biana*, 37(2):66-73.

Sultan, S., Irfan, S. M., & Khan, S. R. (2016). So-
matic JAK-2 V617F mutational analysis in polycythe-
mia rubra vera: a tertiary care center experience.
Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17(3),
1053-1055.

Tinti Ordóñez, D. (2016). Determinación de la
mutación JAK2V617F por PCR-Alelo Específica (AR-
MS-PCR) en pacientes con Síndromes Mieloprolife-
rativos Crónicos.

Vainchenker, W., Constantinescu, S. N., & Plo,
I. (2016). Recent advances in understanding myelo-
fibrosis and essential thrombocythemia. *F1000Re-
search*, 5: 1-13.

Zhao, W., Zou, K., Farasyn, T., Ho, W. T., &
Zhao, Z. J. (2014). Generation and characterization
of a JAK2V617F-containing erythroleukemia cell
line. *PloS one*, 9(7), e99017.