

Coexistencia de las mutaciones V617F del gen JAK-2 y G20210A del gen de la protrombina

en una paciente con trombocitemia esencial

Palabras clave: Mutación V617F del gen JAK-2, mutación G20210A del gen de la protrombina, trombocitemia esencial.

Key words: V617F JAK-2 mutation, G20210A prothrombin mutation, essential thrombocythemia.

Recibido: 12/05/2008
Aceptado: 04/06/2008

Jesús Salvador Velarde Félix,*,**** Ramón Rivas Llamas,** Lourdes Zazueta Morales,*** Luis Antonio Ochoa Ramírez,* Juan José Ríos Tostado,* Horacio Rendón Aguilar*

* Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán.
** Servicio de Hematología Hospital General de Culiacán.
*** Laboratorio de Análisis Clínicos Hospital General de Culiacán.
**** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa.

Correspondencia:

Horacio Rendón Aguilar

Q.F.B. Esp. Hematología Diagnóstica por Laboratorio.

Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán «Bernardo J. Gastelum», Calle Juan Aldama esquina con Estado de Nayarit s/n.

Col. Rosales, 80230, Culiacán, Sinaloa, México. Tel. 016677168560 (65)

Ext. 196. E-mail: horaciorendon@hotmail.com

139

Resumen

Introducción: La mutación V617F del gen JAK-2 es de gran importancia en el diagnóstico, clasificación y tratamiento de los desórdenes mieloproliferativos crónicos BCR-ABL negativos.

Caso clínico: Mujer de 64 años de edad que en el preoperatorio de blefaroplastia se le detectó trombocitosis y posterior a la operación desarrolló enfermedad cerebrovascular. Los estudios actuales demostraron la presencia de las mutaciones V617F del gen JAK-2 y G20210A del gen de la protrombina, así como tiempos cortos de protrombina (TP) y parcial de tromboplastina (TPT), y diferentes anomalías celulares. **Conclusión:** El presente estudio es uno de los primeros reportados en México que describe la mutación V617F del gen JAK-2 en pacientes con desórdenes mieloproliferativos crónicos y el primero en describir esta mutación en una paciente con trombocitemia esencial que además posee otra mutación de riesgo para trombosis, por lo que se sugiere iniciar tratamiento preventivo con anticoagulantes.

Abstract

Introduction: The JAK-2 V617F mutation has great importance in the diagnosis, classification and treatment of chronic myeloproliferative disorders. **Clinical case:** In a 64 year old woman thrombocytosis was detected in the preoperative analyses for blepharoplastia who developed cerebral-vascular disease after the surgery. The most recent studies showed the presence of V617F and G20210A mutations of JAK-2 and prothrombin genes, respectively; as well as short times of TP and TPT times, and different cellular anomalies. **Conclusion:** The present study one of the first reported in Mexico, which describes the JAK-2 V617F mutation in patients with chronic myeloproliferative disorders, and the first describing this mutation in a patient with essential thrombocythemia who also possess another mutation of thrombotic risk. We feel it is important to begin preventive anticoagulation immediately.

Introducción

En el año 2005, diversos grupos de investigación describieron una mutación adquirida en el gen JAK-2 en pacientes con desórdenes mieloproliferativos crónicos.^{1,2} La mutación consiste en el cambio de una guanina por una timina en la posición 1849 del exón 12 del gen, originando la sustitución de valina de la posición 617 por fenilalanina en la proteína; por tal motivo, a la mutación se le conoce como «JAK-2 V617F». Ésta hace que la cinasa JAK-2 permanezca constitutivamente activa, conduciendo a la proliferación celular en la ausencia de los factores de crecimiento.^{2,3}

La identificación de esta mutación coadyuva a confirmar el diagnóstico de los desórdenes mieloproliferativos, permite distinguir la policitemia vera (PV) de la eritrocitosis secundaria, así como la trombocitemia esencial (TE) de la trombocitosis reactiva y recientemente asociada a trombosis^{12,13}. En este sentido, esta mutación se ha detectado en 65 a 97% de los pacientes con PV, de 23 a 57% en sujetos con trombocitemia esencial TE y de 30-57% de la mielofibrosis idiopática.^{1,2} La mutación JAK-2 está ausente en individuos sanos, así como en pacientes con eritrocitosis y trombocitosis secundaria, o con leucemia mielógena crónica (LMC).⁴

Por otra parte, la mutación G20210A del gen de la protrombina confiere una predisposición de tres veces mayor de padecer trombosis venosa en virtud de elevar los niveles plasmáticos de protrombina.⁵ Se ha estimado que la frecuencia de esta mutación es baja. En individuos heterocigotos de la población general originarios de Guadalajara, Jalisco, México, la frecuencia es de 3%,⁶ de 5.3% en Valencia, España,⁷ de 2.8% en el Centro y Sureste de Italia,⁸ por citar algunos ejemplos.

En este trabajo describimos la detección de la mutación V617F del gen JAK-2 y G20210A del gen de la protrombina en una paciente con diagnóstico de trombocitemia esencial así como hallazgos clínicos y morfológicos. También se dis-

cutirá la importancia de incluir el estudio de factores de riesgo trombofílicos en pacientes con desórdenes mieloproliferativos crónicos positivos a la mutación V617F del gen JAK-2.

Material y métodos

Extracción y purificación de ADN. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 1 mL de sangre total anticoagulada con EDTA, siguiendo el método descrito por Gustinich y colaboradores,⁹ para luego verificar su calidad y cantidad mediante espectrofotometría.

Detección de las mutaciones V617A y G20210A. La detección de la mutación V617F del gen JAK-2 se realizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en un volumen final de 20 μ L que contiene 1.0 U de Taq polimerasa (marca vivantis), 0.25 μ M del iniciador 1: 5'-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3', 0.4 μ M del iniciador 2: 5'-AGCATTGTTTAAATTATGGAGTATATT-3' y 0.15 μ M del iniciador 3: 5'-CTGATTAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA-3', 125 μ M de deoxinucleósidos trifosfatados (dNTP's), 2.0 μ L de solución amortiguadora a una concentración 10X y 50 ng de ADN genómico, basado en las condiciones previamente reportadas.^{4,10,11}

Análisis del caso. Paciente de sexo femenino de 64 años de edad originaria de Culiacán, Sinaloa, a quien, en junio del 2006, al efectuar un examen preoperatorio para blefaroplastia, se le encontró trombocitosis con recuento de plaquetas de 800,000/ μ L. En el postoperatorio presentó cuadro de enfermedad cerebrovascular con hemiparesia izquierda sin afasia, de la que se recuperó totalmente; también presentó hipertensión arterial que fue tratada con enalapril. En estudios posteriores de control, la paciente sigue cursando con trombocitosis.

En junio del 2007, después de traumatismos mínimos, aparecen equimosis pequeñas y dolorosas en brazos. En ese mismo año encontramos la

mutación V617F del gen JAK-2, al menos en estado heterocigoto (*figura 1*), estableciendo con ello el diagnóstico de síndrome mieloproliferativo crónico del tipo TE por lo que se empieza a manejar con hidroxiurea y ácido acetilsalicílico.

La BHC realizada en junio del 2008 reportó: Hb: 12.3 g/dL, Hto: 36.8%, Gr: 3.68 M/uL, volumen globular de 100 fL, plaquetas: 400,000/uL. Los tiempos de coagulación estaban alterados con tiempos cortos de protrombina (TP): 10.4 segundos y parcial de tromboplastina (TPT): 25.0 segundos, por lo que decidimos realizar un frotis sanguíneo, en el cual se encontró: granulocitosis con neutrófilos, algunos de ellos displásicos y con apéndices nucleares, multilobulados (más de cinco lóbulos), eosinófilos, basófilos y proplaquetas (*figura 2*); mientras que en la serie roja encontramos reticulocitos de estrés, que confirman la macrocitosis y compensación de la anemia; también se observan poiquilocitos, esquizocitos indicativos de anemia hemolítica microangiopática, codocitos y células en lágrima (*figura 3*).

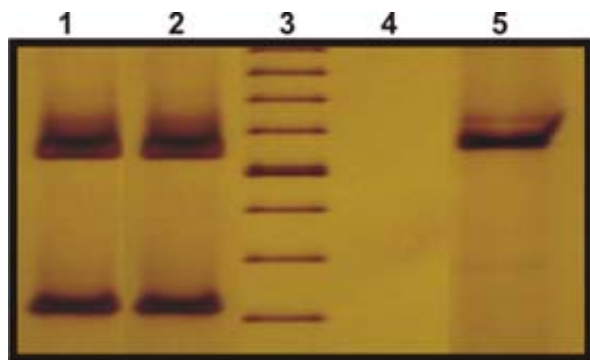


Figura 1. Gel de electroforesis a 6%, teñido con nitrato de plata. En el carril 1 se observa el control positivo (ADN de paciente con la mutación V617F JAK-2 previamente conocida); carril 2 ADN del paciente estudiado, en donde se observan dos bandas: la superior 364 pb (control interno) y la inferior de 203 pb, misma que corresponde a la mutación; carril 3 marcador de peso molecular de 50 pb (de abajo hacia arriba: 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 y 550 pb); carril 4 control negativo (tubo sin ADN) y, por último, el carril 5 que corresponde a individuo control sin la mutación.

Posteriormente, basados en las condiciones publicadas por Poort y colaboradores,⁵ detectamos la mutación G20210A del gen de la protrombina en estado heterocigoto.

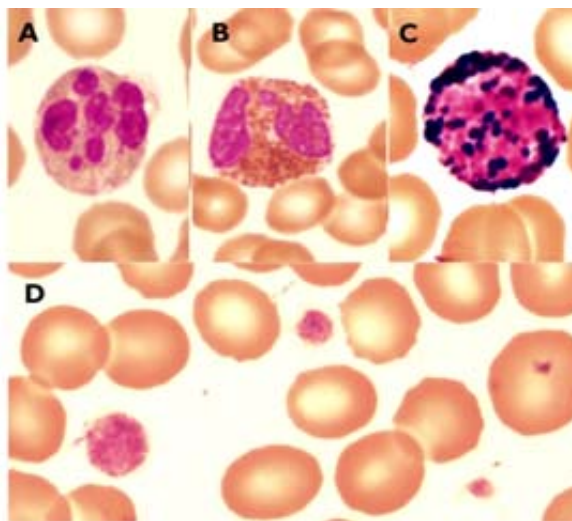


Figura 2. Hallazgos morfológicos del frotis sanguíneo teñido con Wright. (A) Neutrófilo displásico multilobulado, (B) eosinófilo, (C) basófilo y (D) proplaquetas o plaquetas gigantes.

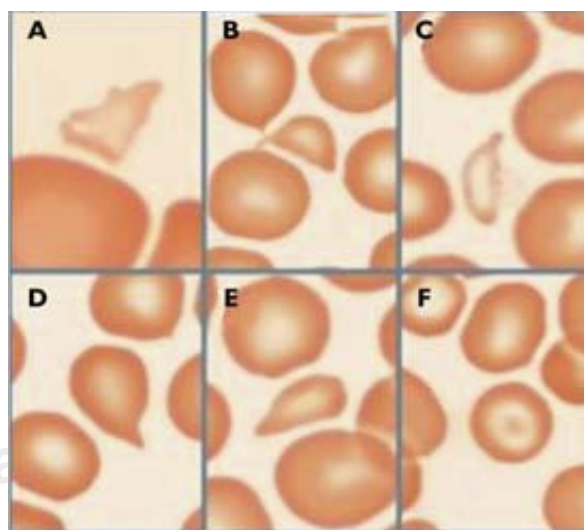


Figura 3. Hallazgos morfológicos de la serie roja, frotis sanguíneo teñido con Wright. Esquizocitos (A y B), poiquilocitos (C), células en forma de lágrima (D y E) y codocitos (F).

Discusión

En este trabajo describimos un paciente en quien coexisten las mutaciones V617F del gen JAK-2 y G20210A del gen de la protrombina; además, se informa sobre los hallazgos morfológicos del frotis sanguíneo. En México, Ruiz-Argüelles y colaboradores¹¹ reportaron la mutación V617F del gen JAK-2 en seis de 10 pacientes con síndrome mieloproliferativo crónico BCR-ABL negativos.

Las formas celulares observadas se explican por el hecho de que la eritropoyetina, trombopoyetina, factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas utilizan la misma vía de señalización JAK2-STAT5;² mientras que lo observado en la serie roja sugiere anemia hemolítica microangiopática.

En resumen, todo parece indicar que la paciente cursa con un síndrome mieloproliferativo crónico con anemia hemolítica microangiopática, y es muy probable que presente eventos trombóticos posteriores, por lo que se aconseja el inicio del tratamiento con anticoagulantes, así como el evitar contacto con factores que confieren estados de hipercoagulabilidad (anticonceptivos, sedentarismo, traumatismo, cirugías, etcétera).

Por el riesgo inherente a trombosis que confiere la mutación V617F del gen JAK-2 en pacientes con desórdenes mieloproliferativos crónicos, es conveniente agregar a la batería de estudios el análisis de marcadores trombofílicos, en especial la mutación G20210A del gen de la protrombina y G1691A del factor V de Leiden.

Referencias

1. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function muta-

- tion of JAK-2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-1790.
2. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK-2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-1148.
3. Dalal I, Arpaia E, Dadi H, Kulkarni S, Squire J, Roifman CM. Cloning and characterization of the human homolog of mouse JAK-2. *Blood* 1998; 91(3): 844-851.
4. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK-2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
5. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703.
6. Quintero-Ramos A, Valdez-Velázquez LL, Hernández G, Baltazar LM, Padilla-Gutiérrez JR, Valle Y, Rodarte K, Ortiz R, Ortiz-Aranda M, Olivares N, Rivas F. Evaluación de cinco polimorfismos de genes trombofílicos en parejas con aborto habitual. *Gac Med Mex* 2006; 142: 95-98.
7. Francés F, Portolès O, Gabriel F, Corella D, Sorli JV, Sabater A, Alfonso JL, Guillén M. Comparación de las frecuencias de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina G20210A entre pacientes con trombosis venosa profunda y población general mediterránea española. *Rev Med Chile* 2006; 134: 13-20.
8. Bruzota F, Paciaroni K, De Stefano V, Chiusolo P, Manzoli A, Casorelli I, Leone AM, Rossi E, Leone G, Maseri A, Andreotti F. Increased prevalence of the G20210A prothrombin gene variant in acute coronary syndromes without metabolic or acquired risk factors or with limited extent of disease. *Europ Heart J* 2002; 23: 26-30.
9. Gustincich S, Carmici P, Del Sal G. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991; 11: 74.
10. Lens D, Muxi P, Brugnini A, Trías N, Pierri S. Determinación de la mutación V617F del gen JAK-2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: A propósito de un caso. *Rev Med Urug* 2007; 23: 122-125.
11. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Ruiz-Delgado GJ, Navarro-Vázquez M, González-Carrillo ML. The Janus Kinase 2 (JAK-2) V617F mutation in hematological malignancies in México. *Rev Invest Clin* 2006; 58: 458-461.
12. Colaizzo D, Amitrano L, Iannaccone L, Vergura P, Cappucci F, Grandone E, et al. Gain-of-function gene mutations and venous thromboembolism: distinct roles in different clinical settings. *J Med Genet* 2007; 44:412-416.
13. Universidad de Barcelona, España, 2005. Tesis Doctoral de la Facultad de Medicina. Síndrome de Budd-Chiari: avances en el conocimiento de su fisiopatología y nuevas estrategias terapéuticas.