



**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA -CONCYT-  
SECRETARIA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA -SENACYT-  
FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA -FONACYT-**

**FUNDACIÓN ROZAS-BOTRÁN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES GENÉTICAS Y  
METABÓLICAS -INVEGEM-**

**INFORME FINAL  
"Determinación de la mutación JAK2<sup>V617F</sup> por PCR-Alelo Específica (ARMS-PCR) en  
pacientes con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos"**

**PROYECTO FODECYT No. 07-2013**

**Br. Dámaris Tinti Ordóñez  
Investigadora Principal**



**INVEGEM**  
ROZAS BOTRÁN ONG  
Instituto de Investigación de Enfermedades  
Genéticas y Metabólicas



Guatemala, Octubre de 2014.

### **AGRADECIMIENTOS:**

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, -FONACYT-, otorgado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología –SENACYT- y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología –CONCYT- .

## **OTROS AGRADECIMIENTOS:**

La realización de este trabajo, ha sido posible también gracias a:

- Apoyo financiero y académico del Instituto de Investigación en Enfermedades Genéticas y Metabólicas –INVEGEM-.
- Apoyo financiero de la Fundación Rozas-Botrán.
- Cooperación de la Unidad de Oncología Pediátrica –UNOP-
- Cooperación del Dr. Mauricio Villegas, Dr. Cáceres y Dra. Silvana Torselli.

## **BIOGRAFÍA BREVE ACADÉMICA DE LOS AUTORES**

### **1. Br. Dámaris Eugenia Tinti Ordóñez:**

Asistente de investigación del Instituto de Investigación y Educación a cerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas –INVEGEM- . Pensum cerrado de la Carrera de Química biológica, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Ha trabajado por dos años en técnicas de biología molecular aplicadas a la Genética Humana.

## **RESUMEN**

Los Síndromes mieloproliferativos Crónicos (SMPc) son enfermedades hematológicas que se presentan frecuentemente una mutación en el gen JAK2. Los síndromes que comparten esta mutación son la Policitemia Vera (PV), la Trombocitosis Esencial (TE) y Mielofibrosis Idiopática (MI). El análisis de la mutación JAK2 V617F es uno de los criterios recomendados por la Organización Mundial de la Salud como marcadores diagnósticos que permiten orientar al médico a la clasificación exitosa de los SMPc.

El gen JAK2 se encuentra en el brazo p del cromosoma 9; la mutación se produce en el exón 14 y se encuentra presente en >95% en pacientes con PV, 35-50% en MI y 32 – 57% en TE. Actualmente se han desarrollado nuevos tratamientos moleculares; algunos de los cuales se encuentran todavía en evaluación, que tienen como diana específica el gen tirosin quinasa JAK2.

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar y determinar la presencia de la mutación JAK2V617F en pacientes con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos. Para ello se obtuvo una muestra de sangre periférica de pacientes con diagnóstico clínico de SMPc. Posteriormente se realizó una lisis de amonio, para lisar los eritrocitos y almacenar los leucocitos. Luego se extrajo ADN de los leucocitos almacenados y por último se realizó una prueba de reacción en cadena – PCR- alelo específica.

Se analizaron un total de 154 pacientes, de los cuales el 38% fueron positivos para la mutación evaluada. En los casos de policitemia vera y mielofibrosis, la frecuencia de la mutación varió de lo reportado en la mayoría de países, posiblemente debido a una influencia étnica. La mediana de la edad fue de 60 años, y el sexo predominante fue el femenino.

**Palabras clave: síndromes mieloproliferativos, Policitemia Vera, Mielofibrosis, trombocitosis. JAK2**

## **ABSTRACT**

The chronic myeloproliferatives Syndromes are a type of a hematologic disease that often has the V617F mutation in the JAK2 gene. Syndromes that share this mutation are the Polycythemia Vera (PV), essential thrombocytosis (ET) and idiopathic myelofibrosis (MI). Analysis of the JAK2 V617F mutation is one of those recommended by the World Health Organization as diagnostic markers that allow the physician to guide the successful classification criteria in myeloproliferative syndromes.

The JAK2 gene is found in the chromosome 9; an it's a mutation in exon 14 and it is present in > 95% of patients with PV, 35-50% in MI and 32-57% in TE. Currently the pharmaceuticals have developed new molecular treatments; some of which are still in evaluation with specific targeting the tyrosine kinase JAK2 gene.

This study aimed to evaluate and determine the presence of the JAK2V617F mutation in patients with Chronic Myeloproliferative Syndromes. For this, a sample of peripheral blood of patients with clinical diagnosis of SMPC was obtained. Subsequently ammonium lysis was performed to lyse the erythrocytes and to store the leukocytes. Then a DNA extraction from the stored leukocyte was performed. And finally a -PCR- allele specific was done to evaluate the presence of the V617F mutation.

A total of 154 patients were analyzed, of which 38% were positive for the V617F mutation. In cases of polycythemia vera and myelofibrosis, the mutation frequency varied from that reported in most countries, possibly due to an ethnic influence. The median age was 60 years and the majority of patients were female.

**Key words: Chronic Myeloproliferative Syndrome, Polycythemia Vera, myelofibrosis, thrombocytosis, JAK2**

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	viii
<b>PARTE I:</b>	
<b>I.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I.2 PLANTEAMIENTO DEL TEMA</b> .....	2
I.2.1 Antecedentes en Guatemala.....	2
I.2.2 Justificación del trabajo de investigación.....	3
<b>I.3 OBJETIVOS</b> .....	4
I.3.1 Objetivos	
I.3.1.1 General.....	4
I.3.1.2 Específicos.....	4
<b>I.4 METODOLOGÍA</b> .....	5
I.4.1 Localización.....	5
I.4.2 Indicadores.....	5
I.4.3 Estrategia Metodológica.....	5
I.4.4 El Método.....	6
I.4.5 La técnica Estadística.....	12
I.4.6 Los instrumentos a utilizar.....	12
<b>PARTE II</b>	
<b>MARCO TEÓRICO (CONCEPTUAL)</b> .....	13
<b>PARTE III</b>	
<b>III. RESULTADOS</b> .....	31
III.1 Discusión de Resultados.....	51
<b>PARTE IV</b>	
<b>IV.1 CONCLUSIONES</b> .....	53
<b>IV.2 RECOMENDACIONES</b> .....	54
<b>IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
<b>IV.4 ANEXOS</b> .....	58
<b>PARTE V</b>	
<b>V.1 INFORME FINANCIERO</b> .....	63

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PAG.</b>
Figura No. 1: Hipótesis de la Mutación <i>JAK2</i> <sup>V617F</sup> .....	19
Figura No. 2 Algoritmo diagnóstico de SMPc .....	20
Figura No. 3 Mutación <i>JAK2</i> <sup>V617F</sup> y estructura de la proteína.....	21
Figura No. 4 Activación de la transcripción por la vía JAK-STAT por la Eritropoyetina.....	22
Figura No. 5 Mecanismo de disomía uniparental para la pérdida de la Heterocigocidad .....	23
Figura No. 6 Diagrama de ARMS-PCR .....	24
Figura No. 7 Esquema Terapéutico en Pacientes con Trombocitosis Esencial .....	27
Figura No. 8 Esquema Terapéutico en Pacientes con Policitemia Vera.....	27
Figura No. 9: se observan las bandas de los pacientes No.3 y 4, ambos positivos heterocigotos. ....	37
Figura No. 10: se observan las bandas de los pacientes No.7 y 10, ambos positivos heterocigotos.....	38
Figura No. 11: se observan las bandas de los pacientes No.11 y 12, ambos positivos homocigotos .....	38
Figura No. 12: se observan las bandas de los pacientes No.15 y 17, ambos positivos heterocigotos. ....	39
Figura No. 13: se observan las bandas de los pacientes No.21 y 24, ambos positivos heterocigotos .....	39
Figura No. 14: se observan las bandas de los pacientes No.27 y 28, la primera heterocigota y la segunda homocigota.....	40
Figura No. 15: se observan las bandas de los pacientes No.36 y 37, ambas positivas heterocigotas.....	40
Figura No. 16: se observan las bandas de los pacientes No.38 y 40, ambas positivas heterocigotas.....	41
Figura No. 17: se observan las bandas de los pacientes No.44, 46, 47 y 49, todas positivas heterocigotas.....	41

Figura No. 18: se observan las bandas de los pacientes No.53, 57 y 59, todas positivas heterocigotas.....	42
Figura No. 19: se observan las bandas de los pacientes No. 65 y 70, ambas positivas heterocigotas.....	42
Figura No. 20: se observan las bandas de los pacientes No. 76 y 86, ambas positivas heterocigotas.....	43
Figura No. 21: se observan las bandas de los pacientes No. 89 y 92, ambas positivas heterocigotas.....	43
Figura No. 22: se observan las bandas de los pacientes No. 97, 98, 99, 105 y 106, todas positivas heterocigotas.....	44
Figura No. 23: se observan las bandas de los pacientes No. 111 y 197, ambas positivas heterocigotas.....	44
Figura No. 24: se observan las bandas de los pacientes No. 227 y LMC140, ambas positivas heterocigotas.....	45
Figura No. 25: se observan las bandas de los pacientes LMC145 y LMC151, la primera heterocigota y la segunda homocigota.....	45
Figura No. 26: se observan las bandas de los pacientes LMC153 y LMC170, la primera heterocigota y la segunda homocigota.....	46
Figura No. 27: se observan las bandas de los pacientes LMC187 y LMC222, ambas heterocigotas.....	46
Figura No. 28: se observan las bandas de los pacientes LMC229 y LMC231, la primera heterocigota y la segunda homocigota.....	47
Figura No. 29: se observan las bandas de los pacientes LMC236 y LMC238, la primera heterocigota y la segunda homocigota.....	47
Figura No. 30: se observan las bandas de los pacientes LMC245 y LMC249, ambas heterocigotas.....	48
Figura No. 31: se observan las bandas del paciente LMC263, homocigoto para la mutación.....	48

## LISTA DE TABLAS

	<b>PAG.</b>
Tabla No. 1 Criterios para el diagnóstico de Policitemia Vera .....	17
Tabla No. 2 Estratificación del riesgo de pacientes con TE .....	19
Tabla No. 3 Criterios para el diagnóstico de Trombocitosis Esencial.....	19
Tabla No. 4 Criterios para el diagnóstico de Mielofibrosis Idiopática .....	21
Tabla No. 5 Mutación <i>JAK2</i> <sup>V617F</sup> en Síndromes Mieloproliferativos Crónicos.....	22
Tabla No. 6 Factores y mecanismos de los eventos hemorrágicos y trombóticos....	30
Tabla No. 7 Drogas en estudio para SMPc y su fase de estudio.....	35
Tabla no. 8: Resultados de <i>JAK2</i> V617F de los pacientes analizados.....	36
Tabla no. 9: presencia de mutación V617F en gen <i>JAK2</i> .....	42
Tabla no. 10: resumen de casos analizados para la mutación V617F del gen <i>JAK2</i> .	42
Tabla no. 11: datos demográficos hematológicos.....	55
Tabla No. 11 Mutación <i>JAK2</i> <sup>V617F</sup> en Síndromes Mieloproliferativos Crónicos .....	56



## PARTE I

### I.1 INTRODUCCIÓN

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPc) con presencia de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> se clasifican según la Organización Mundial de la Salud (WHO) en: Policitemia Vera (PV), Trombocitosis Esencial (TE) y Mielofibrosis Idiopática (MI). La mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> se encuentra presente un porcentaje mayor al 50% en estas patologías (1,2).

La presencia de *JAK2*<sup>V617F</sup> constituye uno de los criterios establecidos por la WHO para el diagnóstico de SMPc y se asocia a complicaciones hematológicas como mielofibrosis, trombosis y hemorragias. (2).

El gen *JAK2* se encuentra en el brazo p del cromosoma 9 y codifica una proteína con actividad tirosin quinasa, importante en la proliferación de células hematopoyéticas. La mutación se produce en el exón 14 del gen, producto de la sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 1,849 y por consiguiente, la sustitución del aminoácido valina por la fenilalanina en el codón 617. Dicha sustitución se encuentra en el dominio pseudoquinasa de la proteína, el cual tiene un papel importante en la regulación de la actividad quinasa de la enzima. Cuando se produce la mutación, la enzima se encuentra activa constitutivamente, provocando proliferación celular excesiva (3).

Un individuo generalmente es heterocigoto para la mutación, sin embargo esta heterocigocidad puede perderse y el paciente portar ambos alelos mutados. La pérdida de la heterocigocidad es más común en pacientes con PV y MI, y se ha relacionado al fenotipo de la enfermedad (4).

El uso de citorreductores es el tratamiento indicado en los SMPc; y también a nivel mundial existen un alto número de ensayos clínicos en ejecución, desarrollados para el diseño de fármacos dirigidos a esta mutación. El tratamiento con estos fármacos contribuirá a mejorar la calidad de vida de los pacientes con la mutación, ya que los fármacos serán más efectivos y con menos complicaciones y efectos secundarios (1).

## **I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **I.2.I Antecedentes.**

Hoy en día la genética humana es una importante disciplina para el entendimiento de las enfermedades. Los aportes hechos en los últimos años en genética humana han permitido conocer los mecanismos de las enfermedades y mejorar el tratamiento de las mismas. En países desarrollados, la detección de marcadores genéticos constituye un paso imprescindible en los protocolos establecidos para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de las enfermedades. Sin embargo en Guatemala, el uso de marcadores genéticos no se encuentra disponible para los pacientes con bajo nivel socioeconómico, correspondiente al mayor porcentaje de la población guatemalteca. Actualmente, no existen publicaciones de instituciones latinoamericanas que hayan estudiado la mutación en el gen *JAK2*.

Uno de los campos prioritarios del Instituto para la Investigación Científica y la Educación de las Enfermedades Genética y Metabólicas Humanas –INVEGEM- es el área de hemato-oncológica.

Por esta razón se han realizado una gran cantidad de proyectos en esta área. La primera investigación realizada fue la detección de cuatro marcadores genéticos que brindan información de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda; dicho proyecto contó con financiamiento de SENACYT (FODECYT 48-2009) y se apoyó directamente a 150 pacientes.

El siguiente proyecto realizado en esta área (FODECYT 24-2010) fue el monitoreo molecular del gen BCR-ABL en pacientes con leucemia mieloide crónica; con el fin de determinar la respuesta al tratamiento que presentan los pacientes con esta patología.

Y el último proyecto que goza actualmente de financiamiento de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) es el proyecto FODECYT 28-2012 cuyo objetivo principal es la detección de monosomía del cromosoma 7 en pacientes con leucemia mieloide aguda.

Además se han realizado otros proyectos con financiamiento de INVEGEM, como lo es la detección de fragilidad cromosómica en pacientes con anemia de Fanconi.

Para continuar con la detección de marcadores genéticos en el área hemato-oncológica, se realizó el presente proyecto de investigación. En la cual la determinación de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>,

contribuyó al diagnóstico, clasificación y tratamiento de los síndromes mieloproliferativos crónicos.

### **I.2.2 Justificación del trabajo de investigación**

La determinación de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> en pacientes con Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial y Mielofibrosis Idiopática contribuyó a un mejor manejo del paciente por parte del médico; facilitando el diagnóstico y elección de tratamiento en estas patologías. Además, la detección de la mutación fue un paso importante para el desarrollo del área genética en el país y en la región centroamericana, ya que dicha prueba se encuentra ahora al alcance de todo guatemalteco que la necesite para su diagnóstico y tratamiento.

La detección de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> en SMPc en la población guatemalteca representa un importante foco de interés, debido a la gran cantidad de ensayos clínicos actualmente en ejecución a nivel mundial, desarrollados para fármacos dirigidos a la alteración. El tratamiento con estos fármacos contribuirá a la calidad de vida de los pacientes con la mutación, ya que los fármacos serán más efectivos y con menos complicaciones y efectos secundarios.

En otros países, la detección de la mutación constituye un procedimiento de rutina, por el valor pronóstico y diagnóstico que posee. Sin embargo en Guatemala, los médicos no poseían esta importante herramienta diagnóstica.

La presente investigación permitió identificar la mutación y confirmar el diagnóstico en los pacientes, lo cual orientó al médico en las decisiones terapéuticas a ser tomadas, en pacientes con *JAK2*<sup>V617F</sup> positivo. Además permitió conocer el comportamiento de la enfermedad en el país, a través de la determinación de las características genéticas como el estado homocigoto/heterocigoto del paciente, y características clínicas al momento del diagnóstico.

### I.3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### Objetivo General

Evaluar y determinar la presencia de la mutación  $JAK2^{V617F}$  en pacientes con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos.

#### Objetivos Específicos

- Evaluar y Determinarla presencia de la mutación  $JAK2^{V617F}$  en pacientes con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos.
- Confirmar el diagnóstico de Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial y Mielofibrosis idiopática, mediante la determinación de la presencia de esta mutación.
- Orientar al médico en las decisiones terapéuticas a ser tomadas en pacientes con la mutación  $JAK2^{V617F}$  positivo.
- Aportar evidencia científica al médico tratante, para la especificidad terapéuticas en los pacientes con  $JAK2^{V617F}$  positivo
- Divulgar a las autoridades, actores sociales e instituciones en el campo de su competencia la información obtenida de la investigación.

## I.4 METODOLOGÍA

### I.4.1 Localización:

Todas las muestras analizadas, provienen de pacientes guatemaltecos con diagnóstico clínico de síndromes mieloproliferativos crónicos, referidos del Hospital General San Juan de Dios, Hospital Roosevelt y la Unidad de Oncología Pediátrica –UNOP-.

### 1.4.2 Indicadores

El indicador medible es la frecuencia de la mutación V617F en el JAK2 expresada en porcentaje; de los pacientes con Síndromes mieloproliferativos crónicos.

### I.4.3 Estrategia Metodológica

- **Tipo de estudio:** El estudio realizado es de tipo descriptivo longitudinal prospectivo. Es descriptivo ya que se determinó la presencia por primera vez en Guatemala la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* en pacientes con Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial y Mielofibrosis idiopática. Longitudinal, porque inició en enero del 2013, y se recolectaron 154 muestras por un período aproximadamente de un año; y prospectivo porque se realizó de enero del 2013 en adelante.
- **Descripción de la población:** La población objetivo de este estudio la integraron todos los pacientes con diagnóstico clínico o alta sospecha clínica de Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial o Mielofibrosis idiopática. Sin importar la edad, preferiblemente sin tratamiento o sin tratamiento reciente y prolongado con citoreductores como Hidroxiurea, anagrelide o interferón  $\alpha$ .
- **Técnicas de muestreo y criterios de inclusión y exclusión:** La técnica de muestreo utilizada es por conveniencia.

Y los criterios de inclusión fueron:

- Presentar diagnóstico o alta sospecha clínica de Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial o Mielofibrosis idiopática.
- Paciente de 0 – 99 años

Sin tratamiento o sin tratamiento reciente y prolongado con citoreductores como Hidroxiurea, anagrelide o interferon  $\alpha$ .

Y los Criterios de exclusión fueron:

Presencia de Policitemias secundarias diagnosticadas o con alta sospecha clínica.

Presencia de Trombocitosis secundarias diagnosticadas o con alta sospecha clínica.

Presencia de Mielofibrosis secundarias diagnosticadas o con alta sospecha clínica.

- **Muestra:** 154 Pacientes guatemaltecos con diagnóstico presuntivo o diagnóstico confirmado de Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial o Mielofibrosis idiopática de los hospitales Roosevelt y Hospital General San Juan de Dios, durante el periodo Enero a Diciembre de 2013. Los pacientes analizados cumplieron con los criterios de inclusión previamente mencionados.

#### **I.4.4 El Método**

##### **Materiales y reactivos**

##### ***Extracción de Médula Ósea, Extracción de Leucocitos y Extracción de ADN, PCR y Electroforesis.***

La extracción de médula ósea o sangre periférica

- Tubos con EDTA
- Aguja para aspirado medular
- Alcohol
- Algodón
- Yodo
- Gasas

La extracción de leucocitos de médula ósea o sangre periférica se realizará mediante la lisis diferencial de amonio. Los reactivos a ser utilizados son:

- bicarbonato de amonio

- cloruro de amonio
- bicarbonato de sodio
- cloruro de sodio
- EDTA
- ácido clorhídrico
- hidróxido de sodio.

#### Extracción de ADN genómico.

- Kit comercial de Invitrogen Pure Link Genomic DNA mini kit se
- Tritón 100x
- TRIS
- EDTA
- NaCl
- HCl
- NaOH
- KCl
- MgCl<sub>2</sub>
- DNAzol

#### PCR del ADN genómico extraído

- Buffer PCR (10x)
- MgCl<sub>2</sub>(1.5 mM)
- dNTPs (0.25mM de dATP, dCTP, dTTP y dGPT)
- Oligonucleótidos o primers (0.5 μM de FO, RO, Fwt y Rmt)
- Taq Gold (1.5 U/μl)
- H<sub>2</sub>O DEPC

#### Electroforesis en gel de agarosa

- Agarosa
- TAE (Tris-Ácido Acético-EDTA)

## Tinción del Gel de agarosa

- Gel Red
- Agua destilada

## Otros insumos necesarios

- Tubos cónicos graduados 15 ml
- Tubos cónicos graduados de 50 ml
- Gelred
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Pipetas serológicas
- Pipetas automáticas
- Gradillas
- Tubos vacutainer con EDTA
- Pipetas Pasteur
- Puntas con o sin filtro de distintos tamaños
- Kimwipes
- Guantes
- Parafilm
- Nuclease Freewater 500 ml
- Nucleoclean
- RNAlater 100 ml
- RNA ZAP
- RnasFree Micro tubes 1.5 (500 tubes)
- Barriertips 10 ul 8x12 racks
- Barriertips 100 ul 8x12 racks
- Barriertips 200 ul 8x12 racks
- Barriertips 1000 ul 8x12 racks
- Barriertips 1000 ul 8x12 racks
- Puntas de distintos tamaños

## **Procedimiento**

La metodología utilizada para la detección de la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* se basa en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Alelo Especifica (ARMS). La prueba se basa en el diseño de primers para la discriminación de los dos alelos, el alelo común y el alelo mutado. La técnica será estandarizada basándose en las publicaciones de Jones A. y colaboradores y Chen Q. y colaboradores (3, 4).

### ***Obtención de muestras de pacientes***

Toda muestra fue recolectada bajo autorización previa, mediante un consentimiento informado de la aceptación de los pacientes para participar en el estudio y proporcionar los datos necesarios para su ejecución. En el caso de tratarse de menores de edad, el padre o tutor legal del paciente debe aceptar el consentimiento para dicha situación (Anexo 1 y 2).

Las muestras de médula ósea o sangre periférica se obtuvieron de pacientes referidos los doctores hemato-oncólogos de los Hospitales San Juan de Dios, Roosevelt e Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS); con diagnóstico de Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial o Mielofibrosis idiopática. Durante el periodo de un año (12 meses).

Las muestras se recolectaron mediante punción de 2 cc de medula ósea o 4 mL de sangre periférica. La muestra fueron colocadas en un tubo al vacío de 4 cc con EDTA (tapa morada) y se conservaron a 4° C hasta el momento del envío al laboratorio de INVEGEM. El tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras hasta su procesamiento en el laboratorio, no fue superior a las 24 horas.

### ***Obtención leucocitos de medula ósea***

La separación de células de medula ósea y sangre periférica se realizó mediante el protocolo de lisis diferencial de amonio, estandarizado y optimizado por INVEGEM. Las células obtenidas se almacenaron en RNAlater a -20 C hasta su utilización.

### ***Extracción ADN genómico a partir de Leucocitos obtenidos de medula ósea o sangre periférica***

El ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial PureLink® Genomic DNA Kit. El fundamento de este método de extracción se basa en la adsorción del ADN a una matriz (generalmente de sílica) mediante la adición de buffers con diferente potencial iónico que favorecen la unión y liberación del ADN a la matriz. Todos los reactivos y pasos del procedimiento se realizaron según las recomendaciones del fabricante (31).

### ***Reacción en Cadena de la Polimerasa Alelo Específica –ARMS-***

La ARMS para la determinación de la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* se estandarizó con las siguientes condiciones: 10 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 45 segundos a 59° C y 60 segundos a 72° C, con extensión final de 10 minutos a 72° C. Se evaluaron los resultados según la tabla que se presenta a continuación:

<b>Amplificación</b>	<b>Peso molecular (bp)</b>
Control externo	Banda control 453
Homocigoto no mutado	Banda control 453 Fwt-RO: 229
Homocigoto mutado	Banda control 453 Rmt-FO: 279
Heterocigoto mutado	Banda control 453 Fwt-RO: 229 Rmt-FO: 279

Fuente: (Chen Q., et al., 2007)

Se tomaron las secuencias de los cebadores y las precauciones descritas en las publicaciones de Jones A. y colaboradores y Chen Q. y colaboradores para mantener la calidad de la reacción (3, 4).

### ***Visualización en gel de agarosa***

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y después la tinción con gel red para la visualización de la (3, 4).

## Controles positivos

Como control positivo se utilizó la línea celular HEL, homocigota para la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> como lo recomienda Chen Q. y colaboradores en su publicación. Las líneas celulares se cultivaron según lo especificado por el fabricante ATCC y se almacenaron en nitrógeno líquido (4).

### A. Análisis de resultados

La recopilación de información del paciente y de los exámenes realizados se realizaron mediante el uso de la boleta de recolección de datos siguiente:



**INVEGEM**  
INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN DE  
LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS  
**BOLETA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE PACIENTES**

CÓDIGO DE LA  
MUESTRA

Uso exclusivo  
INVEGEM

DATOS GENERALES DEL PACIENTE	INFORMACIÓN DE LA MUESTRA
NOMBRE: _____ EDAD: _____ FECHA DE NACIMIENTO: ____/____/____ LUGAR DE ORIGEN: _____ TELÉFONO: _____ DIRECCIÓN: _____	FECHA DE RECOLECCIÓN: ____/____/____ TIPO DE MUESTRA: <input type="checkbox"/> SANGRE PERIFÉRICA <input type="checkbox"/> MÉDULA ÓSEA
<b>INFORMACION HEMATOLÓGICA</b>	
<b>INFORMACIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE</b> HOSPITAL DE REFERENCIA: <input type="checkbox"/> ROOSEVELT <input type="checkbox"/> IGSS <input type="checkbox"/> UNOP <input type="checkbox"/> GENERAL SAN JUAN DE DIOS <input type="checkbox"/> OTRO (especifique): _____ MEDICO QUE REFIERE: _____ TELÉFONO: _____ IMPRESIÓN CLÍNICA: <input type="checkbox"/> LMC <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> TE <sup>2</sup> <input type="checkbox"/> PV <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> MI <sup>4</sup> EVENTOS TROMBÓTICOS PREVIOS: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI   No. DE EVENTOS: _____ ESPLENOMEGALIA: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI   GRADO: _____ <small><sup>1</sup>Leucemia Mieloide Crónica, <sup>2</sup>Trombocitosis Esencial, <sup>3</sup>Policitemia Vera, <sup>4</sup>Mielofibrosis Idiopática</small>	FECHA: ____/____/____ RECUENTO ERITROCITARIO: _____ RECUENTO LEUCOCITARIO: _____ RECUENTO PLAQUETARIO: _____ HEMOGLOBINA: _____ HEMATOCRITO: _____ % BLASTOS: _____
<b>HALAZGOS RELACIONADOS A LA ENFERMEDAD</b>	
_____ _____ _____ _____	
<b>PACIENTES EN TRATAMIENTO CON IMATINIB O ANÁLOGOS</b>	
FECHA DE DIAGNÓSTICO: ____/____/____ FECHA DE INICIO TRATAMIENTO: ____/____/____ TRATAMIENTO Y DOSIS: _____ _____	

PRUEBA	TUBO DE RECOLECCIÓN	TIPO DE MUESTRA
ANÁLISIS CUALITATIVO DEL TRANSCRITO BCR-ABL t(9;22) EN LMC.	1 TUBO EDTA (MORADO)	MEDULA ÓSEA*
ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA MUTACIÓN V617F DEL GEN JAK2 EN TE, PV Y MI.	1 TUBO EDTA (MORADO)	SANGRE PERIFÉRICA
** Utilizar sangre periférica en recuentos >100,000 leucocitos/mm <sup>3</sup> y un porcentaje de blastos >90%		

#### **I.4.5 La técnica Estadística**

El estudio fue de tipo descriptivo, por esta razón no se aplicó ningún modelo estadístico, ya que únicamente se identificó la presencia de la mutación  $JAK2^{V617F}$  de acuerdo a la enfermedad, el estado homocigoto/heterocigoto del paciente.

#### **1.4.6 Los instrumentos a utilizar**

- Termociclador
- Fotómetro UV para cuantificación de ácidos nucleicos
- Vórtex
- Equipo de electroforesis
- Transiluminador
- Autoclave
- Centrifugas de alta velocidad
- Tanque almacenador de nitrógeno líquido; para almacenar líneas celulares.
- Congelador -20
- Soporte para tubos de 50 mL
- Centrifuga
- Vórtex
- Cronómetro
- Campana de flujo laminar

## PARTE II

### II.1 MARCO TEÓRICO (CONCEPTUAL)

#### 1. Síndromes Mieloproliferativos Crónicos o Neoplasmas Mieloproliferativos

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPc) o Neoplasmas Mieloproliferativos (NMPc) son enfermedades hematológicas, cuya característica principal es el aumento excesivo o sobreproliferación de células mieloides totalmente diferenciadas. Este tipo de enfermedades se les denomina desordenes clonales, debido a que el aumento de la línea celular es producto de la excesiva proliferación de una célula progenitora o célula madre hematopoyética (1).

La Organización Mundial de la Salud (World Health Organization –WHO-) en la revisión realizada en el 2008, clasifica los síndromes mieloproliferativos crónicos o neoplasmas mieloproliferativos en: 1) Leucemia Mieloide Crónica (LMC) *BCR/ABL1* positivo, 2) Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC), 3) Policitemia Vera (PV), 4) Mielofibrosis Idiopática (MI), 5) Trombocitosis Esencial (TE), 6) Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC), 7) Mastocitosis y 8) Neoplasmas Mieloproliferativos no clasificados (5).

Las nuevas disposiciones de la WHO fueron realizadas con base a las revisiones en los criterios de clasificación, influenciados por dos factores importantes: 1) el descubrimiento de anomalías genéticas que pueden ser utilizadas como marcadores diagnósticos en SMPc *BCR/ABL1*-negativo y 2) mejor identificación de las características histológicas que permiten identificar los subtipos de SMPc (5).

Hoy en día, la detección de rearrreglos o mutaciones clonales en genes que codifican proteínas de superficie/citoplasmáticas, hallazgos clínicos, resultados de laboratorio y/o características morfológicas son utilizados como criterios de diagnóstico. Aunque mutaciones en los genes *JAK2* o *KIT* no son específicas de un subtipo de SMPc, confirman la naturaleza clonal de la enfermedad y elimina la consideración de un proceso reactivo. La mutación más comúnmente reconocida en SMPc *BCR/ABL1*- negativo es *JAK2*<sup>V617F</sup>(5).

## A. Policitemia Vera

Es un desorden hematológico caracterizado por proliferación clonal de progenitores de médula ósea, guiando a la producción anormal de eritrocitos que crecen en ausencia de eritropoyetina. La PV está caracterizada por una eritrocitosis variable, asociada con leucocitosis y trombocitosis (6). La PV es una enfermedad con una incidencia estimada en Europa y Estados Unidos, aproximadamente de 1.9-2.3 casos por 100,000 persona/año. La incidencia es más alta en hombres que en mujeres (2.8 vs 1.3 casos/100,000 por año) y más alta en hombres de 70 – 79 años. Recientemente se ha asociado a la exposición con radiación o derivados del benceno (7).

Los criterios de clasificación para el diagnóstico de Policitemia Vera fueron establecidos por la WHO en la revisión realizada en 2008, y se enlistan en la tabla No.1 (5):

**Tabla No. 1 Criterios para el diagnóstico de Policitemia Vera**

---

Presencia de requerimientos diagnósticos:

- dos criterios mayores y un criterio menor
- un criterio mayor con dos criterios menores

---

**Criterio mayor**

1. Hemoglobina Hombres >18.5 g/dL, Mujeres 16.5 g/dL\*
2. Presencia de *JAK2*<sup>V617F</sup> u otra mutación similar como la mutación en exón 12 de *JAK2*

**Criterio Menor**

1. Biopsia de médula ósea mostrando hiperplasia para la edad, con crecimiento de tres líneas celulares (panmielosis) con prominente proliferación eritroide, granulocítica y megacariocítica.
2. Valores de eritropoyetina sérica por arriba del rango de referencia
3. Formación de colonias eritroides endógenas *in vitro*

---

\*Hemoglobina o Hematocrito > Percentil 99th del rango de referencia según edad, sexo y altitud de referencia o elevación de la masa celular >25% del valor predictivo normal.

Fuente: (Vardiman J W., et al, 2009)

Las manifestaciones clínicas de la PV pueden ser inespecíficas, como dolor de cabeza, debilidad, sudoración excesiva y prurito. El prurito se presenta especialmente después del baño y se atribuye

a la hipersensibilidad en los basófilos y la desnagulación de los mastocitos con liberación de histamina, factores fibrinolíticos, prostaglandinas e interleucina-3 (7).

Otros síntomas reportados relacionados a la microcirculación son eritromelalgia, mareos, disturbios auditivos y visuales, fenómeno parecido al de Raynaud y tromboflebitis superficial. La eritromelalgia es seguida de cianosis, la cual eventualmente progresa a isquemia y necrosis y se puede prevenir con bajas dosis de aspirina o antiinflamatorios no esteroideos. Las mujeres sufren de abortos con PV latente y se atribuye a disturbios de microcirculación (7).

En el diagnóstico diferencial es importante tener en cuenta las policitemias familiares y secundarias, en las cuales la etiología es diferente y por ende, las complicaciones clínicas. Por esta razón, la detección de la mutación  $JAK2^{V617F}$  es un marcador importante para el seguimiento del paciente. Hipotéticamente, todos los pacientes con PV presentan mutación en el gen  $JAK2$ , la mutación  $JAK2^{V617F}$  representa aproximadamente el 97% de los casos y la mutación en el exón 12 cerca del 3% (7, 8).

## **B. Trombocitosis Esencial (TE)**

La trombocitosis esencial (TE) fue reconocida como entidad distinta en 1934 bajo el término “trombocitemia hemorrágica”. La patología está caracterizada por trombocitosis con hiperplásicamegacariocítica medular, en otras palabras, existe un aumento en el número de células progenitoras de las plaquetas y por lo tanto, aumento en los recuentos plaquetarios sanguíneos. Además, existe un aumento en el riesgo de complicaciones vasculares como trombosis, disturbios microvasculares y hemorragias (9).

La TE fue catalogada dentro de los desórdenes mieloproliferativos por Dameshek en 1951. La TE es el desorden más común entre las tres patologías que comparten la mutación  $JAK2^{V617F}$  y también la que posee el pronóstico más favorable, debido a que enfermedad afecta la calidad de vida de los pacientes más que la sobrevivencia. La TE puede presentarse en todas las edades, mostrando una edad media de 60 años y con predominancia del género femenino. La mayoría de los pacientes son asintomáticos y pueden permanecer con la enfermedad por varios años sin presentar síntomas (9).

Las complicaciones más frecuentes son de tipo vascular, y según los estudios realizados están asociados a ciertos factores: 1) factores del hospedero como edad avanzada, historia de trombosis, factores de riesgo cardiovascular y trombofilia y 2) factores específicos de TE como trombocitosis, anormalidades funcionales y bioquímicas plaquetarias, activación endotelial y coagulación, leucocitosis, activación leucocitaria y plaquetaria, interacción leucocito-plaqueta y mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* y la carga alélica de la mutación. La carga alélica de la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* se define como el porcentaje de células que expresan la mutación en uno o ambos alelos del gen (8, 9).

Entre otras complicaciones, la evolución de la TE a mielofibrosis se observa en el 4 – 8% de los pacientes a 10 años y alrededor del 15% a los 15 años, mientras que la transformación leucémica es rara y se encuentra relacionada a ciertos citorreductores utilizados como tratamiento (9).

**Tabla No. 2 Estratificación del riesgo de pacientes con TE**

<b>Bajo Riesgo</b>	<b>Alto riesgo</b>
Edad $\leq$ 60 años	Edad $>$ 60 años*
Sin historia de trombosis	Historia de trombosis*
Recuento plaquetario $<$ 1500x 10 <sup>9</sup> /L	Recuento plaquetario $\geq$ 1500x 10 <sup>9</sup> /L**

\* Alto riesgo de trombosis      \*\*Alto riesgo de Hemorragias

Fuente: (Cervantes F., 2011)

En los pacientes con TE la estratificación del riesgo constituye un importante factor en la toma de decisiones terapéuticas, las cuales serán abordadas más adelante. La estratificación del riesgo se presenta en la tabla No. 2 (9).

La WHO definió en el 2008 los criterios diagnósticos para trombocitosis esencial, los cuales, al igual que en PV, permiten diferenciar formas familiares y secundarias de trombocitosis, importante en el abordaje terapéutico. Los criterios se presentan en la tabla No. 3.

**Tabla No. 3 Criterios para el diagnóstico de Trombocitosis Esencial**

---

Presencia de los cuatro criterios diagnósticos

---

1. Recuento plaquetario  $\geq 450 \times 10^9/L$
2. Biopsia de medula ósea mostrando proliferación del linaje megacariocítico con incremento del número de células de tamaño aumentado y megacariocitos maduros. Sin incremento significativo o desviación a la izquierda de granulopoyesisneutrofílica o eritropoyesis.
3. Sin la presencia de criterios de PV, mielofibrosis idiopática, LMC *BCR/ABL1* – positivo, síndrome mielodisplásico u otro SMPc según la WHO.
4. Demostración de *JAK2<sup>V617F</sup>* u otro marcado clonal, o en ausencia de *JAK2<sup>V617F</sup>* sin la presencia de trombocitosis reactiva.

---

Fuente: (Vardiman J W., et al, 2009)

### **C. Mielofibrosis Idiopática**

La mielofibrosis idiopática (MI) es uno de los síndromes mieloproliferativos crónicos caracterizado por grados variables de citopenias y/o citosis, con cuadro de leucoeritroblastosis sanguínea, fibrosis medular, hematopoyesis extramedular y hepatoesplenomegalia. Usualmente, afecta a personas con edad avanzada pero puede presentarse en individuos jóvenes. La supervivencia media reportada es variable y se encuentra en un rango entre 4-7 años; estudios recientes relacionan pobre supervivencia a factores como edad avanzada, anemia marcada, leucocitosis o leucopenia, cariotipo anormal, síntomas constitucionales y presencia de blastos en sangre (10, 19).

En la evolución de la enfermedad se presenta anemia progresiva, esplenomegalia sintomática y severos síntomas constitucionales. Las causas de muerte se relacionan a transformación leucémica, progresión de la enfermedad a fallo medular, complicaciones vasculares (trombosis, hemorragias, hipertensión portal) e infecciones (10).

En la tabla No. 4 se presentan los criterios de clasificación según la WHO para la MI:

#### **Tabla No. 4 Criterios para el diagnóstico de Mielofibrosis Idiopática**

---

Diagnóstico: Presencia de todos los criterios mayores y dos criterios menores

---

##### **Criterio Mayor**

1. Presencia de proliferación megacariocítica y atipia, usualmente acompañado por fibrosis (reticulina o colágeno) o en la ausencia de fibrosis reticulínica, los cambios megacariocíticos pueden estar acompañados de un aumento de celularidad medular caracterizada por proliferación granulocítica y a veces decremento de eritropoyesis (Por ejemplo: enfermedad de fase celular prefibrótica).
2. Sin la presencia de criterios de PV, LMC *BCR/ABL1* –positivo, síndrome mielodisplásico u otro SMPc según la WHO.
3. Demostración de *JAK2<sup>V617F</sup>* u otro marcador clonal (Por ejemplo: *MPLW515K/L*). En ausencia de los marcadores antes mencionados, sin evidencia de fibrosis medular secundaria a infección, desordenes autoinmunes u otra condición inflamatoria crónica, neoplasmas linfoides, malignidades metastásicas o mielopatías tóxicas (crónicas).

##### **Criterio Menor**

1. Leucoeritroblastosis
  2. Incremento de los niveles séricos de lactato deshidrogenasa
  3. Anemia
  4. Esplenomegalia palpable
- 

Fuente: (Vardiman J W., et al, 2009)

## **2. Mutación *JAK2<sup>V617F</sup>***

### **A. Descripción de la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* en SMPc**

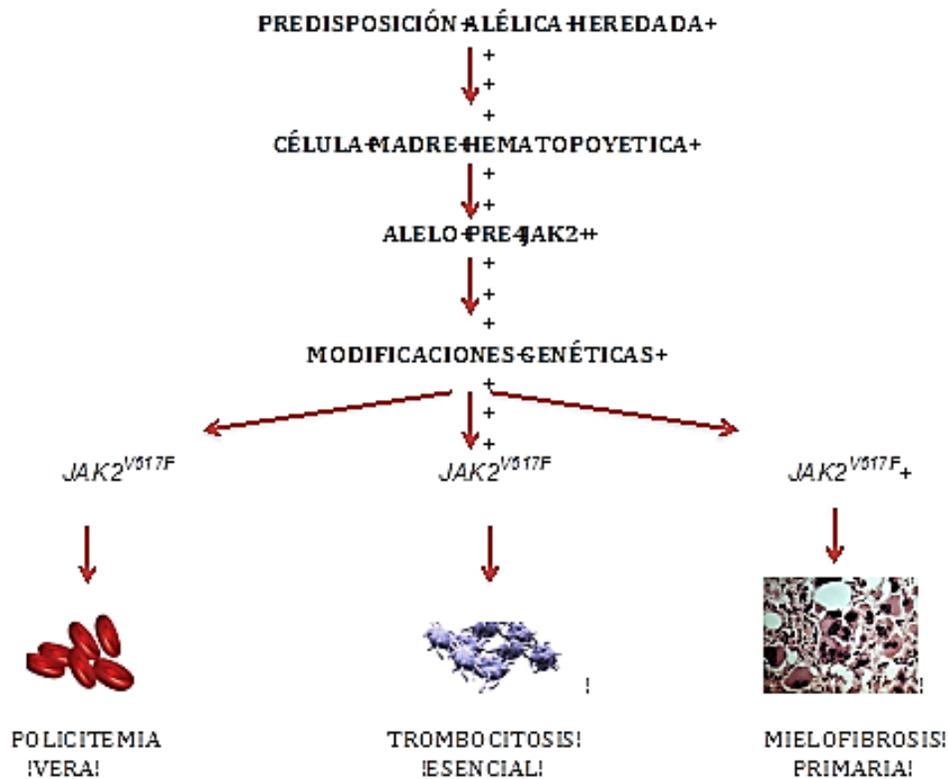
El gen *JAK2* se encuentra en el brazo p del cromosoma 9 y dicha mutación se produce en el exón 14 (11). La mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* se encuentra presente en >95% en pacientes con PV, 35-50% en MI y 32 – 57% en TE (1). A continuación se muestra una tabla con estudios donde describe la frecuencia de la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* en pacientes con SMPc:

**Tabla No. 5 Mutación  $JAK2^{V617F}$  en Síndromes Mieloproliferativos Crónicos**

Estudio	Policitemia Vera (%)	Trombocitosis Esencial (%)	Mielofibrosis Idiopática (%)
James <i>et al</i>	40/45 (89)	9/21 (43)	3/7 (43)
Levine <i>et al</i>	121/164 (74)	37/115 (32)	16/46 (35)
Baxter <i>et al</i>	71/73(97)	29/51 (57)	8/16 (50)
Kralovic <i>et al</i>	83/128 (65)	21/93 (23)	13/23 (57)
Zhao <i>et al</i>	20/24 (83)	—	—
Jones <i>et al</i>	58/72(81)	24/59 (41)	15/35 (43)
Total	393/506(78)	120/339 (35)	55/127 (43)

Fuente: (Schafer A., 2006)

**Figura No. 1 Hipótesis de la Mutación  $JAK2^{V617F}$**

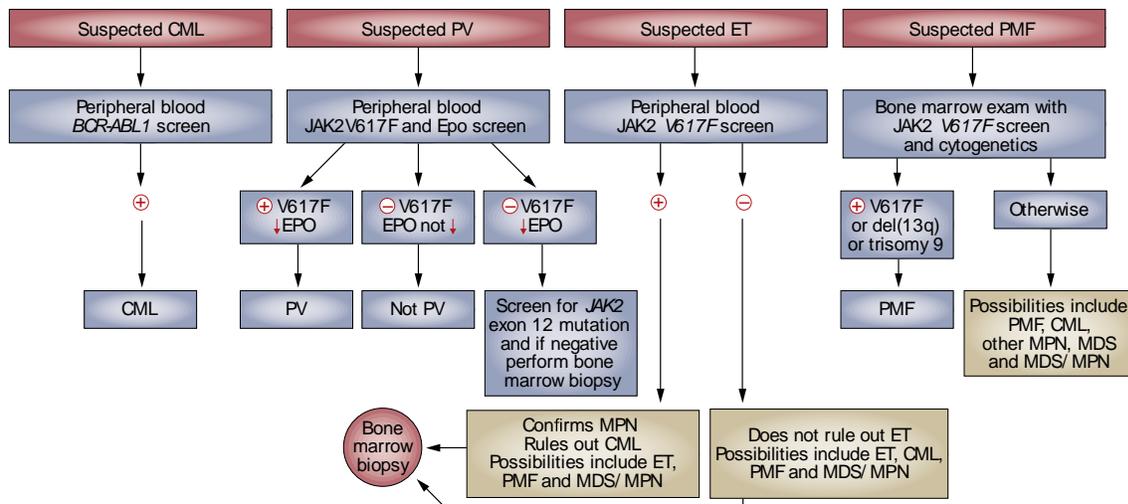


Fuente: (Landolfi R., et al, 2010)

La mutación  $JAK2^{V617F}$  es adquirida en un solo progenitor hematopoyético, lo cual desencadena un crecimiento anormal de las células progenitoras. En los pacientes con PV, esto les confiere a los eritrocitos la capacidad de formar colonias eritroides *in vitro* en ausencia de eritropoyetina exógena (7). El modelo hipotético propuesto por Levine y colaboradores se ilustra en la figura No.1, lo cual sugiere que los individuos pueden tener una susceptibilidad genética para adquirir la mutación, un fenómeno que podría contribuir a la diversidad fenotípica de los portadores de la misma (13).

La mutación  $JAK2^{V617F}$  es un importante criterio de diagnóstico en SMPc como se ha mencionado, a continuación se presenta un esquema o algoritmo diagnóstico para diferenciar las patologías clasificadas como SMPc. En el esquema se presenta una vez más, las decisiones diagnosticas con base a la presencia de la mutación  $JAK2^{V617F}$ , ver figura No. 2 (13).

**Figura No. 2 Algoritmo diagnóstico de SMPc**



Fuente: (Tefferi A, Skoda R y Vardiaman J, 2009).

### B. Mecanismo molecular de la mutación $JAK2^{V617F}$ y su papel en los SMPc

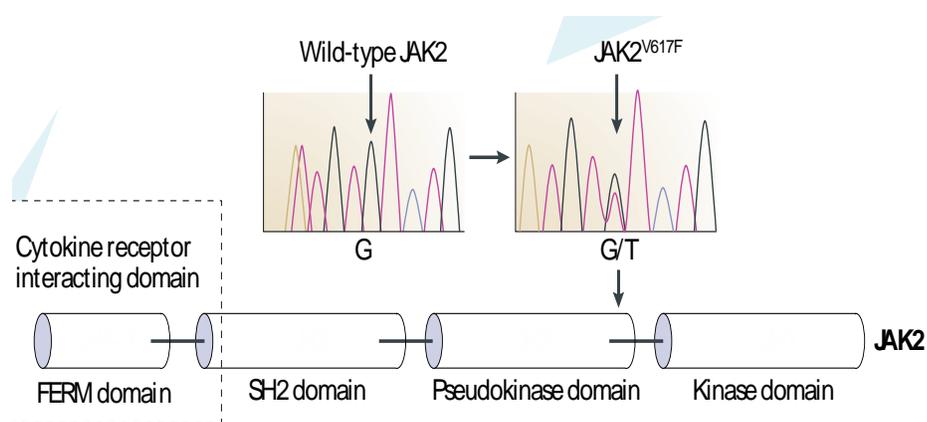
La proteína  $JAK2$  es una tirosin quinasa que interacciona con múltiples receptores celulares, como el receptor de la eritropoyetina (EPOR), receptor de la trombopoyetina (TOPR) y otros. Estos receptores son estimulados por factores de crecimiento que estimulan la proliferación celular. Los factores de crecimiento celular de mayor interés en estas patologías son la eritropoyetina (EPO) y la trombopoyetina (TPO) (1,12).

La proteína *JAK2* interacciona con estos receptores y funciona como un mensajero intracelular para activar la vía JAK-STAT (STAT –signal transducers and activators of transcription-). Se ha demostrado que *JAK2* activa principalmente STAT3 y STAT5, estimulando la proliferación celular (1, 12).

La mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> es producto de la sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 1,849 y por consiguiente, la sustitución del aminoácido valina por la fenilalanina en el codón 617. Dicha sustitución se encuentra en el dominio pseudoquinasa de la proteína, el cual tiene un papel importante en la regulación de la actividad quinasa de la enzima. La mutación provoca la activación constitutiva de la enzima, manteniendo activada la vía JAK-STAT sin estimulación de la EPO y TPO.

La figura No. 3 ilustra la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> y el dominio donde se produce la sustitución del aminoácido (1).

**Figura No. 3 Mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> y estructura de la proteína**



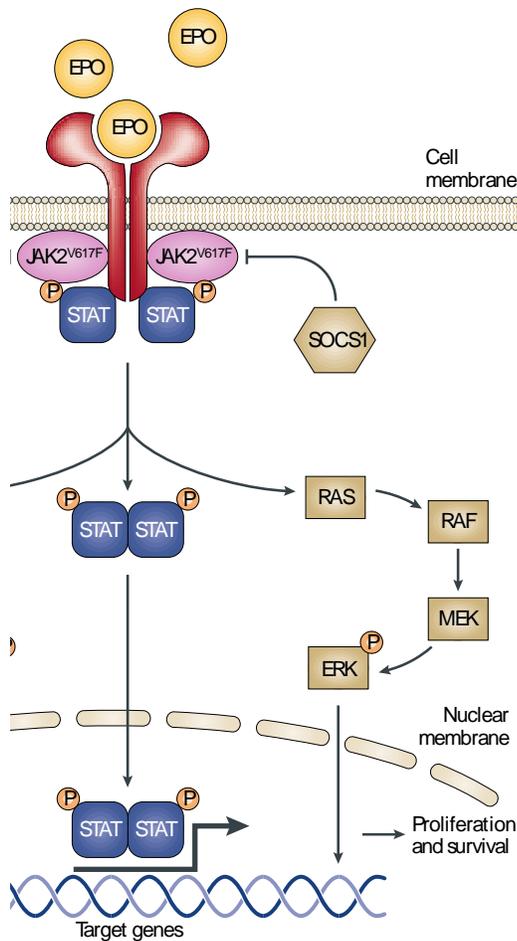
Fuente: (Quintás-Cardama A. et al, 2011)

En la figura No. 4 se ilustra el mecanismo de activación de la transcripción mediante la activación de la vía JAK-STAT por la eritropoyetina. La eritropoyetina (EPO) se une al receptor de la eritropoyetina (EPOR) y activa la vía y como consecuencia la proliferación celular. En la proteína *JAK2* mutada la activación a través de la EPO no es necesaria, ya que la proteína esta activa constitutivamente provocando proliferación celular descontrolada en PV (1).

### C. Pérdida de la heterociguidad

El heterocigoto es un individuo con dos alelos diferentes, en este caso corresponde a un alelo con la mutación  $JAK2^{V617F}$  y a otro sin la misma. En los SMPc los pacientes con la mutación  $JAK2^{V617F}$  pueden perder la heterociguidad, expresando la mutación en ambos alelos. En los estudios realizados por Kralovics y colaboradores, el mecanismo de la pérdida de la heterociguidad es consecuencia de la recombinación mitótica y duplicación del alelo  $JAK2^{V617F}$ , hipótesis compartida por Quintás-Cardama y colaboradores y Steensma en sus publicaciones. Este mecanismo se denomina disomíauniparental y se ilustra en la figura No. 5 (1, 2, 14). La frecuencia de la pérdida de la heterociguidad (homocigoto para la mutación) corresponde a 34% en PV, 22% en MI y 3% en TE (2, 11, 14).

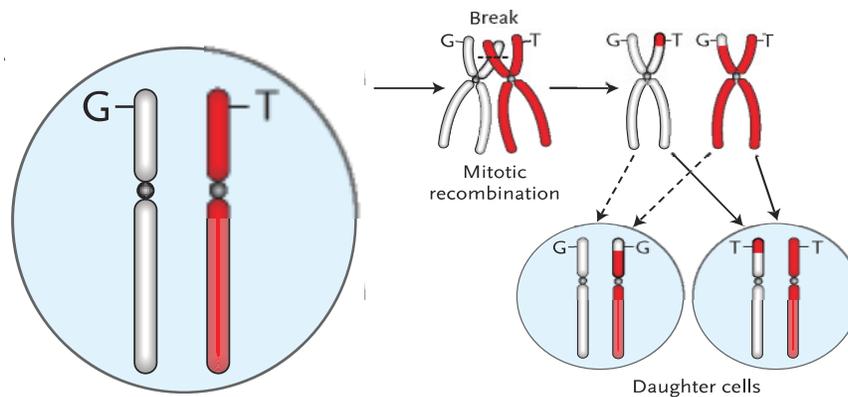
**Figura No. 4 Activación de la transcripción por la vía JAK-STAT por la Eritropoyetina**



Fuente: Quintás-Cardama A. et al, 2011

Se ha planteado una teoría para responder a la pregunta ¿cómo una misma mutación puede dar origen a tres enfermedades distintas? la cual se ha denominado “hipótesis de la proporción alélica”. Dicha hipótesis plantea que la carga alélica del gen mutado es uno de los factores más importante que contribuyen al fenotipo de los SMPc. Estudios experimentales en animales con sobreexpresión de  $JAK2^{V617F}$  muestran resultados muy parecidos a PV, sin trombocitosis y con futura evolución a mielofibrosis. Mientras que en baja expresión de  $JAK2^{V617F}$  se produjo una enfermedad muy parecida a TE con trombocitosis y sin eritrocitosis (9).

**Figura No. 5 Mecanismo de disomía uniparental para la pérdida de la heterocigidad**



Fuente: (Kralovics R. et al, 2005)

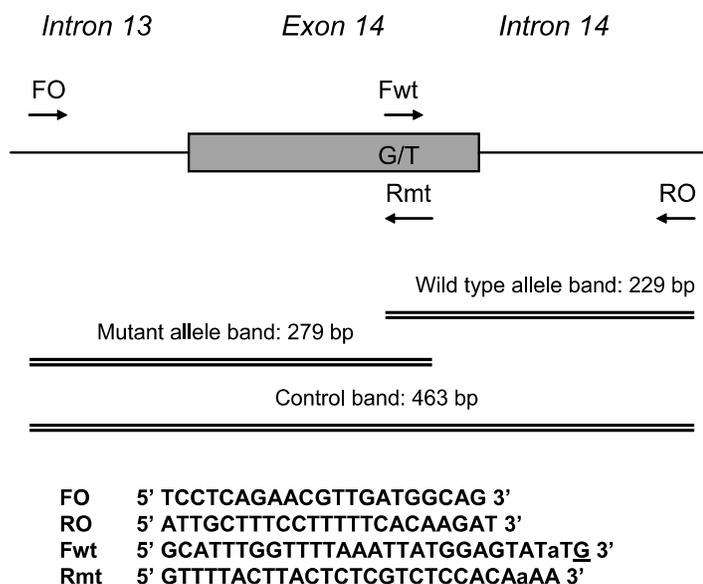
Esta hipótesis se correlaciona con la alta carga alélica presente en pacientes con PV y MI, mientras que en TE la carga alélica es baja. Las observaciones realizadas permitieron evidenciar, que los pacientes con PV y MI presentan estado homocigoto más frecuentemente en comparación con pacientes con TE, donde la homocigocidad es rara (9). La hipótesis de la proporción alélica no es suficiente para explicar el fenotipo de los SMPc, ya que factores epigenéticos, biológicos, mutaciones y del hospedero se encuentran relacionados (12).

### 3. Detección de la mutación $JAK2^{V617F}$ por Reacción en Cadena de la Polimerasa Alelo-Específica (ARMS-PCR)

Las técnicas para la detección de la mutación  $JAK2^{V617F}$  son diversas, secuenciación directa del ADN, Análisis de PCR en tiempo real y curva de melting de ADN, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), pirosecuenciación, reacción en cadena de la polimerasa alelo específica

(ARMS-PCR) y otras. La pirosecuenciación y ARMS-PCR son las técnicas con mayor especificidad y sensibilidad. La pirosecuenciación tiene la desventaja de ser muy costosa, por lo tanto la técnica de elección para la detección de la mutación es ARMS-PCR (14).

**Figura No. 6 Diagrama de ARMS-PCR**



Fuente: (Chen Q., et al., 2007)

La ARMS-PCR es una de técnica basada en el diseño de primer específicos para el alelo no mutado y el mutado, ya que los primers se unen perfectamente al ADN en el extremo 3'. Es importante utilizar un control de amplificación en la reacción, por lo que se utilizan dos primers externos (FO y RO) que permiten amplificar una región más grande en el ADN; y 2 primer internos, uno para la mutación (Rmt) y otro para el alelo no mutado (Fwt) (11,14). La figura No. 6 muestra el principio de la técnica.

#### 4. Complicaciones clínicas en SMPc con *JAK2*<sup>V617F</sup>

Las complicaciones más frecuentes en PV y TE son trombosis y hemorragias, y son las causas de morbi/mortalidad más comunes. El riesgo de hemorragias aumenta notablemente ante la presencia de trombocitosis  $\geq 1.5$  millones/mm<sup>3</sup> y el riesgo de trombosis, en presencia de antecedentes de trombosis y factores como hipercolesterolemia y tabaquismo. Los eventos trombóticos pueden

involucrar la circulación venosa, arterial y microcirculación, siendo la trombosis venosa, la más frecuente. Sin embargo, es la trombosis venosa (evento cerebrovascular e infarto) la que se relaciona más frecuentemente a morbi/mortalidad en PV y TE (12).

No existe un mecanismo por sí solo que explique los eventos trombo hemorrágicos en pacientes con PV y TE, ya que existen muchos factores asociados, ver tabla No. 6.

**Tabla No. 6 Factores y mecanismos de los eventos hemorrágicos y trombóticos**

<b>Eventos</b>	<b>Factor</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>Hemorrágicos</b>	Eritrocitosis	El aumento de la viscosidad sanguínea por la eritrocitosis, genera un desplazamiento de las plaquetas hacia el endotelio del vaso sanguíneo, produciendo interacciones plaquetarias que inducen la activación de las mismas.
	Enfermedad de von Willebrand adquirida	La trombocitosis incrementa la unión del factor de von Willebrand a las plaquetas y proteólisis del mismo.
	Anormalidades plaquetarias estructurales y funcionales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Decremento de la expresión de receptores plaquetarios</li> <li>• Expresión anormal de glicoproteínas membranales</li> <li>• Pérdida de receptores de prostaglandinas</li> <li>• Incremento de micropartículas plaquetarias</li> <li>• Metabolismo anormal de ácido araquidónico (deficiencia de lipoxigenasa e incremento de síntesis de tromboxanos).</li> </ul>
<b>Trombóticos</b>	Trombocitosis	Trombocitosis <i>per se</i>
	Aumento de Tpo	El aumento de la trombopoyetina induce la agregación plaquetaria
	Activación de neutrófilos y plaquetas	Inducen la formación del trombo
	Incremento en el % de agregados plaqueta-leucocitos	Resistencia adquirida de la proteína C asociada a bajos niveles de proteína S.
<b>Mielofibrosis</b>	Megacariocitos anormales	Aunque el proceso no está claro, se asocia a síntesis y liberación local de citosinas fibrogénicas

Fuente: (Schafer A., 2006)(Vannucchi A, 2010) (Cervantes F., 2011)

La presencia de la mutación  $JAK2^{V617F}$  y la carga alélica en PV y TE incrementa el riesgo de trombosis. Estos hallazgos fueron confirmados en tres meta-análisis, donde los resultados confirman que la mutación aumenta significativamente el riesgo de trombosis vs el alelo no mutado (15). En un estudio realizado por Vannucchi y colaboradores, se observó mayor riesgo de trombosis en TE en pacientes homocigotos vs heterocigotos (16).

Las complicaciones en MI comprenden anemia progresiva, esplenomegalia sintomática y severos síntomas constitucionales. En seis estudios realizados, donde se incluyeron 236 portadores para la mutación y 206 no portadores, se muestra fuerte asociación en la tendencia a incrementar el riesgo de trombosis en paciente con la mutación (10, 17). Aunque la mielofibrosis puede ser post-policitemia, el desarrollo de la misma se produce en el 10-20 % de los casos con PV (12).

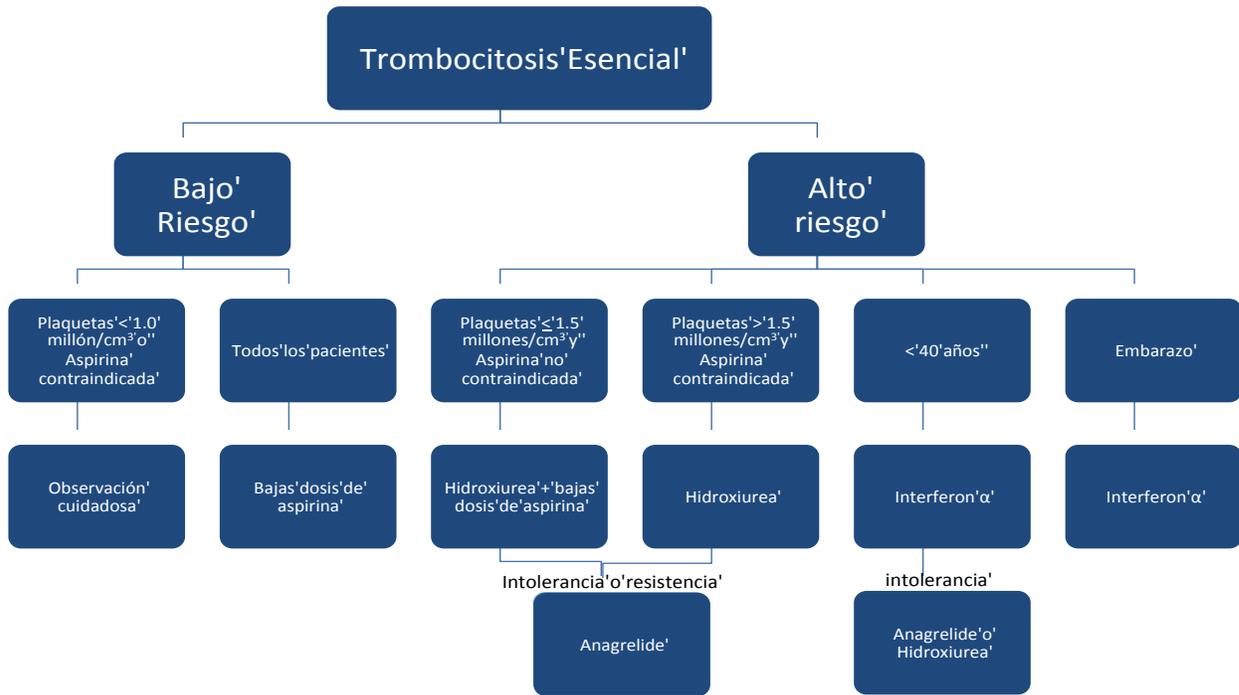
## **5. Tratamiento y manejo de los pacientes**

Klavovics y colaboradores reportan que los pacientes con  $JAK2^{V617F}$  positivo tienen mayor duración de la enfermedad y mayor riesgo de complicaciones como mielofibrosis, trombosis y hemorragias. Por esta razón, se hace necesario evaluar las medidas terapéuticas y la duración de las mismas, ya que los pacientes con la mutación requieren de medicación más prolongada con agentes citorreductivos (12). La alta carga alélica presente en pacientes homocigotos, hace necesario el uso de citorreductores para reducir sustancialmente los recuentos celulares sanguíneos y la esplenomegalia (18).

Los esquemas terapéuticos para la TE se establecieron según un consenso con base a la estratificación del riesgo, restringiendo el tratamiento citorreductivo para los pacientes con alto riesgo de trombosis o hemorragias. Sin dejar por un lado el tratamiento profiláctico con aspirina para aquellos pacientes con bajo riesgo. Los criterios de estratificación de riesgo fueron descritos en la sección de TE (9). El esquema terapéutico se muestra en la figura No. 7.

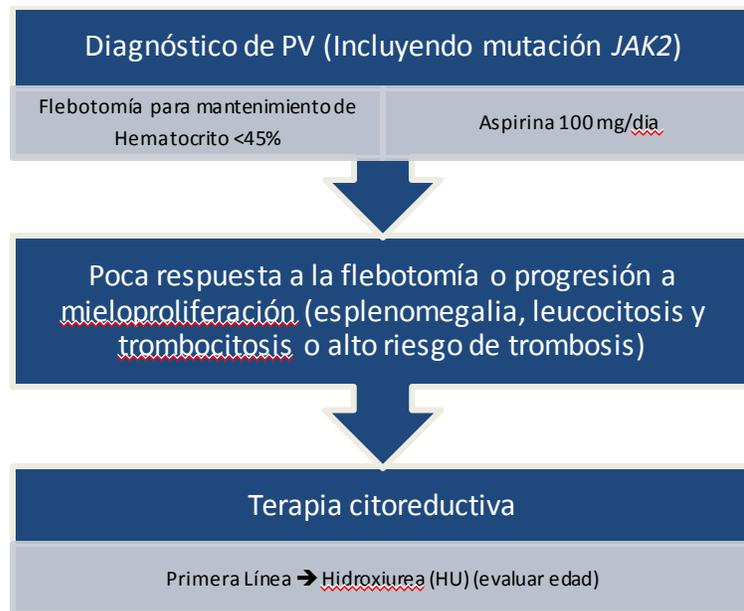
Los estudios realizados por Finazzi y Barbui en pacientes con PV sin tratamiento, muestran una alta incidencia de eventos trombóticos y expectativas de vida de alrededor de 18 meses después del diagnóstico. Por lo tanto, los esquemas terapéuticos para PV se basan en el mantenimiento del hematocrito en valores <45%. El esquema terapéutico se ilustra en la figura No. 8 (6).

**Figura No. 7 Esquema Terapéutico en Pacientes con Trombocitosis Esencial**



Fuente: (Cervantes F., 2011)

**Figura No. 8 Esquema Terapéutico en Pacientes con Policitemia Vera**



Fuente: (Finazzi G y Barbui T, 2007)

La hidroxiurea (HU) es la terapia de elección en PV, pues prolonga la supervivencia, previene eventos tromboticos y disminuye la progresión a mielofibrosis. Sin embargo se encuentra contraindicado en jóvenes pacientes y mujeres embarazadas o en edad reproductiva, por su potencial leucomogénico y teratogénico. En estas situaciones, el interferón  $\alpha$  puede sustituir a la HU (1, 6).

El interferón  $\alpha$  es un supresor de la hematopoyesis y disminuye los eventos trombohemorrágicos durante el seguimiento de los pacientes. Las desventajas del interferón  $\alpha$  son el costo, la administración parenteral y la alta incidencia de los efectos secundarios (6).

Anagrelide es otro agente citorreductor utilizado en TE, y se recomienda su uso en pacientes con alto riesgo de trombosis, debido a su asociación con transformación a mielofibrosis. Este agente no es leucomogénico y es relativamente selectivo inhibidor de la proliferación y diferenciación megacariocítica. Existen otras drogas como fósforo radiactivo, pipobroman y bisulfan, los cuales se recomiendan en pacientes con > 75 años con intolerancia a la HU, por su potencial leucomogénico (1, 6, 9).

En cuanto a la terapia para la MI, los citorreductores existentes no han mostrado prolongar la supervivencia de los pacientes, y solamente se utiliza terapia paliativa. Se utilizan corticoesteroides, danazol o agentes eritropoyéticos estimuladores para prevenir citopenias en la medida de lo posible. El trasplante allogenico de células madre, ofrece una oportunidad de cura para la enfermedad, sin embargo se encuentra asociado con substancial morbilidad y mortalidad (9, 10).

El seguimiento terapéutico en policitemias y trombocitosis secundarias es totalmente diferente al de los SMPc con la mutación, pues los síntomas y complicaciones son corregidos de acuerdo a la etiología de la misma. Por esta razón, la mutación  $JAK2^{V617F}$  es un importante marcador en el diagnóstico diferencial, tratamiento y seguimiento de estas patologías.

#### **A. Inhibidores de $JAK2^{V617F}$**

Las limitaciones en el tratamiento de los pacientes con SMPc hace necesaria la investigación de agentes dirigidos a la alteración, basados en los conocimientos generados sobre de la mutación en

el gen *JAK2*. Estas drogas en estudio pueden brindar esperanza a pacientes con fallo a la terapia por intolerancia o resistencia. Las primeras drogas dirigidas a un blanco definido en SMPc, son compuestos de bajo peso molecular ATP-competitivos con capacidad inhibitoria de la actividad de *JAK2* (1, 9).

El ruxolitinib es una terapia oral con potente inhibición de la actividad de las proteínas *JAK1* y *JAK2*, reduciendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis. Además reduce dramáticamente los niveles de marcadores inflamatorios sanguíneos, responsables de los síntomas constitucionales frecuentemente observados en MI (1).

Aunque el ruxolitinib no es específico para la mutación, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos ofrecen alentadores resultados para el uso de este fármaco en pacientes con SMPc. El medicamento se encuentra disponible en el mercado bajo el nombre de Jakavi® y distribuido por la farmacéutica Novartis (1).

Además en este estudio se mencionan otras drogas que se encuentran en diferentes fases de investigación por diferentes compañías biotecnológicas, la tabla No. 7 muestra las diferentes drogas y la fase en que se encuentra cada una de ellas. El desarrollo de más fármacos dirigidos a un blanco específico permitirá un tratamiento más directo de la etiología de la enfermedad y mejor manejo del paciente (1).

**Tabla No. 7 Drogas en estudio para SMPc y su fase de estudio**

<b>Droga</b>	<b>Fase</b>	<b>Referencia</b>
TG101348	III	(20).
Lestaurtinib	II	(21) (22).
XL019	detenido	(23) (24).
SB1518	I/II	(25).
CYT387	I/II	(26) (27).
AZD1480	I/II	(28).
INCB16562	Preclínica	(29).
NVP-BSK805	Preclínica	(20)

Fuente: (Quintás-Cardama A. et al, 2011)

## **B. Respuesta Completa en PV**

La definición de respuesta completa corresponde a hematocrito  $< 45\%$  y recuento plaquetario por debajo de  $600,000/\text{mL}$  sin flebotomía previa. Generalmente, la respuesta completa se alcanza en la mayoría de los casos 1 ó 2 años después del inicio del tratamiento, con notable ausencia de eventos trombohemorrágicos durante el periodo de seguimiento. Cuando la respuesta completa ha sido alcanzada, las dosis de mantenimiento pueden ir en decremento en la mayoría de los casos (6).

### PARTE III

#### III.1 RESULTADOS

A continuación se muestra la tabla No. 8; en el que se incluyen todos los pacientes a los que se les realizó la mutación en el gen JAK2, haciendo un total de 154 pacientes.

**TABLA NO. 8: RESULTADOS DE JAK2 V617F DE LOS PACIENTES ANALIZADOS**

	<b>CÓDIGO</b>	<b>EDAD</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>IMPRESIÓN CLÍNICA</b>	<b>LEUCOCITOS (X10<sup>3</sup>/uL)</b>	<b>ERITROCITOS (x10<sup>6</sup>/uL)</b>	<b>Hb g/dL</b>	<b>Ht (%)</b>	<b>Plq (X10<sup>3</sup>/uL)</b>
1	21-LMC	51	NEGATIVO	TE	8.6	4.66	12.99	39.11	1169
2	25-LMC	42	NEGATIVO	TE	195	ND	7.59		833
3	53-LMC	11	NEGATIVO	TE	15.69	ND	13.6	38.6	2204
4	95-LMC	6	NEGATIVO	TE	ND	ND	ND	ND	1000
5	127-LMC	70	HOMOCIGOTO	PV	12.2	4.88	18.8	54.8	325
6	140-LMC	64	HETEROCIGOTO	PV	3.78	4.47	14.1	41.7	273
7	141-LMC	29	NEGATIVO	SMPc	17.7	4.04	11.8	35.9	417
8	145-LMC	77	HETEROCIGOTO	SMPc	9.6	3.37	11	32	222
9	150-LMC	42	NEGATIVO	TE	ND	ND	ND	ND	500
10	152-LMC	48	NEGATIVO	SMPc	14.6	ND	14	ND	374
11	153-LMC	74	HETEROCIGOTO	TE	6.6	3.96	12	35.4	395
12	155-LMC	65	NEGATIVO	SMPc	10.4	4.22	13.4	38.8	368
13	170-LMC	65	HOMOCIGOTO	SMPc	56.1	2.77	7.5	23.7	128
14	JAK2-1		NEGATIVO	PV	18.8	7.64	21.4	67.6	114
15	185-LMC	61	HETEROCIGOTO	TE	5.2	4.55	13.7	39.9	623
16	190-LMC	53	NEGATIVO	SMPc	2.68	3.42	8.84	28.14	83.27
17	186-LMC	38	NEGATIVO	TE	7	ND	7	25	828
18	187-LMC	76	HETEROCIGOTO	TE	8.2	3.64	12	34.7	490
19	189-LMC	68	NEGATIVO	TE	15.1	4	10.6	32.7	948
20	192-LMC	44	NEGATIVO	PV	5	6.61	21.4	63.3	142
21	197-LMC	69	HETEROCIGOTO	PV	15	6.53	17.1	53.5	1196
22	JAK2-2	68	NEGATIVO	TE	6.75	2.9	8.1	25	771

	<b>CÓDIGO</b>	<b>EDAD</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>IMPRESIÓN CLÍNICA</b>	<b>LEUCOCITOS (X10<sup>3</sup>/uL)</b>	<b>ERITROCITOS (x10<sup>6</sup>/uL)</b>	<b>Hb g/dL</b>	<b>Ht (%)</b>	<b>Plq (X10<sup>3</sup>/uL)</b>
23	204-LMC	64	HETEROCIGOTO	SMPc	5.3	5.37	15.9	46.9	319
24	206-LMC	64	HOMOCIGOTO	TE	21.7	4.16	14.1	43.8	242
25	JAK2-3	66	HOMOCIGOTO	TE	14.21	6.89	16.8	51.3	594
26	208-LMC	45	NEGATIVO	TE	15.1	4.51	13.9	40.7	2223
27	JAK2-4	40	HETEROCIGOTO	TE	10.5	ND	15.5	44.6	953
28	JAK-5	60	HETEROCIGOTO	TE	46.3	ND	9.2	27.6	1055
29	210-LMC	95	NEGATIVO	TE	10.95	4.38	11.94	36.12	1058
30	JAK-6	P	NEGATIVO	SMPc	22.45	ND	12.4	57	515
31	220-LMC	36	NEGATIVO	PV	3.5	5.29	16.5	47.2	133
32	JAK-7	80	HETEROCIGOTO	TE	9.11	ND	14.2	ND	870
33	JAK-8	29	NEGATIVO	SMPc	ND	ND	ND	ND	ND
34	222-LMC	77	HETEROCIGOTO	SMPc	53.16	ND	7	ND	101
35	JAK-9	12	NEGATIVO	TE	8.7	4.32	12.7	38	1198
36	227-LMC	78	HETEROCIGOTO	TE	8.83	4.3	13.49	39.49	634.4
37	229-LMC	38	HETEROCIGOTO	PV	2.8	5.54	18.02	53.28	83.3
38	JAK-10	61	HETEROCIGOTO	PV	8.37	ND	19	53	152
39	231-LMC	69	HOMOCIGOTO	TE	30290	ND	16	ND	2027
40	233-LMC	60	NEGATIVO	SMPc	ND	ND	ND	ND	ND
41	235-LMC	78	NEGATIVO	TE	33.3	3.43	9.6	31.3	1100
42	236-LMC	74	HOMOCIGOTO	TE	ND	ND	ND	ND	ND
43	JAK-11	69	HOMOCIGOTO	MI	25.08	3.63	8.8	27	538
44	238-LMC	65	HOMOCIGOTO	MI	49.9	3.79	10.7	32.4	737
45	JAK-12	62	HOMOCIGOTO	MI	19	6.58	18	55.5	140
46	JAK-13	42	NEGATIVO	TE	18.6	3.24	9.2	28.8	1013
47	JAK-14		NEGATIVO	TE	8.1	4.39	12.7	38.8	606
48	JAK-15	35	HETEROCIGOTO	TE	9.9	8.34	14.3	48.3	924
49	JAK-16	90	NEGATIVO	TE	10.21	ND	13.3	ND	988
52	JAK-19	82	NEGATIVO	TE	9.35	4.29	13	39	884
50	JAK-17	63	HETEROCIGOTO	MI	3.84	33.7	9.45	33.7	181

	<b>CÓDIGO</b>	<b>EDAD</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>IMPRESIÓN CLÍNICA</b>	<b>LEUCOCITOS (X10<sup>3</sup>/uL)</b>	<b>ERITROCITOS (x10<sup>6</sup>/uL)</b>	<b>Hb g/dL</b>	<b>Ht (%)</b>	<b>Plq (X10<sup>3</sup>/uL)</b>
53	243-LMC	82	NEGATIVO	SMPc	75.23	ND	10	ND	538
55	JAK-21	83	HOMOCIGOTO	PV	32.9	9.56	17.2	58.2	173
54	JAK-20	10	NEGATIVO	TE	19	ND	3.6	13.4	919
56	JAK-22	31	NEGATIVO	PV	12	ND	17.8	ND	350
57	JAK-23	42	NEGATIVO	TE	12	ND	10.5	ND	950
58	JAK-24	70	HETEROCIGOTO	TE	ND	ND	ND	ND	1128
59	245-LMC	76	HETEROCIGOTO	TE	8.88	5.04	14.01	41.63	796.6
60	JAK-25	69	NEGATIVO	PV	ND	ND	18.1	ND	ND
61	248-LMC	51	NEGATIVO	PV	ND	ND	19	ND	450
62	249-LMC	73	HETEROCIGOTO	PV	20.8	3.1	16.2	48.2	1169
63	JAK-26	11	NEGATIVO	PV	4.7	9.04	23	66.6	192
64	JAK-27	42	HETEROCIGOTO	TE	6.8	4.32	12.5	36.8	498
65	JAK-28	61	HOMOCIGOTO	PV	ND	ND	ND	ND	ND
66	JAK-29	60	NEGATIVO	TE	30	ND	5	ND	2895
67	JAK-30	65	NEGATIVO	TE	6.12	4.82	15.4	44.78	563.9
68	JAK-31	63	NEGATIVO	TE	7.67	4.77	14.17	41.59	557.7
69	JAK-32	49	NEGATIVO	TE	9.1	5.82	16.3	51	480
70	JAK-33	37	NEGATIVO	SMPc	15.87	4.32	13.73	40.31	339.7
71	253-LMC	6	NEGATIVO	SMPc	103000	ND	8.1	ND	103
72	JAK-34	50	NEGATIVO	SMPc	3.8	5.5	15	45.7	348
73	JAK-35	54	NEGATIVO	SMPc	2.92	5.61	14.3	42.9	324
74	JAK-36	63	HETEROCIGOTO	PV	11.01	7.83	23	69	870
75	JAK-37	42	HETEROCIGOTO	PV	ND	ND	19.3	47.5	
76	JAK-38	71	HETEROCIGOTO	TE					
77	JAK-39	29	NEGATIVI	PV	5.72	5.79	18.31	52.18	279.3
78	JAK-40	65	HETEROCIGOTO	SMPc					
79	JAK-41	61	NEGATIVO	TE	8.63	3.69	11.4	34.9	839
81	JAK-43	56	NEGATIVO	TE	3.7	4.72	13.4	41.2	406
82	JAK-44	37	HETEROCIGOTO	TE	6.6	4.13	11	34.1	327

	<b>CÓDIGO</b>	<b>EDAD</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>IMPRESIÓN CLÍNICA</b>	<b>LEUCOCITOS (X10<sup>3</sup>/uL)</b>	<b>ERITROCITOS (x10<sup>6</sup>/uL)</b>	<b>Hb g/dL</b>	<b>Ht (%)</b>	<b>Plq (X10<sup>3</sup>/uL)</b>
83	JAK-45	38	NEGATIVO	TE	6.15	4.47	11.95	37	693
84	JAK-46	76	HETEROCIGOTO	TE	12.9	4.26	12.8	37.5	1036
85	JAK-47	78	HETEROCIGOTO	PV	16.88	4.62	11.6	35.6	2309
86	JAK-48	32	NEGATIVO	PV	16400	7	19	54	21000
87	JAK-49	70	HOMOCIGOTO	TE	32.08	6.04	17.56	54.65	387.8
88	JAK-50	6	NEGATIVO	PV	7.45	9.98	25.5	74.1	119
89	JAK-51	48	NEGATIVO	TE	3.99	4.62	13.51	40.46	364.4
90	JAK-52	55	NEGATIVO	MI	3.24	5.51	16.94	51.12	312.1
91	JAK-53	66	HETEROCIGOTO	TE	9.4	5.15	17.29	51.65	639.9
92	JAK-54	53	NEGATIVO	PV	6.42	5.46	18.38	53.45	194.5
93	LMC-58	81	HETEROCIGOTO	PV	17.19	6.23	13.24	43.43	739.2
94	JAK-55	60	NEGATIVO	TE	12.3	4.12	13.56	4.38	536
95	JAK-56	64	NEGATIVO	TE	32.5	3.99	10.2	33.9	1191
96	LMC-176	43	NEGATIVO	SMPc					
97	LMC-263	72	HOMOCIGOTO	TE	43.52		12.7	48	614
98	JAK-57*	78	HETEROCIGOTO	PV	16.23	5.1	12.3	38.2	2477000
99	JAK-58	32	NEGATIVO	TE	9.17	3.68	10.2	29.6	1276000
100	JAK-59	78	HETEROCIGOTO	TE	28.87	4.1	12.7	36.6	1872000
101	JAK-60*	54	NEGATIVO	TE	18.6	3.66	11.5	35.6	383
102	JAK- 61	58	HETEROCIGOTO	TE/MI					750
103	JAK-62	35	NEGATIVO	TE	9.16	4.41	12.2	47.08	847
104	JAK-63	78	HETEROCIGOTO	TE	22.22	4.47	12.9	43.6	1156000
105	JAK-64	32	NEGATIVO	SMPc	31,200	2,800	6.66	21.3	369000
106	JAK-65*	70	HOMOCIGOTO	SMPc	13.67	4.46	14.6	41.6	291000
107	JAK-66	51	NEGATIVO	TE	11.18	3.88	11.4	33.34	1068000
108	JAK-67	44	NEGATIVO	TE	7.3	4.31	11.6	36.5	649000
109	JAK-68	19	NEGATIVO	SMPc					
110	JAK-69	53	NEGATIVO	PV	5.16	6.42	20.04	58.23	214.8
111	JAK-70	81	HETEROCIGOTO	TE					

CÓDIGO	EDAD	RESULTADO	IMPRESIÓN CLÍNICA	LEUCOCITOS (X10 <sup>3</sup> /uL)	ERITROCITOS (x10 <sup>6</sup> /uL)	Hb g/dL	Ht (%)	Plq (X10 <sup>3</sup> /uL)	
112	JAK-71	73	NEGATIVO	TE	14	4.96	15	45	835
113	JAK-72	12	NEGATIVO	PV	5.68	10.12	24	83	229.3
114	JAK-73	19	NEGATIVO	PV	11.29	5.83	16.94	53.53	390
115	JAK-74	68	NEGATIVO	TE	6.44	4.94 X106	14.1	43.1	600000
116	JAK-75	48	NEGATIVO	SMPc	7.2	3.11	8.7	27.8	33
117	JAK-76	66	HETEROCIGOTO	TE	13.42	4.74	14.5	45	620000
118	JAK-77	57	NEGATIVO	PV	5,690	5,380	17.7	50.4	272000
119	JAK-78	89	NEGATIVO	MI	45000		10	30	1.5X106
120	JAK-79	66	NEGATIVO	PV	12.85	6.11	19.7	63	232.9
121	JAK-80	57	NEGATIVO	TE	7.4	4.21	12.7	38.7	424
122	JAK-81	45	NEGATIVO	TE	12.21	5.22	13.98	45.48	462,000
123	JAK-82	36	NEGATIVO	TE	6.32	4.23	12.46	40.15	280000
124	JAK-84	64	NEGATIVO	TE					
125	JAK-85	67	NEGATIVO	TE	36.86	3.84	11.2	32.53	459.6
126	JAK -86	71	HETEROCIGOTO	MI	4.4	7.72	22.7	71.7	140
127	JAK-87	23	NEGATIVO	TE	6820	9150	20.9	64.6	185000
128	JAK-88	33	NEGATIVO	TE	4260	9410	22.4	67.1	190000
129	JAK-89	75	HETEROCIGOTO	TE	12.5	4.75	13.3	41.4	1711
130	JAK-90	76	NEGATIVO	PV	1.54	3.9	11.61	34.77	67.89
131	JAK-91	28	NEGATIVO	PV	7.7	7.27	22	63	162
132	JAK-92	77	HETEROCIGOTO	TE					
133	JAK-93	NR	NEGATIVO	TE	5.56	4.24	10.6	3.3	619000
134	JAK-94	29	NEGATIVO	PV	8.03	9.33	25.1	85.3	38.2
135	JAK-95	45	NEGATIVO	SMPc					
136	JAK-96	64	NEGATIVO	SMPc					
138	JAK-98	62	HETEROCIGOTO	TE	5.3	4.37	8.6	29.5	446
139	JAK-99	52	HETEROCIGOTO	TE	9.66	5.44	15.67	45.75	901.8
140	JAK-100	40	NEGATIVO	PV	8.33	7.09	21	60.2	250
141	JAK-101	64	NEGATIVO	TE	8	4.39	14.4	41.1	449,000

CÓDIGO	EDAD	RESULTADO	IMPRESIÓN CLÍNICA	LEUCOCITOS (X10 <sup>3</sup> /uL)	ERITROCITOS (x10 <sup>6</sup> /uL)	Hb g/dL	Ht (%)	Plq (X10 <sup>3</sup> /uL)	
142	JAK-102	38	NEGATIVO	PV	7.83	5.87	18.1	51.78	240.8
143	JAK-103	30	NEGATIVO	TE	7.08	3.88	7.3	27.8	1,278,000
144	JAK-104	51	NEGATIVO	SMPc					
145	JAK-105	59	HETEROCIGOTO	PV	12.27		20.2	61	165000
146	JAK-106	75	HETEROCIGOTO	PV	9.8	3.82	7.9	26.3	501000
147	JAK-107	49	NEGATIVO	PV	7.15	6.09	19	54.3	559000
148	JAK-108	39	NEGATIVO	TE	9.8	4.6	14	42.4	518000
149	JAK-109	38	NEGATIVO	PV	5.2	5.85	15.7	47.4	227000
	JAK-								
150	110/LMC80	58	NEGATIVO	TE	9.6	4.72	13.2	40.1	543000
151	JAK-111	72	HETEROCIGOTO	PV					
152	JAK-112	67	NEGATIVO	SMPc	13.39	3.5	11.5	34.3	1720
153	JAK-113	63	NEGATIVO	SMPc					
154	JAK-114	53	HOMOCIGOTO	PV	31	7.83	12.8	45.6	1088000

De todos los pacientes analizados, 44 fueron heterocigotos para la mutación V617F del gen JAK2; es decir que solo presentan un alelo del gen mutado. 15 pacientes fueron homocigotos para la mutación V617F, es decir que muestran los dos alelos afectados. Y 95 pacientes fueron negativos para la mutación (Ver tabla No. 9)

TABLA No. 9: PRESENCIA DE MUTACIÓN V617F EN GEN JAK2

TOTAL	CANTIDAD DE PACIENTES
TOTAL DE CASOS ANALIZADOS	154
TOTAL DE CASOS HOMOCIGOTOS	15
TOTAL DE CASOS HETEROCIGOTOS	44
TOTAL DE CASOS NEGATIVOS.	95

Los síndromes mieloproliferativos se dividen en tres tipos: trombocitosis esencial, policitemia vera y mielofibrosis idiopática. El 38% del total de casos de trombocitosis esencial fue positivo para la mutación V617F del gen JAK2. EL 40% del total de casos de policitemia vera son positivos para la

mutación y un total de 75% de pacientes de mielofibrosis ideopática fueron positivos (Ver tabla No. 10).

TABLA No. 10: RESUMEN DE CASOS ANALIZADOS PARA LA MUTACIÓN V617F DEL GEN JAK2

SÍNDROME MIELOPROLIFERATIVO	% CASOS POSITIVOS
TROMBOCITOSIS ESENCIAL	38
POLICITEMIA VERA	40
MIELOFIBROSIS	75

A continuación se presentan los resultados de electroforesis de los pacientes que dieron positivos para la mutación estudiada en el presente proyecto FODECYT 07-2013 (Ver figura 9 a 31).

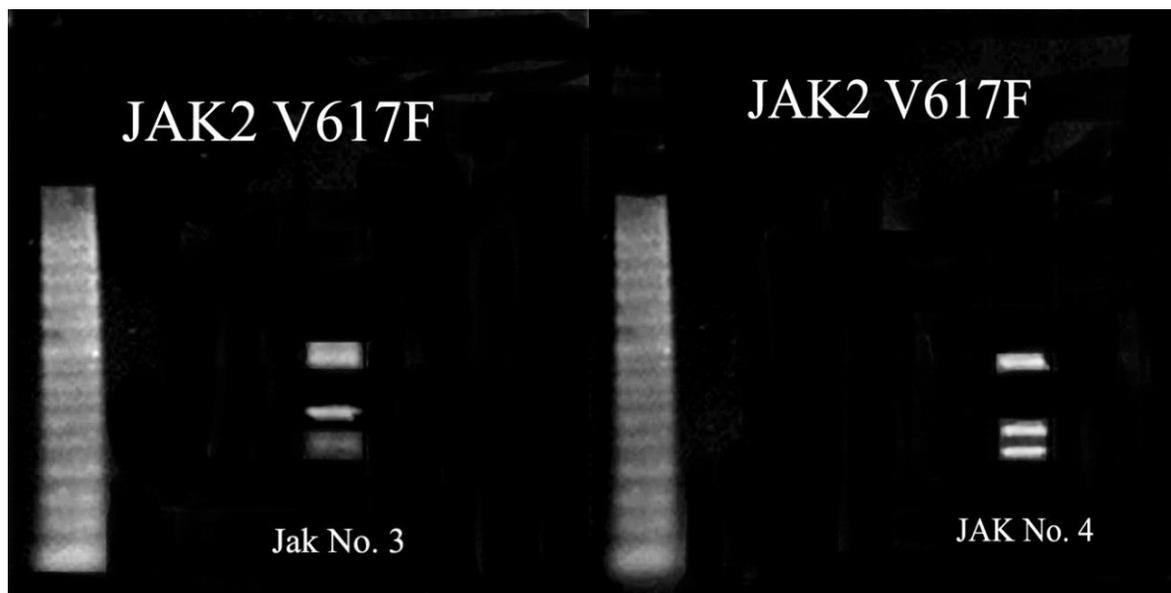


Figura No. 9: se observan las bandas de los pacientes No.3 y 4, ambos positivos heterocigotos

Fuente: FODECYT 07-2013

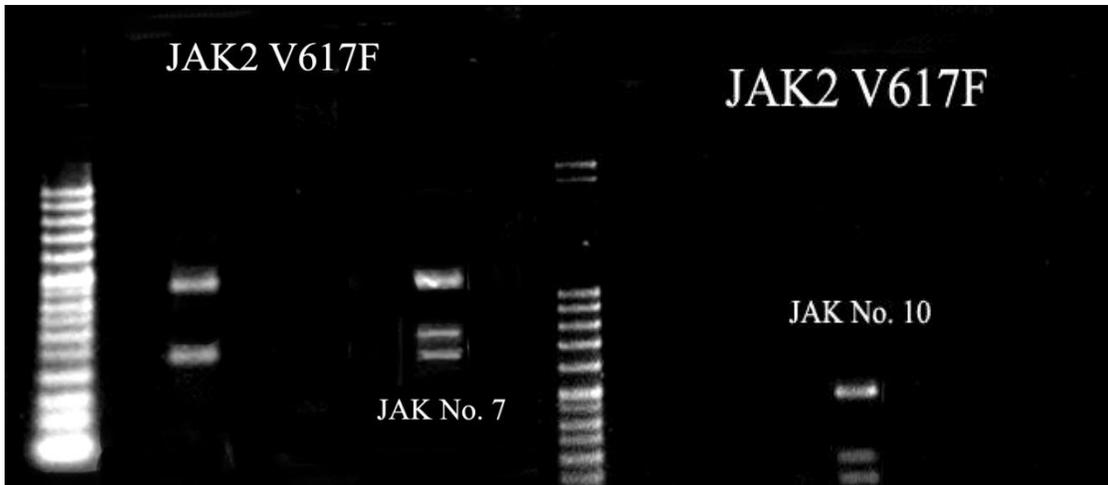


Figura No. 10: se observan las bandas de los pacientes No.7 y 10, ambos positivos heterocigotos

Fuente: FODECYT 07-2013



Figura No. 11: se observan las bandas de los pacientes No.11 y 12, ambos positivos homocigotos

Fuente: FODECYT 07-2013

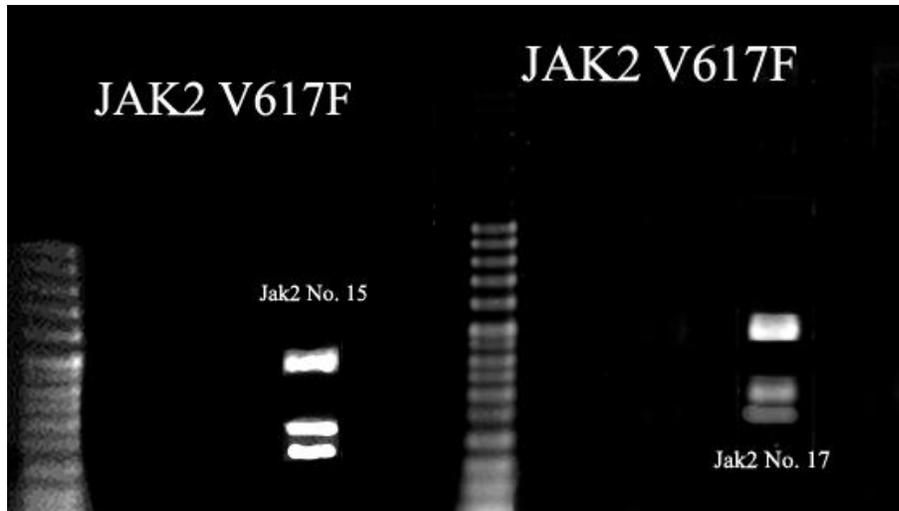


Figura No. 12: se observan las bandas de los pacientes No.15 y 17, ambos positivos heterocigotos

Fuente: FODECYT 07-2013

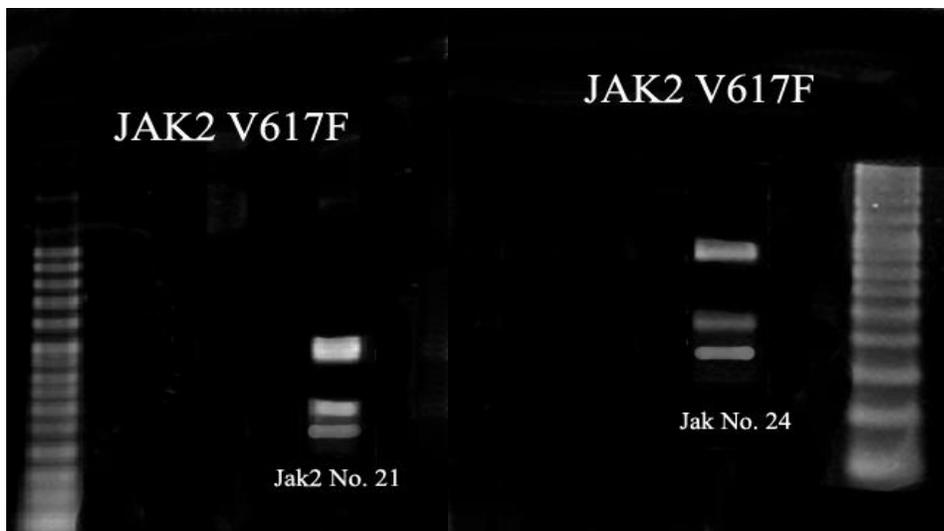


Figura No. 13: se observan las bandas de los pacientes No.21 y 24, ambos positivos heterocigotos

Fuente: FODECYT 07-2013

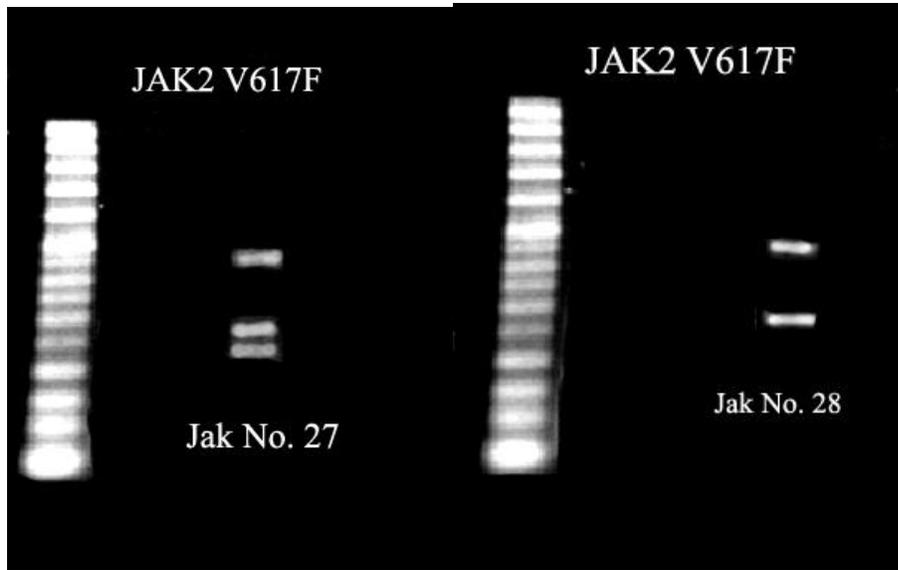


Figura No. 14: se observan las bandas de los pacientes No.27 y 28, la primera heterocigota y la segunda homocigota.

Fuente: FODECYT 07-2013

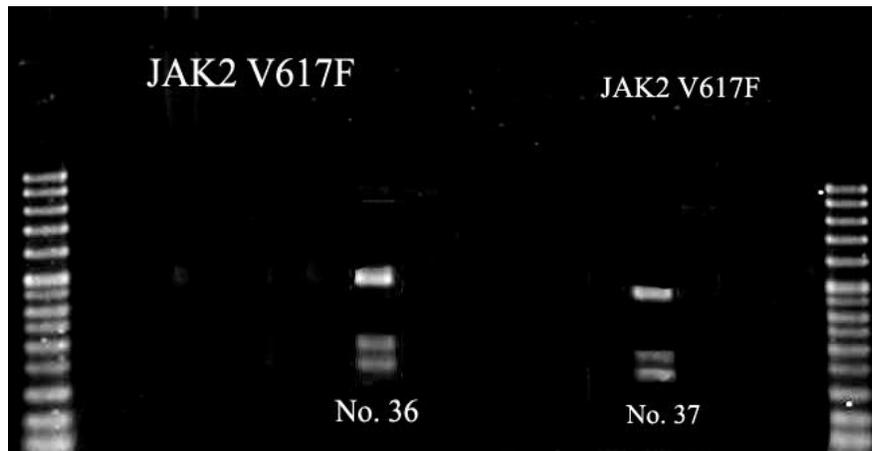


Figura No. 15: se observan las bandas de los pacientes No.36 y 37, ambas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

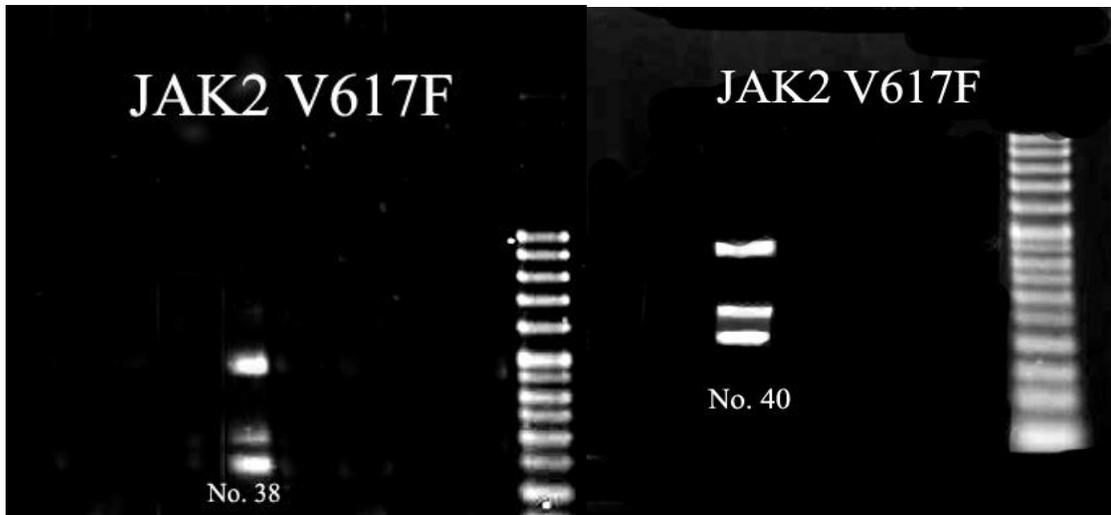


Figura No. 16: se observan las bandas de los pacientes No.38 y 40, ambas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

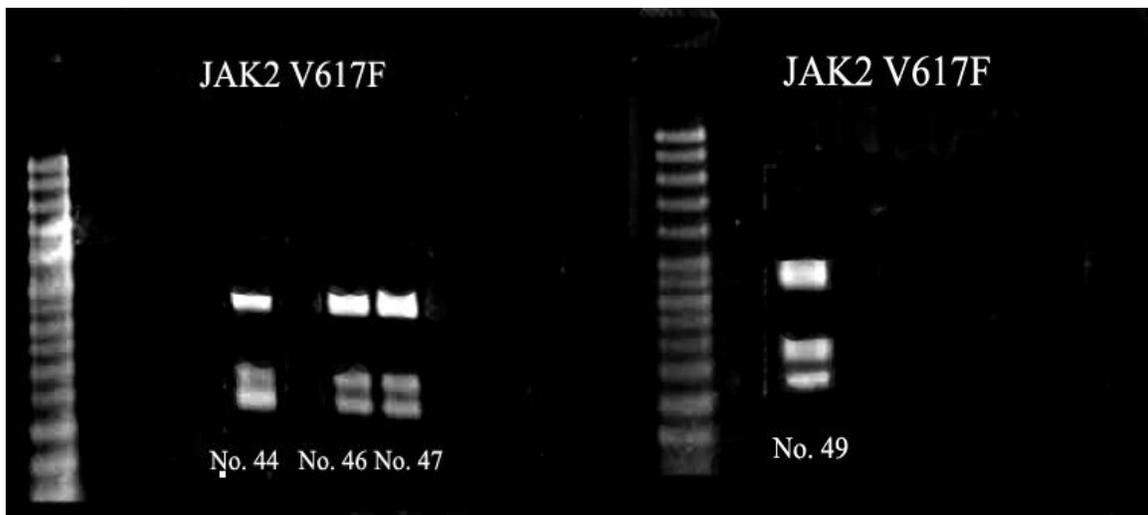


Figura No. 17: se observan las bandas de los pacientes No.44, 46, 47 y 49, todas positivas heterocigotas.

Fuente: FODECYT 07-2013

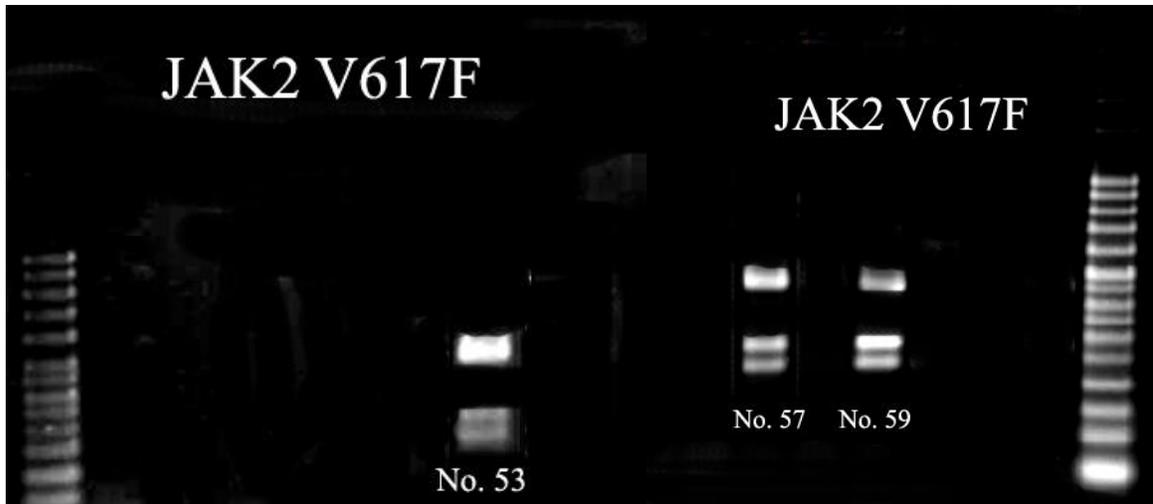


Figura No. 18: se observan las bandas de los pacientes No.53, 57 y 59, todas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

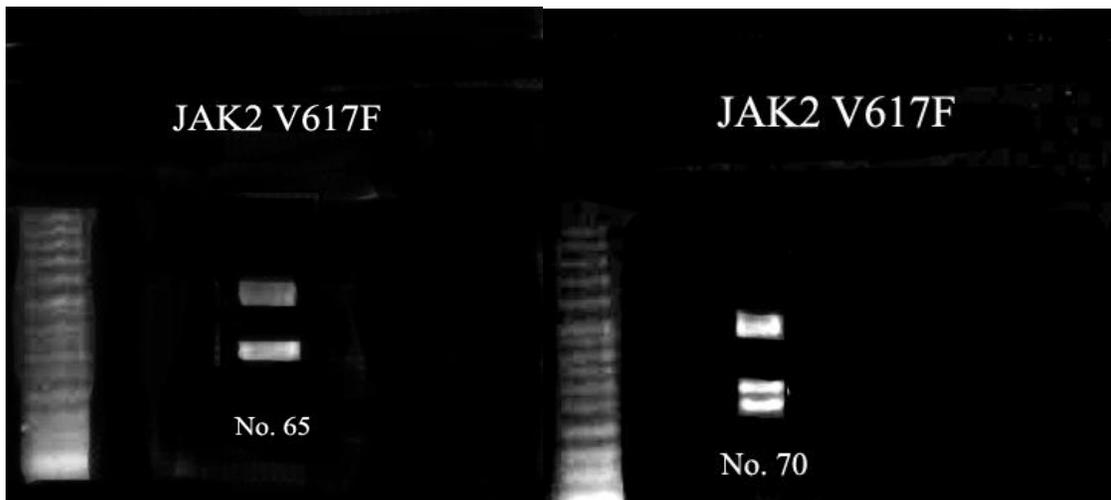


Figura No. 19: se observan las bandas de los pacientes No. 65 y 70, ambas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

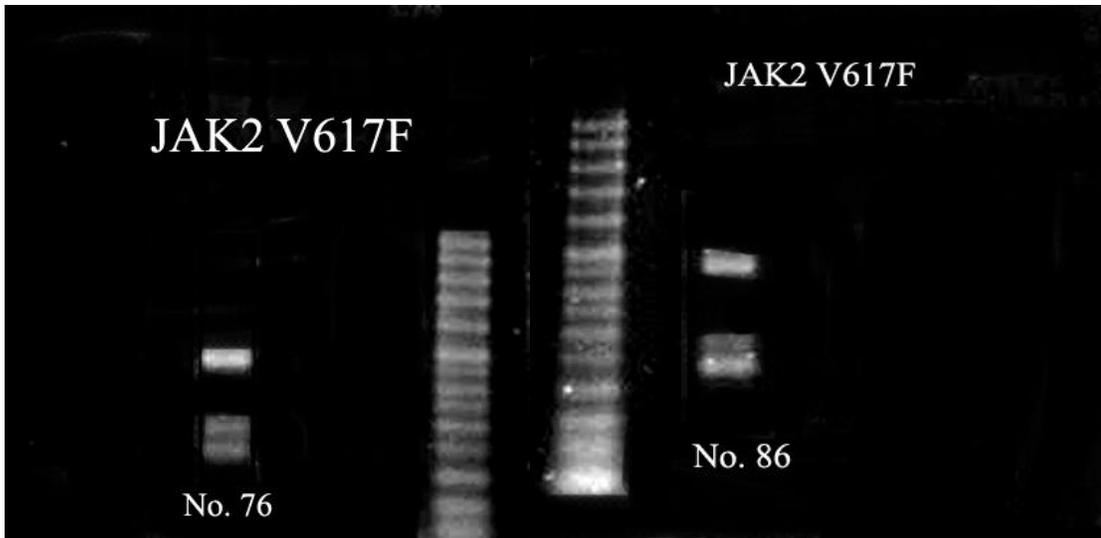


Figura No. 20: se observan las bandas de los pacientes No. 76 y 86, ambas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

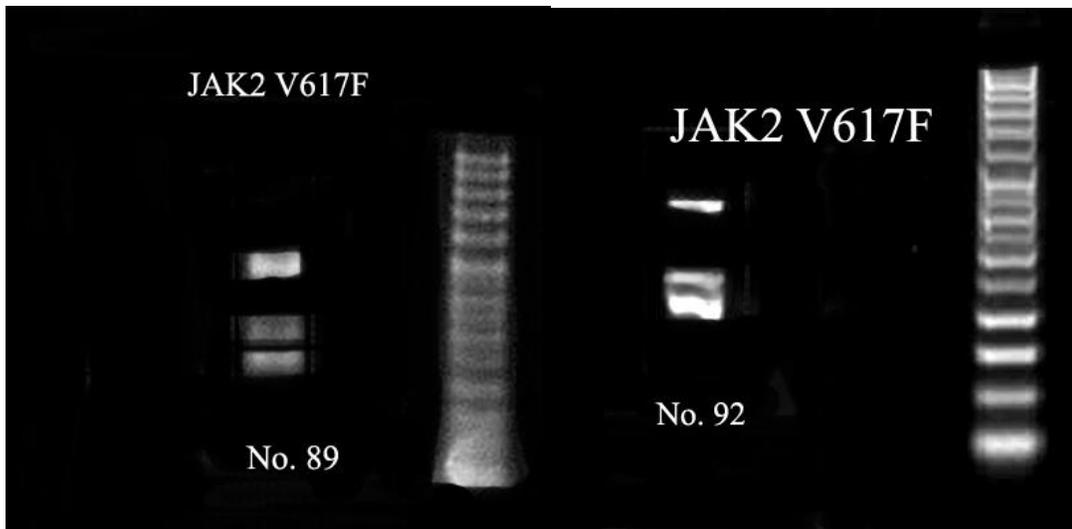


Figura No. 21: se observan las bandas de los pacientes No. 89 y 92, ambas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

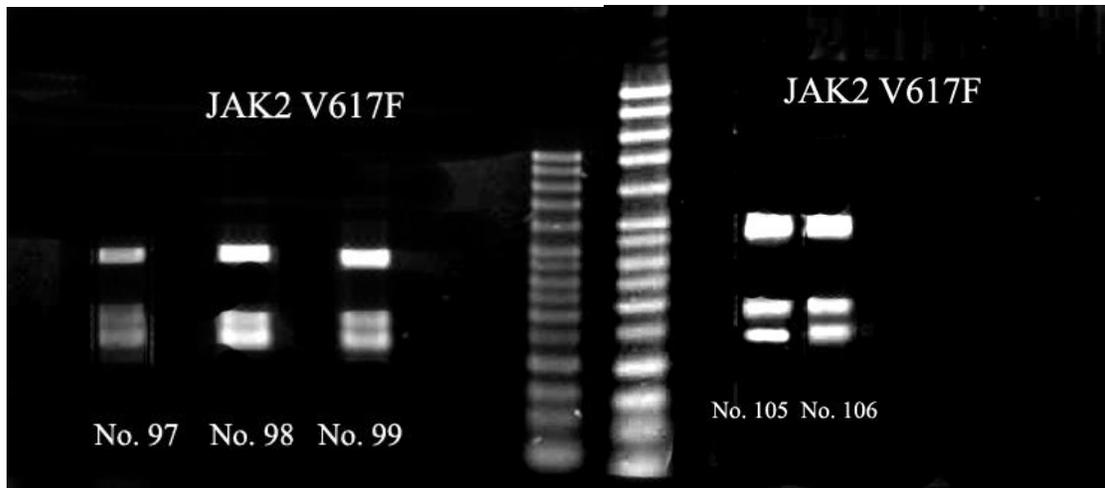


Figura No. 22: se observan las bandas de los pacientes No. 97, 98, 99, 105 y 106, todas positivas heterocigotas.

Fuente: FODECYT 07-2013

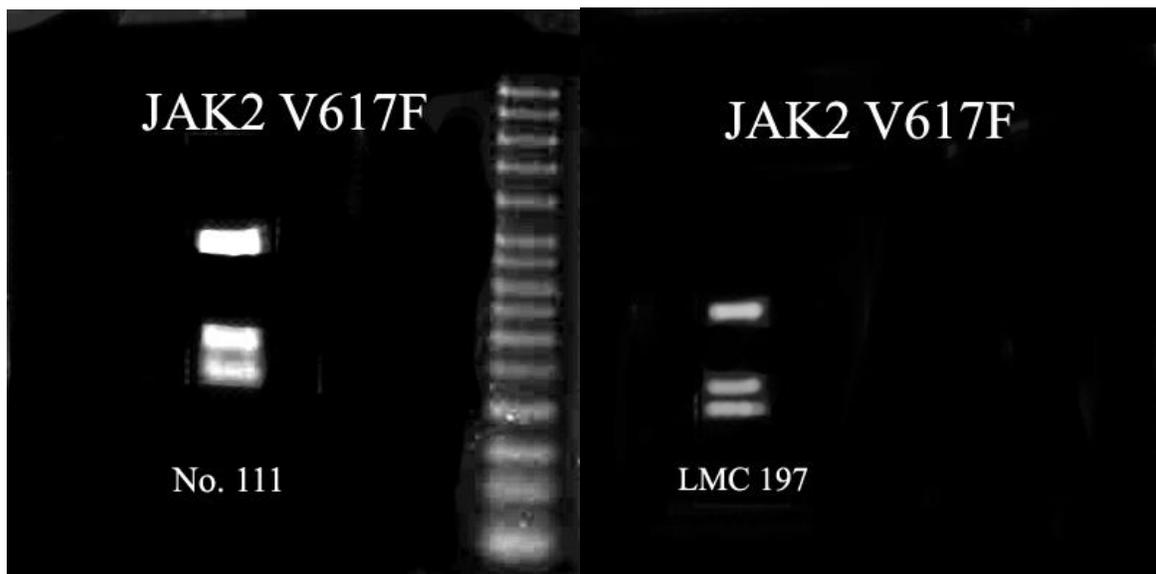


Figura No. 23: se observan las bandas de los pacientes No. 111 y 197, ambas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

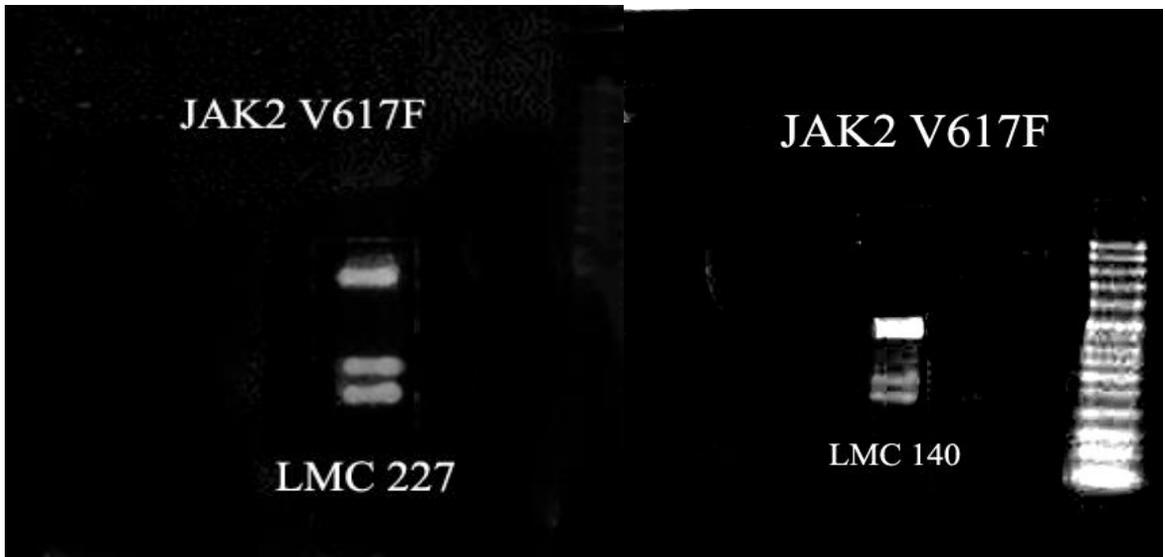


Figura No. 24: se observan las bandas de los pacientes No. 227 y LMC140, ambas positivas heterocigotas

Fuente: FODECYT 07-2013

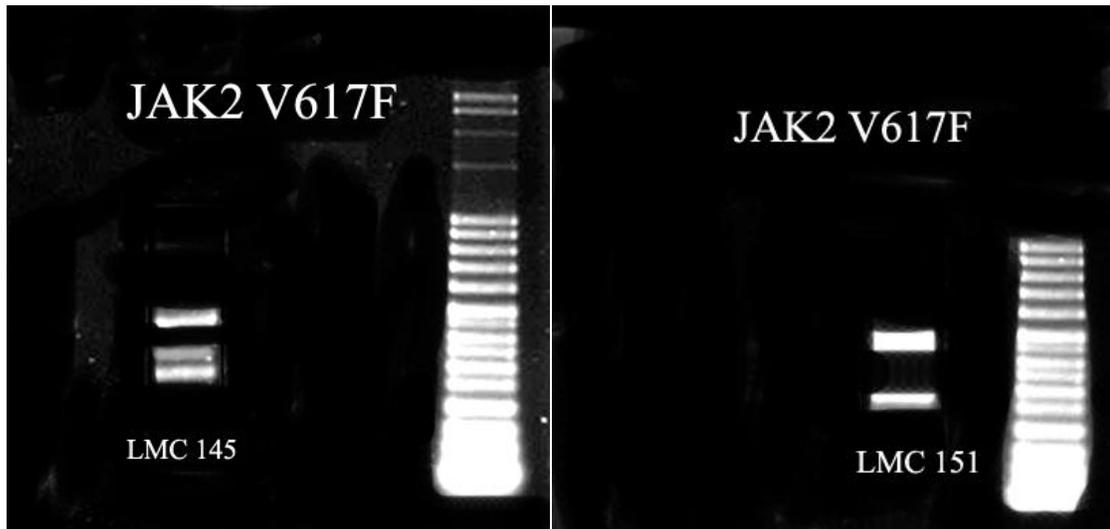


Figura No. 25: se observan las bandas de los pacientes LMC145 y LMC151, la primera heterocigota y la segunda homocigota.

Fuente: FODECYT 07-2013

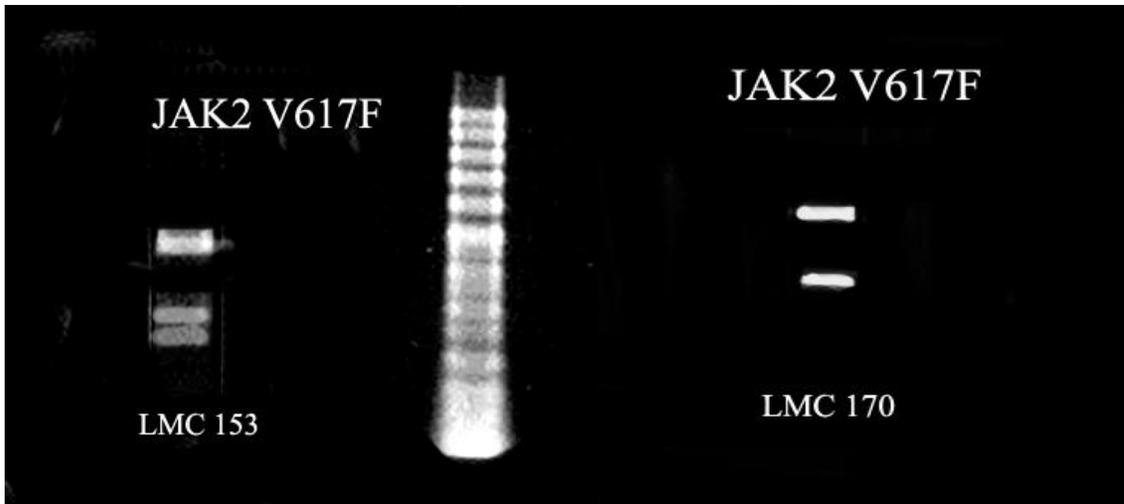


Figura No. 26: se observan las bandas de los pacientes LMC153 y LMC170, la primera heterocigota y la segunda homocigota.

Fuente: FODECYT 07-2013

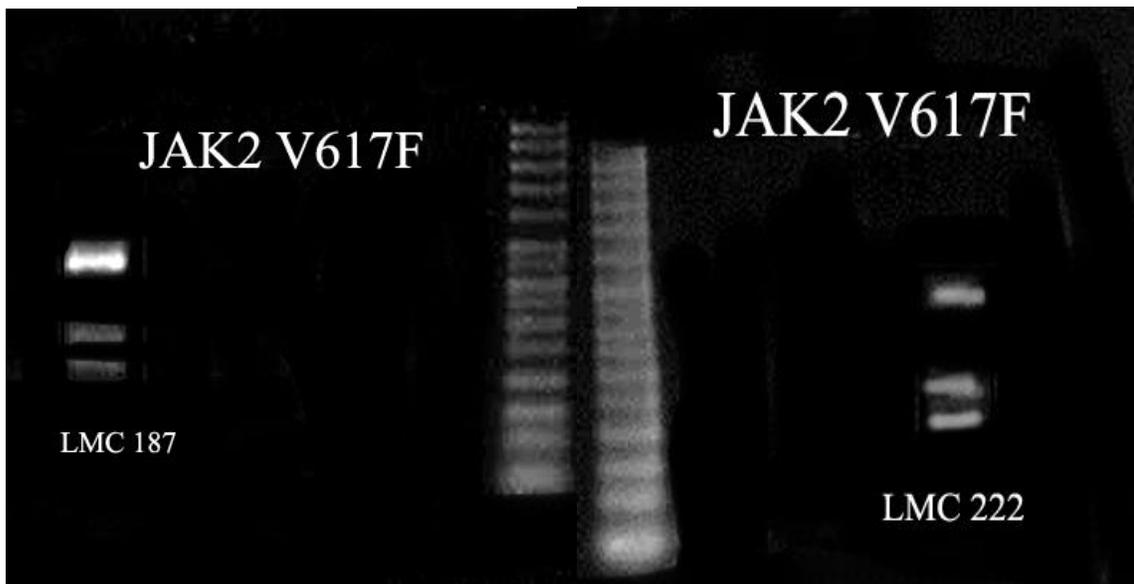


Figura No. 27: se observan las bandas de los pacientes LMC187 y LMC222, ambas heterocigotas.

Fuente: FODECYT 07-2013

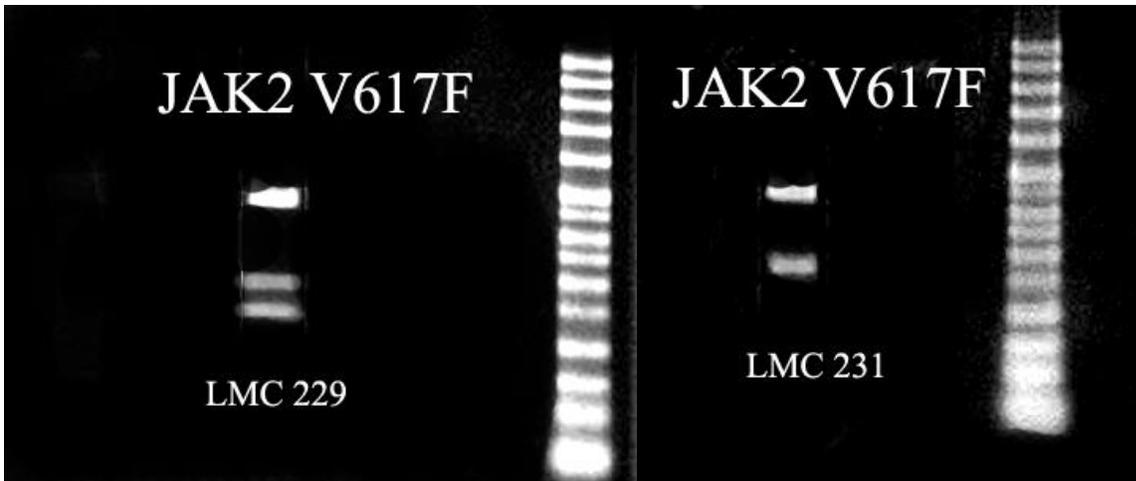


Figura No. 28: se observan las bandas de los pacientes LMC229 y LMC231, la primera heterocigota y la segunda homocigota.

Fuente: FODECYT 07-2013

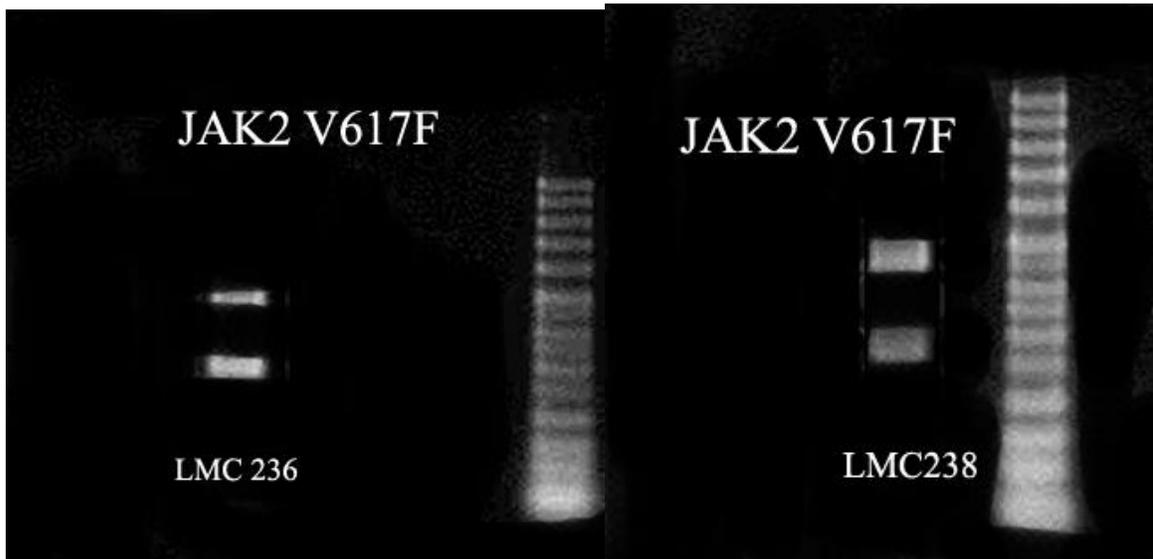


Figura No. 29: se observan las bandas de los pacientes LMC236 y LMC238, la primera heterocigota y la segunda homocigota.

Fuente: FODECYT 07-2013

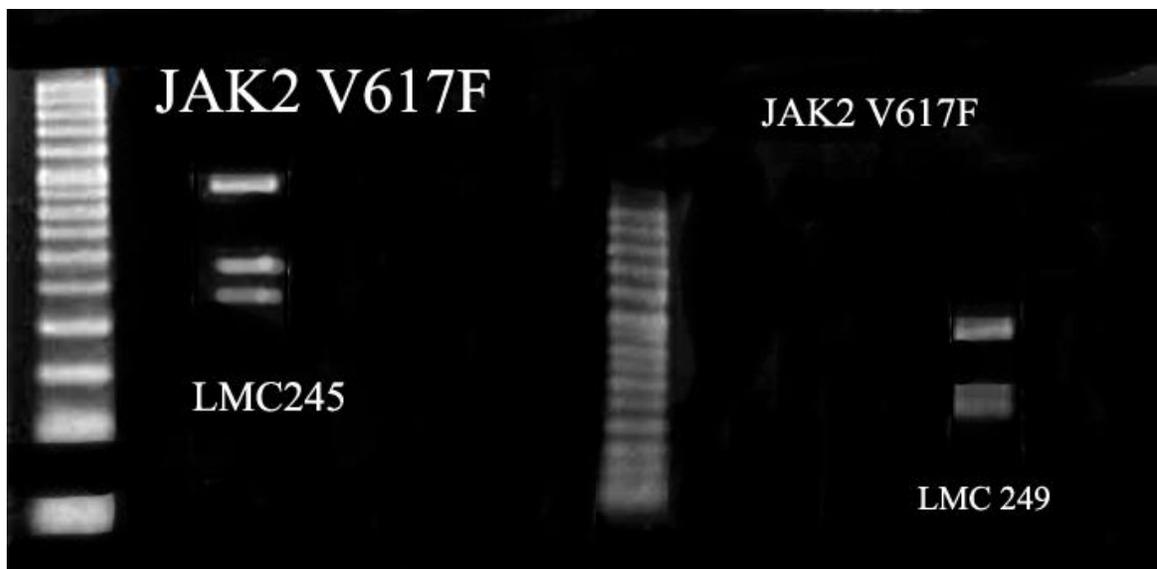


Figura No. 30: se observan las bandas de los pacientes LMC245 y LMC249, ambas heterocigotas.

Fuente: FODECYT 07-2013

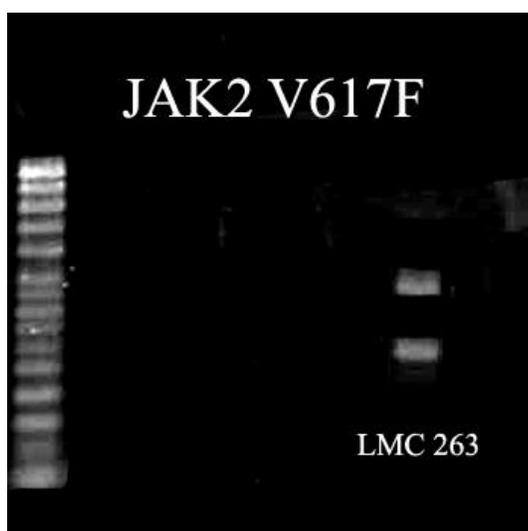


Figura No. 31: se observan las bandas del paciente LMC263, homocigoto para la mutación.

Fuente: FODECYT 07-2013

En cuanto al sexo el más frecuente fue el sexo femenino. En cuanto a la edad, la media para los pacientes con la mutación V617F fue de 65.78 y 47.95 para los pacientes negativos para la mutación, si bien esto sugiere que es una enfermedad más frecuente en el adulto mayor, en el presente estudio también se incluyeron algunos casos infantiles que tienen una frecuencia reducida internacionalmente.

**TABLA NO. 11. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES**

PARÁMETRO/ CARACTERÍSTICA	SMPc		TOTAL (%) (N=154)
	Frecuencia (%) V617F + (n=59)	Frecuencia (%) V617F - (n=95)	
<b>Sexo</b>			
Hombre	22	46	68 (44.15%)
Mujer	37	49	86 (55.84%)
<b>Edad (años)</b>			
Media	65.78	47.95	55.02
Desviación estándar	12.23	20.02	19.41
%CV	18.59	41.75	35.27
<b>Recuento Glóbulos Rojos (x 10<sup>6</sup>/μL)</b>			
Media	5.78	5.24	5.43
Desviación estándar	4.85	1.76	3.18
% CV	83.9	33.58	58.56
<b>Recuento Glóbulos Blancos (x 10<sup>3</sup>/μL)</b>			
Media	17.25	15.45	16.09
Desviación estándar	13.74	24.83	21.50
% CV	79.65	160.7	133.62
<b>Recuento Plaquetas (x10<sup>3</sup>/μL)</b>			
Media	680.44	596.67	625.83
Desviación estándar	518.96	504.97	509.52
% CV	76.26	84.63	81.41
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>			
Media	14.11	14.25	14.20
Desviación estándar	3.74	4.63	4.32
% CV	26.5	32.49	30.42
<b>Hematocrito (%)</b>			
Media	43.41	43.55	43.50
Desviación estándar	10.64	15.23	13.68
% CV	24.51	34.97	31.44

Fuente: Proyecto FODECYT 07-2013

La media del recuento de glóbulos blancos para el grupo en general fue de 16,090/μL con un mínimo de 1540 y un máximo de 195,000/μL; es decir que la mayoría de los pacientes presentó un

recuento de glóbulos blancos dentro de los rangos normales. La media del recuento de plaquetas es de: 625,830 con un valor mínimo de 33,000 y un máximo de 2,100,000; en este caso la mediana está por arriba de los valores normales, lo cual es consistente con los síndromes mieloproliferativos crónicos. La media de la hemoglobina fue de 14.20 g/dL. Con un mínimo de 3.3 y un máximo de 25.5 g/dL. Y por último la media del hematocrito fue de 43.5 %, con un mínimo de 33% y un máximo de 85%; la media de la hemoglobina y del hematocrito está dentro de los valores normales. En la Tabla No. 11 se muestran los valores distribuidos según la presencia o la ausencia de la mutación V617F del gen JAK2 en los pacientes incluidos.

## I.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se analizaron un total de 154 pacientes con diagnóstico presuntivo de síndromes mieloproliferativos crónicos. De los cuales 59 casos fueron positivos para la mutación V617F del gen JAK2, lo que equivale a un 38% de frecuencia de la mutación en síndromes mieloproliferativos crónicos. De los cuales 15 fueron homocigotos y 44 heterocigotos para la mutación (ver figura 9 a 31).

La frecuencia de la mutación reportada en otros países, indica que esta puede variar dependiendo el tipo de síndrome mieloproliferativo que se presente. La mutación se encuentra presente en >95% en pacientes con PV, 35-50% en MI y 32 – 57% en TE (1,12). Aunque esta frecuencia puede ser variable de acuerdo a la etnia. A continuación se muestra una tabla (Ver tabla No. 11) con estudios donde describe la frecuencia de la mutación V617F del gen JAK2 en pacientes con SMPc.

**TABLA NO. 12 FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN *JAK2*<sup>V617F</sup> EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS REPORTADA**

<b>Estudio</b>	<b>Policitemia Vera (%)</b>	<b>Trombocitosis Esencial (%)</b>	<b>Mielofibrosis Idiopática (%)</b>
James <i>et al</i>	40/45 (89)	9/21 (43)	3/7 (43)
Levine <i>et al</i>	121/164 (74)	37/115 (32)	16/46 (35)
Baxter <i>et al</i>	71/73(97)	29/51 (57)	8/16 (50)
Kralovic <i>et al</i>	83/128 (65)	21/93 (23)	13/23 (57)
Zhao <i>et al</i>	20/24 (83)	—	—
Jones <i>et al</i>	58/72(81)	24/59 (41)	15/35 (43)
Total	393/506(78)	120/339 (35)	55/127 (43)

Fuente: (Schafer A., 2006)

En la tabla No. 11, se puede observar que la frecuencia reportada en policitemia; puede variar de un 97% a un 65%, en la mayoría de países; sin embargo lo encontrado en Guatemala es una frecuencia de 40%; bastante más bajo de reportado en la mayoría de países, esto puede deberse a una influencia étnica. En el caso de trombosis esencial, se puede observar que la frecuencia puede

ir desde 57% a un 23%; y lo encontrado en Guatemala, es de un 38% de frecuencia, valor que está dentro del rango reportado en otros países para esta mutación.

En el caso de mielofibrosis, la frecuencia reportada en otros países es de 35 al 57%; en nuestra población, se encontró una frecuencia de 75%; se puede observar claramente mayor frecuencia de la mutación V617F del gen JAK2 en nuestra población.

El sexo femenino fue el más frecuente en síndromes mieloproliferativos, encontrándose un 56% de frecuencia. En cuanto a la mediana de la edad, esta fue de 60 años; es decir que la mayoría de pacientes incluidos en el presente estudio tenían una edad cercana a los 60 años; dato que coincide con lo reportado en otros países, en la cual la presencia de síndromes mieloproliferativos crónicos, está en mayor cantidad en el adulto mayor. En cuanto al recuento de plaquetas, la mediana fue de 515,000/mm<sup>3</sup>, el cual es un valor por encima de los valores referencia; este es un signo clásico de los SPMcs.

Los recuentos de glóbulos blancos, la hemoglobina y el hematocrito, poseen una mediana dentro de los valores normales, aunque al analizar los valores máximos y mínimos, se puede observar claramente que si existen pacientes cuyos valores están alterados. Por ejemplo la hemoglobina y el hematocrito aumentado son clásicos de policitemia vera.

## PARTE IV

### IV.I CONCLUSIONES

1. La mutación V617F del gen JAK2 se encontró en el 38% de los pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos incluidos en este estudio. El 62.71 % de los casos positivos fueron del sexo femenino y la media de la edad fue 55.02 años.
2. El porcentaje de la mutación V617F del gen JAK2 obtenida en pacientes con trombocitosis esencial (38 %) concuerda con los datos reportados a nivel internacional. Por el contrario los valores obtenidos en los casos de policitemia vera (40 %) y mielofibrosis ideopática (75 %) difieren (siendo mayor para mielofibrosis y menor para policitemia vera); por lo que debe evaluarse la presencia de este marcador en una muestra de mayor representación para relacionar una posible influencia étnica.
3. La presencia de la mutación V617F del gen JAK2, se utilizó como parámetro para confirmar diagnóstico de síndrome mieloproliferativo crónico, según criterio de la organización mundial de la salud; confirmando un total de 59 (38.3 %) casos del total de los analizados.
4. La detección molecular de la mutación V617F en el gen JAK2 fue informada de forma breve al médico tratante, para poder orientar al médico al uso de la terapia adecuada, hidroxiurea, en los casos positivos. Así como el uso de otras terapias alternativas en los casos negativos.
5. La divulgación de los resultados del presente estudio se realizó por medio de presentaciones orales y escritas a los médicos tratantes de las áreas de hematología de hospitales nacionales; así como a estudiantes universitarios de carreras afines.

## IV.2 RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la detección de mutaciones en el oncogen MPL; para la búsqueda de la causa de síndromes mieloproliferativos en crónicos, en los pacientes que fueron negativos para la mutación V617F del gen JAK2.
2. En los casos de policitemia vera negativos para la mutación V617F del gen JAK2, se recomienda analizar la presencia de mutaciones en el exón 12 del mismo gen; como posible causa de la enfermedad.
3. Se debe implementar de manera rutinaria, el análisis de la mutación V617F del gen JAK2; para confirmar diagnóstico de síndrome mieloproliferativo crónica, y cumplir así con las recomendaciones de la organización mundial de la salud.
4. Todos los datos generados a partir de este estudio representan la primera caracterización molecular de los pacientes con Síndromes Mieloproliferativos Crónicos de Guatemala, pero es necesario proseguir con esta caracterización con una cohorte de mayor tamaño y representatividad.

### IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quintás-Cardama A. *et al.*(2011). Janus Kinase Inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nature Reviews*, 10, 127-140.
2. Kralovics R. *et al.* (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *The New England Journal of Medicine*, 17 (352), 1779-1790.
3. Jones A., *et al.* (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutatin in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106 (6), 2162-2168.
4. Chen Q., *et al.* (2007). Consultation in Molecular Diagnostics: Amplification Refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *JMD*, 9 (2), 272-276.
5. Vardiman J W., *et al.* (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) clasification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and importan changes. *Blood*, 114 (5), 937-951.
6. Finazzi G y Barbui T. (2007). The treatmen of polycythaemia vera: update in the JAK2 era. *Intern Emerg Med*, 2 (s/n), 13-18.
7. Landolfi R., *et al.* (2010). Polycythemia vera. 5 (s/n), 375-384.
8. Spivak J. (2010). Narrative review: thrombocytosis, polycythemia vera and JAK2 mutations: The phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation . *Annals of Internal Medicine*, 152 (5), 300-307.
9. Cervantes F. (2011). Management of Essential thrombocythemia. *Hematology*, s/v (s/n), 215-221.
10. Gangat N, *et al.* (2011). DIPSS PLUS: A refined dynamic international pronostic scoring system for primary Mielofibrosis that incorporates pronostic information form karyotype, platelet count and trasfusion status. *J Clin Onc*, 29 (4), 392-397.
11. Vainchenker W. (2012). JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*, s/v (s/n), 1-13.
12. Schafer A. (2006). Molecular basis of the diagnosis and treatent of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*, 107 (11), 4214-4222.
13. Tefferi A, Skoda R y Vardiaman J. (2009). Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis usin histology and genetics. *Nat Rev Clin Onco*, 6 (s/n), 627-637.

14. Steensma, D. (2006). JAK2 V617F in myeloid disorders: Molecular Diagnostic technique and their clinical utility. *Journal of Molecular Diagnostics*, 8 (4), 397-411.
15. Vannucchi A. (2010). Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Intern Emerg Med*, 5 (s/n), 177-184.
16. Vannucchi AM, *et al.* (2007). Clinical profile of homozygous Jak 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*, 110 (s/n), 840-846.
17. Lussana F, *et al.* (2009). Association of V617 Ja2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thrombosis Research*, 124 (s/n), 409-417.
18. Barosi G, *et al.* (2007). JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis . *Blood* , 110 (s/n), 4030-4036 .
19. Cervantes F, *et al.* (2009). New pronostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the international working group for myelofibrosis research y treatment. *Blood*, 113 (13), 2895-2900.
20. Pardanani A, *et al.* (2009). 32. A phase I study of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis: clinical response is accompanied by significant reduction in JAK2V617F allele burden. . *Blood*, 114 (s/n), 755.
21. Santos F, *et al.* (2010). Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood*, 115 (s/n), 1131-1136.
22. Hexner E, *et al.* (2009). A multicenter, open label Phase I/II study of CEP701 (Lestaurtinib) in adults with myelofibrosis; a report on phase I: a study of the myeloproliferative disorders research consortium. . *Blood*, 114 (s/n), 754.
23. Paquette R, *et al.* (2008). A phase I study of XL019, a selective JAK2 inhibitor, in patients with polycythemia vera. . *Blood*, 112 (s/n), 2810.
24. Shah N, *et al.* (2008). A phase I study of XL019, a selective JAK2 inhibitor, in patients with primary myelofibrosis, post-polycythemia vera, or post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood*, 112, 98.

25. Verstovsek S, *et al.* (2009). Phase I dose-escalation trial of SB1518, a novel JAK2/FLT3 inhibitor, in acute and chronic myeloid diseases, including primary or post-essential thrombocythemia/polycythemia vera myelofibrosis. *Blood*, *114* (s/n), 3905.
26. Pardanani A, *et al.* (2009). CYT387, a selective JAK1/JAK2 inhibitor: in vitro assessment of kinase selectivity and preclinical studies using cell lines and primary cells from polycythemia vera patients. *Leukemia*, *23* (s/n), 1441–1445.
27. Tyner, J. W. *et al.* (2010). CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. *Blood*, *115*, 5232–5240.
28. Hedvat M. *et al.* (2009). The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. *Cancer Cell*, *16* (s/n), 487–497.
29. Liu, P. C. *et al.* (2009). Combined inhibition of Janus kinase 1/2 for the treatment of JAK2V617F-driven neoplasms: selective effects on mutant cells and improvements in measures of disease severity. *Clin. Cancer Res.*, *15*, 6891–6900.
30. Baffert, F. *et al.* (2010). Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805. *Mol. Cancer Ther.*, *9* (s/n), 1945–1955.
31. Life Technologies™. Invitrogen. (2012). PureLink® Genomic DNA Kits. Document Part Number 25-2012. Publication Number MAN0000601. Revision 2.0. Disponible en: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf).

## IV.4 ANEXOS

### Anexo 1: Consentimiento informado para pruebas Genéticas Adultos

#### 1. Título del proyecto

**“Determinación de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup> por PCR-Alelo Específica (ARMS-PCR) en pacientes con síndromes mieloproliferativos crónico”**

#### 2. Investigador Principal

Lda. Dámaris Tinti

#### 3. Institución

INVEGEM

---

El presente documento es un consentimiento informado que le brindará a usted y su familia información importante sobre el presente estudio. Puede que el documento contenga palabras que usted no entienda. Por favor pregunte al investigador encargado o a cualquier personal del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente. Usted puede llevarse a su casa una copia de este consentimiento informado para pensar sobre este estudio o para discutir con su familia o amigos antes de tomar la decisión de participar en él.

### INTRODUCCION

Usted ha sido invitado a participar en esta investigación. Antes de que usted decida participar en el estudio por favor lea este documento cuidadosamente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

### PROPOSITO DEL ESTUDIO

El propósito del presente estudio es detectar la presencia de la mutación V617F en el gen *Jak2* que se encuentra presente en Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial y Mielofibrosis Idiopática, cuatro enfermedades que se encuentran incluidas dentro del término Síndromes Mieloproliferativos Crónicos. El resultado de esta prueba le servirá a su médico para conocer el pronóstico de su enfermedad; y por lo tanto elegir con mayor exactitud el tratamiento más adecuado para usted.

Por otra parte, este estudio brindará información para futuros proyectos de investigación relacionados con la enfermedad que usted padece; que permitan conocer mejor los mecanismos de producción de los síndromes mieloproliferativos crónicos y así facilitar la cura del mismo.

## **PARTICIPANTES**

Las personas que podrán participar en este estudio deben de tener un diagnóstico confirmado o tener alta sospecha de:

- Policitemia Vera
- Mielofibrosis Idiopática
- Trombocitosis Esencial

Los criterios de inclusión:

- Presentar diagnóstico o alta sospecha clínica de Policitemia Vera, Trombocitosis Esencial o Mielofibrosis idiopática.
- Paciente de 0 – 99 años
- Sin tratamiento o sin tratamiento reciente y prolongado con citoreductores como Hidroxiurea, anagrelide o interferón  $\alpha$ .

*Criterios de exclusión:*

- Presencia de Policitemias secundarias diagnosticadas o con alta sospecha clínica.
- Presencia de Trombocitosis secundarias diagnosticadas o con alta sospecha clínica.
- Presencia de Mielofibrosis secundarias diagnosticadas o con alta sospecha clínica.

Con el fin de identificar la existencia de la mutación, el presente estudio requiere su participación, ya que reúne los criterios de inclusión para colaborar con el estudio. **Su participación es completamente voluntaria y puede abandonar el estudio en cualquier momento sin ser penalizado.**

## **PROCEDIMIENTOS**

El cumplimiento de uno o más de los criterios de inclusión indican que su médico sospecha que usted tiene una de las enfermedades incluidas dentro de los síndromes mieloproliferativos crónicos, y por lo tanto se procede a la extracción médula ósea. La extracción de médula ósea será realizada por un médico y se llevará a cabo por punción al interior del hueso; la muestra extraída será enviada en un tubo con tapa morada al laboratorio de biología molecular de INVEGEM, para su respectivo análisis.

## **RIESGOS**

Los riesgos de la extracción de médula ósea también son mínimos cuando lo realiza un médico especialista, pueden encontrarse en algunas ocasiones sangrado o infecciones, hematomas y dolor.

## **BENEFICIOS**

La determinación de la presencia de la mutación, brinda información sobre el pronóstico de su enfermedad. En el caso de estar presente la mutación, su médico sabrá la causa de su enfermedad y

las medidas terapéuticas necesarias a ser tomadas. En el caso de ser negativo el resultado, también esto guiará al médico a seleccionar los tratamientos más adecuados.

Asimismo, su información ayudará en otros proyectos de investigación que ayuden a la cura y tratamiento de los síndromes mieloproliferativos crónicos.

Además sus resultados contribuirán un mejor conocimiento del comportamiento de los síndromes mieloproliferativos crónicos en Guatemala.

Sin importar el resultado del análisis, se le entregará una copia de los resultados como evidencia del análisis efectuado en el estudio.

### **COSTOS**

La presente prueba tiene un costo elevado, sin embargo por ser parte de este estudio se le realizará de forma gratuita.

### **PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD**

Si usted elige participar en este estudio, el investigador del estudio conseguirá información personal sobre usted. Esto puede que incluya la información que puede identificarle. También puede conseguir información sobre su salud incluyendo, expedientes médicos actuales y del pasado que pueden incluir resultados de laboratorios, placas o exámenes físicos

Los resultados de esta investigación pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en las reuniones médicas, pero **su identidad no será divulgada. La información de su salud será mantenida tan confidencial como sea posible bajo la ley.** Esta autorización servirá hasta el final del estudio, a menos que usted la cancele antes. Usted puede cancelar esta autorización en cualquier momento enviando un aviso escrito al Investigador Principal: Lda. Dámaris Tinti, Laboratorio de Biología Molecular, INVEGEM, Tel. 66243838 o Correo electrónico: **info@invegem.org**

Si usted cancela esta autorización, el Investigador Principal no usará ni divulgará su información personal ni de su salud. La autorización para el uso y el acceso de la información protegida de la salud para los propósitos de la investigación es totalmente voluntaria.

### **PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIOS**

Su participación en este estudio es **voluntaria**. Usted puede decidir participar o retirarse del estudio en cualquier momento, su decisión no resultará en ninguna penalidad.

### **UTILIZACIÓN DE MUESTRAS Y RESULTADOS**

La muestra de médula ósea obtenida de usted será utilizada para el presente estudio; y no saldrá del país, el análisis se realizará en INVEGEM. Se podrá almacenar su muestra para futuros estudios dentro de las instalaciones de INVEGEM por un período aproximado de 10 años, y se podrá

utilizar para otros estudios que ayuden al tratamiento de los síndromes mieloproliferativos crónicos, siempre con la respectiva aprobación del comité nacional de ética en salud.

## **PREGUNTAS**

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio o sobre su participación usted puede contactar a:

Investigador Principal: Lda. Dámaris Eugenia Tinti Ordóñez, Laboratorio de Biología Molecular, INVEGEM Tel. 66243838 o Correo electrónico: **info@invegem.org**

## **OTROS ASPECTOS DE INTERÉS:**

- Si existiera información de relevancia en el presente estudio, se le dará conocimiento del mismo.
- No se dará ningún tipo de compensación para la participación, su participación es totalmente voluntaria.
- Siempre se respetará la opinión de cada participante
- No existe ningún conflicto de interés con respecto al patrocinio del proyecto ni en el equipo investigador.

No firme este consentimiento a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y recibir contestaciones satisfactorias.

Si usted firma, aceptando su participación en este estudio, recibirá una copia del consentimiento con su firma, el sello de aprobación de INVEGEM y la fecha.

## DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Señores

Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas

INVEGEM

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos) de \_\_\_\_ años edad y con cédula de vecindad o DPI \_\_\_\_\_ he sido informado/a sobre la participación en el proyecto “Determinación de la mutación *JAK2<sup>V617F</sup>* por PCR-Alelo Específica (ARMS-PCR) en pacientes con síndromes mieloproliferativos crónico y su importancia en el monitoreo y elección del tratamiento. Dentro de los síndromes mieloproliferativos crónicos se encuentran Policitemia Vera, Trombosis Esencial y Mielofibrosis Idiopática. En el presente estudio se tomará una muestra de médula ósea para la realización de las pruebas necesarias. El resultado de la prueba le brindará información a mi médico sobre el pronóstico y tratamiento de mi enfermedad.

El procedimiento de extracción de médula ósea constituye un procedimiento seguro para mi salud y sin complicaciones importantes o que afecten mi integridad física.

Autorizo el uso de la muestra de médula ósea para la presente investigación y otras investigaciones que contribuyan a conocer más sobre el comportamiento y tratamiento de la enfermedad. Siempre y cuando el Comité Nacional de ética en salud lo autorice.

Por lo tanto, otorgo mi consentimiento para la extracción de médula ósea y uso del resultado de mi prueba para la presente investigación. Comprendo que mis datos pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en reuniones médicas, pero mi identidad no será divulgada.

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma del Paciente o huella digital: \_\_\_\_\_

Firma del médico/persona que realizó la extracción: \_\_\_\_\_

Sello de la  
institución

## PARTE V

### INFORME FINANCIERO

AD-R-0013

#### FICHA DE EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA

**LINEA: FODECYT**  
**"Determinación de la mutación JAK2 por PCR-Alelo específica (ARMS-PCR) en pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos"**

**Nombre del Proyecto:**

**Numero del Proyecto:** 07-2013

**Investigador Principal y/o Responsable del Proyecto:** BR. DÁMARIS EUGENIA TINTÍ ORDÓÑEZ

**Monto Autorizado:** Q74,600.00 **Orden de Inicio (y/o Fecha primer pago):** 01/09/2013

**Plazo en meses:** 12 meses

**Fecha de Inicio y Finalización:** 01/09/2013 al 31/08/2014

Grupo	Renglon	Nombre del Gasto	Asignacion Presupuestaria	TRANSFERENCIA		Ejecutado	Pendiente de Ejecutar
				Menos (-)	Mas (+)		
<b>1</b>		<b>SERVICIOS NO PERSONALES</b>					
	121	Divulgación e información	Q 1,500.00				Q 1,500.00
	122	Impresión, encuadernación y reproducción	Q 2,000.00				Q 2,000.00
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad	Q 24,000.00			Q 22,000.00	Q 2,000.00
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad (Evaluación externa de Impacto)**	Q 8,000.00				Q 8,000.00
<b>2</b>		<b>MATERIALES Y SUMINISTROS</b>					
	261	Elementos y compuestos químicos	Q 37,300.00			Q 36,752.40	Q 547.60
	267	Tintes, pinturas y colorantes	Q 800.00			Q 550.00	Q 250.00
	295	Útiles menores, médico-quirúrgicos y de laboratorio	Q 1,000.00			Q 1,000.00	Q -
<b>3</b>		<b>PROPIEDAD, PLANTA, EQUIPO E INTANGIBLES</b>					
		GASTOS DE ADMÓN.(10%)					
			<b>Q 74,600.00</b>			Q 60,302.40	Q 14,297.60

MONTO AUTORIZADO	Q 74,600.00	Disponibilidad	Q 14,297.60
(-) EJECUTADO	Q 60,302.40		
<b>SUBTOTAL</b>	Q 14,297.60		
(-) ANTICIPO PARA GASTOS MENORES	Q -		
<b>TOTAL POR EJECUTAR</b>	Q 14,297.60		

Se autorizó el renglón 181 para la Evaluación Externa de Impacto, sin embargo, este gasto corresponde al renglón 189, hay necesidad de realizar una apertura de renglón y transferencia de fondos.