

**COMUNICACIÓN BREVE**

**Introducción del estudio molecular de la mutación JAK2V617F en neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL negativas**

Introduction of the molecular study of JAK2V617F mutation in classic BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms

**DraC. Ana María Amor-Vigil, Lic. Carmen Alina Díaz-Alonso, Dra. Heydis Garrote-Santana, Lic. Yandi Suárez-González, Dra. Norma Fernández-Delgado, Dr. Onel Modesto Ávila-Cabrera**

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

**RESUMEN**

Los estudios moleculares en las neoplasias mieloproliferativas han adquirido gran importancia para distinguir entre una enfermedad reactiva y una clonal y, en algunos casos, valorar la respuesta al tratamiento. Al respecto, se distingue la mutación JAK2V617F que aparece fundamentalmente, aunque con diferentes frecuencias, en las neoplasias mieloproliferativas clásicas BCR-ABL negativas: la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria. El estudio de esta mutación, junto a otras de menor frecuencia, fue recomendado en el año 2008 por la Organización Mundial de la Salud entre los criterios de diagnóstico para estas tres entidades. Con el objetivo de introducir el estudio molecular de la mutación JAK2V617F mediante su amplificación por PCR alelo específica, se estudiaron 26 pacientes divididos en tres grupos. El primero, de 10 pacientes con diagnóstico anterior de PV que habían recibido su tratamiento correspondiente, fue positivo en el 90 % de los casos. En el segundo, resultó positivo a la mutación el 80 % de cinco pacientes con sospecha de leucemia mieloide crónica que habían sido BCR-ABL negativos. Por último, 11 pacientes en los que se sospechó la presencia de PV, mostró una positividad del 91 %. Este breve reporte representa un primer paso en la introducción del estudio molecular al

diagnóstico, de las neoplasias mieloproliferativas clásicas que no clasifican como leucemia mieloide crónica.

**Palabras clave:** mutación JAK2V617F, policitemia vera, neoplasias mieloproliferativas

## **ABSTRACT**

Molecular studies in myeloproliferative neoplasms have reached importance to distinguish between a reactive and a clonal disease and in some cases, to assess the response to treatment. The JAK2V617F mutation appears mostly in the classic BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms: polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. The study of this mutation and others less frequent was recommended by the World Health Organization since 2008, as diagnostic criteria in these three disorders. In order to introduce the study of JAK2V617F mutation by allele-specific polymerase chain reaction, 26 patients divided in three groups were studied. Firstly, ten patients previously diagnosed as PV who had received treatment, showed 90 % of positivity. In a second group, 80 % of five patients in which BCR-ABL was negative, worked out positive for the mutation. Finally, 11 patients with suspected PV, showed 91 % of positivity. This short report represents a first step in the introduction of the molecular study for diagnosis of classical myeloproliferative neoplasms not classified as chronic myeloid leukemia.

**Keywords:** JAK2V617F mutation, polycythemia vera, myeloproliferative neoplasms

## **INTRODUCCIÓN**

Los síndromes mieloproliferativos crónicos, ahora llamados neoplasias mieloproliferativas (NMP), comprenden, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2008,<sup>1</sup> 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. De todas estas, la PV, la TE y la MFP reciben el nombre de NMP clásicas BCR-ABL negativas y constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades clonales caracterizadas por aumento de la proliferación de las líneas eritroides, megacariocíticas y mieloides.

Estas enfermedades tienen un origen clonal y una gran diversidad fenotípica relacionada con distintos eventos oncogénicos (mutaciones y genes de fusión) que

con frecuencia involucran una proteína con actividad tirosina cinasa. Ejemplo de ello es el reordenamiento BCR-ABL en la LMC, que en estudios citogenéticos se revela como el cromosoma Filadelfia. Actualmente se conocen más de 40 proteínas con actividad tirosina cinasa involucradas en las NMP.<sup>2</sup>

En consecuencia, los estudios moleculares han adquirido gran importancia para el diagnóstico de las NMP, ya que la detección de estas alteraciones genéticas contribuye a la distinción entre enfermedad reactiva y clonal y en algunos casos en la evaluación de la respuesta al tratamiento.

En el año 2005, con pocos meses de diferencia se reportaron distintos estudios clínicos relacionados con la ocurrencia de mutaciones en el gen Janus cinasa 2 (JAK2), localizado en el cromosoma 9. De ellas, se destaca la mutación puntual activante JAK2V617F como un factor crucial en el desarrollo de estas enfermedades. La mutación, que se encuentra en el exón 14 del gen JAK2, se produce por la sustitución de guanina por timina en la posición 1849, y como resultado ocurre la sustitución de valina por fenilalanina en la posición 617 de la proteína. Se ha demostrado que esta sustitución provoca en la proteína la activación constitutiva de tirosina cinasa e incrementa la hipersensibilidad por las citocinas. <sup>3-7</sup>

La mutación JAK2V617F es la principal alteración molecular descrita en los pacientes con NMP clásicas BCR-ABL negativas y aparece en alrededor del 96 % de pacientes con PV, el 65 % de los pacientes con MFP y el 55 % que padecen TE. <sup>3,5,6</sup> Otras mutaciones de este mismo gen se describen en el exón 12 y son igualmente más frecuentes en la PV. <sup>8 y 9</sup>

Las principales dificultades diagnósticas en las NMP BCR-ABL negativas radican en las similitudes que existen con cuadros reactivos y el solapamiento entre las propias NMP y los síndromes mielodisplásicos. En el año 2008 y basados en los hallazgos moleculares, la OMS emitió nuevos criterios diagnósticos de las NMP entre los que se incorporaron las mutaciones del gen JAK2. Se recomendó el estudio de exclusión, fundamentalmente en los pacientes negativos a estas mutaciones. <sup>1, 10</sup> Diversas técnicas cualitativas y cuantitativas se han desarrollado para detectar la mutación JAK2V617F. Entre ellas se encuentran: el genotipaje, bien por secuenciación convencional o por pirosecuenciación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés) alelo específica (PCR-AE), el estudio del polimorfismo de fragmentos de restricción de longitud variable (conocido como RFLP por su sigla en inglés), el PCR cuantitativo en tiempo real, el análisis de la curva de fusión del ADN, la cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución y la espectrometría de masa. <sup>11</sup> La sensibilidad de estos métodos varía entre el 0,01 % y el 5 % y cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Algunos no

---

son lo suficientemente sensibles y producen resultados ambiguos; mientras que otros, aunque más sensibles, originan falsos positivos debido a la falta de especificidad. Por su parte, otros consumen mucho tiempo, emplean equipos y reactivos costosos o ambos.<sup>12</sup>

La técnica de PCR-AE ha sido ampliamente utilizada para el estudio de mutaciones genéticas. Este método usa cebadores específicos para discriminar entre el alelo normal y el mutado. Se ha reportado que su sensibilidad para detectar la mutación JAK2V617F está entre el 0,1 y el 1 %.<sup>13, 14</sup>

La sencillez de esta técnica hizo posible su introducción en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), con la colaboración de colegas de la Fondazione Tettamanti de Monza, Italia. En consecuencia, el presente trabajo reporta los primeros casos estudiados en el IHI.

## MÉTODOS

La muestra estuvo compuesta por 26 pacientes que dieron su consentimiento para participar en el estudio, divididos en tres grupos. El primero, integrado por 10 pacientes con diagnóstico previo de PV que recibían el tratamiento correspondiente; el segundo, de cinco casos con sospecha de LMC que eran BCR-ABL negativos; y el tercero, de 11 enfermos con diagnóstico presuntivo de PV. A cada paciente se le extrajeron 10 mL de sangre periférica con EDTA como anticoagulante.

### Extracción de ADN

Se aislaron los núcleos celulares mediante sucesivos pasos de lisis y centrifugación para posteriormente obtener ADN genómico mediante extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y precipitación con etanol absoluto.<sup>15</sup>

### PCR-AE

La reacción de PCR-AE se llevó a cabo según el método publicado por Baxter y col.<sup>3</sup> Para la detección de la mutación JAK2V617F se utilizaron tres cebadores u oligonucleótidos: uno específico para la mutación (mF3), otro que permite amplificar un segmento del alelo no mutado independientemente de la presencia de la mutación (F2), y un tercero común (R2/3). La amplificación con F2 y R2/3 que produce una banda de 364 pb funciona como control interno, mientras que la amplificación con mF3 y el común R2/3 origina una banda de 203 pb y es específica para la mutación. La secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente:

F2        5'-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3'

mF3      5'-AGCATTGGTTAAATTATGGAGTATATT-3'

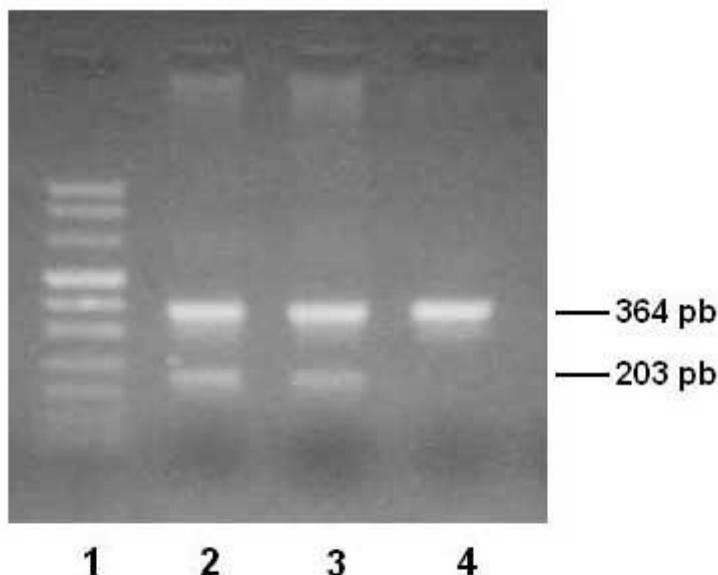
R2/3 5'-CTGAATAGCCTACAGTGTTCAGTTCA-3'

La reacción se realizó en un termociclador. Se incubaron 200 ng de ADN en un volumen final de 50 µL que contenía 0,5 U de Taq ADN polimerasa, 200 µM de cada dNTP; 0,2 µM de los oligonucleótidos F2 y mF3; 0,4 µM del oligonucleótido común R2/3; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; y la solución tampón suministrada por el fabricante de la enzima. El volumen se completó con agua bidestilada tratada con dietilpirocarbonato.

El programa de amplificación constó de un paso inicial de desnaturación de 1 min a 95°C, seguido de 36 ciclos que consistieron en : desnaturación 30" a 94°C: hibridación 30" a 92°C; y extensión 30" a 72°C; un paso final de extensión de 2 min a 72°C. Siempre se amplificó un control negativo que contuvo todos los reactivos más agua en lugar de ADN molde. El producto de PCR se analizó cualitativamente por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia. <sup>(16)</sup>

## RESULTADOS

La implementación del protocolo permitió amplificar sin dificultad el gen JAK2 y detectar los primeros pacientes portadores de la mutación JAK2V617F. En todos los casos se observó la banda que amplifica como control interno de 364 pb, correspondiente a un fragmento del alelo normal del gen JAK2. En los casos que resultaron positivos apareció la banda de 203 pb. La figura muestra una electroforesis típica de la amplificación del gen donde aparece un control positivo, una muestra positiva y una negativa. No se muestra el control negativo que contenía solo la mezcla de reactivos más agua.



**Fig.** Electroforesis de la amplificación por PCR alelo específica de la mutación JAK2V617F.  
**Carril 1:** marcador de peso molecular (MPM),  
**2:** control positivo, **3:** paciente positivo y  
**4:** paciente negativo. (Se señalan las bandas del control interno 364 pb y de la mutación 203 pb).

La tabla muestra los resultados de los 26 pacientes de los que 23 resultaron positivos a la mutación, que representa el 88 % de positividad. En primer lugar, se muestra un grupo de 10 pacientes que ya habían sido diagnosticados y tratados como PV. El rango de edad estuvo entre 35 y 80 años. El tiempo de evolución de la enfermedad y de tratamiento varió entre 2 y 10 años. El 90 % de los pacientes resultó positivo a la mutación JAK2V617F. Un solo paciente fue negativo y resultó ser un hombre de 35 años cuyo diagnóstico se mantuvo como PV.

**Tabla.** Estudio de la mutación JAK2V617F mediante amplificación por PCR alelo específica durante los primeros seis meses de introducida la técnica en el Instituto de Hematología e Inmunología.

Motivo del Estudio	No. de pacientes	JAK2V617F positivos	% positividad	Rango de edad
PV diagnosticada y tratada	10	9	90	35 – 80 a
BCR-ABL negativo	5	4	80	22 m 40 – 80 a
PV debut	11	10	91	29 – 86 a
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>88</b>	<b>22 m 29 – 86 a</b>

a: años, m: meses

Seguidamente se muestra un grupo de cinco pacientes estudiados con anterioridad como LMC y que habían sido negativos al gen de fusión BCR-ABL. El 80 % resultó positivo a la mutación JAK2V617F. Una niña de 22 meses fue positiva. El resto

fueron cuatro adultos, de los cuales tres fueron positivos y se determinó que se trataba de un caso de MF y dos de PV. El paciente negativo fue un hombre de 40 años cuyo diagnóstico quedó definido como TE por la presencia del resto de criterios recomendados por la OMS para el diagnóstico de esta entidad.

Por último, se agrupan los pacientes que acudieron a consulta en el IHI durante los primeros seis meses después de estandarizada la técnica y en los cuales existieron los criterios suficientes para considerar la presencia de PV. En este grupo la edad varió entre 29 y 86 años. De un total de 11 pacientes, el 91 % resultó positivo. El caso negativo fue un paciente masculino de 29 años de edad.

## **DISCUSIÓN**

La PCR-AE amplifica un fragmento del alelo mutado de manera específica y permite determinar su presencia de manera cualitativa mediante electroforesis. A pesar de la tendencia actual a realizar estudios moleculares cuantitativos, se reconoce aún la validez del análisis cualitativo sobre todo para determinar al inicio de la enfermedad, la presencia de aquellas alteraciones moleculares que caracterizan diversas enfermedades hematológicas.

Se consideró implementada la PCR-AE en el IHI con el uso de los cebadores y controles positivos suministrados por colegas de la Fondazione Tettamanti, con los cuales se observaron las bandas de amplificación esperadas.

### **Pacientes con PV diagnosticada y tratada**

A fin de detectar por primera vez la presencia de la mutación en nuestros pacientes, se seleccionó de manera no aleatoria un reducido número de pacientes que habían sido diagnosticados y tratados como PV con anterioridad. En este grupo se observó la mutación en el 90 % de los pacientes, lo cual estuvo en concordancia con reportes de otros autores donde se dice que del 80 al 97 % son positivos.<sup>4, 6, 7</sup> Sólo un paciente resultó negativo pero su diagnóstico no cambió debido a que el resto de los criterios avalan la presencia de PV y así ha sido tratado. Este caso es un hombre con 35 años al momento del estudio y no debe descartarse la posibilidad que porte una mutación en el exón 12 del gen JAK2. La OMS recomienda el estudio de mutaciones en el exón 12 del gen JAK2 cuando la JAK2V617F resulta negativa.

Se debe destacar que estos pacientes estaban tratados y que si bien los tratamientos actuales mejoran la sintomatología de la enfermedad, no son capaces de eliminar el clon de células mutadas, hecho que se demostró por el alto porcentaje de positividad encontrado.

### **Pacientes BCR-ABL negativos**

Dentro de las recomendaciones de la OMS del año 2008, se incluye que en la secuencia o algoritmo para el estudio de los síndromes mieloproliferativos debe realizarse el estudio molecular de la mutación JAK2V617F en los casos BCR-ABL negativos.

La utilidad del estudio en los casos BCR-ABL negativos fue demostrada con el hallazgo del 80 % de pacientes portadores de la mutación JAK2V617F. El diagnóstico de estos pacientes estaba indefinido y demostrar la presencia de la mutación permitió comenzar los tratamientos de acuerdo con el tipo de NMP, que incluyó una MF y dos PV.

La única niña de este reporte fue positiva a la mutación JAK2V617F y su diagnóstico se definió como una neoplasia mieloproliferativa pendiente de clasificar mediante otros estudios complementarios.

El paciente negativo a la mutación JAK2V617F resultó ser, no obstante, portador de TE debido a la presencia del resto de criterios recomendados para el diagnóstico de esta entidad. La OMS recomienda cuatro criterios que deben cumplirse en su totalidad para considerar la presencia de una TE. Uno de los criterios comprende el estudio molecular de la mutación JAK2V617F u otro marcador clonal o en caso de negatividad, la no evidencia de trombocitosis reactiva.

### **Pacientes nuevos con sospecha de PV**

Ante la necesidad de reclutar en el más breve tiempo posible un grupo de pacientes para el estudio de la mutación y ser la PV la más frecuente de las neoplasias mieloproliferativas clásicas que no clasifican como LMC, y en la que además la mutación JAK2V617F aparece con mayor frecuencia, se decidió estudiar, en primer lugar, un grupo de estos pacientes.

La frecuencia de aparición de la mutación JAK2V617F reportada para la PV oscila entre el 65 y el 97 %. <sup>3,5</sup> En los 11 pacientes estudiados la mutación estuvo presente en el 91 %, lo que es similar a lo reportado en la literatura. <sup>(3)</sup> Un sólo paciente fue negativo y su diagnóstico se mantuvo como PV porque estaban presentes el resto de los criterios de la enfermedad. Se trató de un hombre de 29 años que probablemente sea portador de otra mutación en el gen JAK2. Se describe que muchos pacientes con PV que no portan la mutación JAK2V617F tienen mutaciones en el exón 12 del mismo gen. <sup>17-19</sup>

Las recomendaciones de la OMS para el diagnóstico de la PV proponen dos criterios mayores y tres menores. Se orienta que debe estar presente alguna de las dos combinaciones de criterios siguientes: en la primera, es suficiente con los dos criterios mayores y uno de los menores, y en la segunda, se requiere la ocurrencia

---

del primer criterio mayor (confirmar la eritrocitosis) y dos de los menores. El estudio molecular de las mutaciones en el gen JAK2 se considera el segundo criterio mayor para la PV y para diagnosticarla puede ser suficiente la segunda combinación de criterios que no incluye la positividad de las mutaciones.<sup>1,10</sup> La alta incidencia de la mutación JAK2V617F en la PV permitió completar la validez de este estudio en breve tiempo e introducirlo, como recomienda la OMS, entre los criterios para el diagnóstico de las NMP clásicas BCR-ABL negativas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008 Jan, 22(1):14-22.
2. Gómez MT, López CE, Perera M, Molero T. Diagnóstico molecular de las neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas en la práctica diaria. *Haematologica/edición española* 2010, 95 (Extra1):200-6.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Cancer Genome Project: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar, 365(9464):1054-61.
4. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Layout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005 Apr, 434(7037):1144-8.
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr, 352(17):1779-90.
6. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr, 7(4):387-97
7. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005 Jun, 280(24):22788-92.
8. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb, 356(5):459-68.
9. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F) myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008 Feb, 111(3):1686-9.
10. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for

- polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007 Aug, 110(4):1092-7.
11. Zhao AH, Gao R, Zhao ZJ. Development of a Highly Sensitive Method for Detection of JAK2V617F. *J Hematol Oncol* 2011 Oct, 4:40 doi: 10.1186/1756-8722-4-40.
12. Veneri D, Capuzzo E, de Matteis G, Franchini M, Baritono E, Benati M, et al. Comparison of JAK2V617F mutation assessment employing different molecular diagnostic techniques. *Blood Transfus*. 2009, 7:204-9.
13. Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL: Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn*. 2007, 9:272-6.
14. Kannim S, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU: Two-round allele specific polymerase chain reaction: a simple and highly sensitive method for JAK2V617F mutation detection. *Clin Chim Acta*. 2009, 401:148-51
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
16. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001
17. Campbell PJ, Green AR. The Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2006 Dec, 355(23):2452-66.
18. Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Human Pathol*. 2008 Jun, 39(6):795-810.
19. Panani AD. Janus kinase 2 mutations in Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: Clinical implications. *Cancer Letters*. 2009 Oct, 284(1):7-14.

**Recibido:** abril 4, 2013

**Aceptado:** mayo 31,2013

DraC. Ana María Amor Vigil. INSTITUTO DE HEMATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.  
Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA  
Tel (537) 643 8695, 8268  
Fax (537) 644 2334  
Email: [rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu)

---