



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**Desarrollo y validación de un panel de pruebas moleculares para el diagnóstico
por laboratorio de neoplasias mieloproliferativas clásicas**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

**PRESENTA:
Q.F.B. VÍCTOR ALFREDO PÉREZ CONTRERAS**

**ASESOR:
DC. CARLOS CORTÉS PENAGOS
CO ASESOR:
CITOGENETISTA CARLOS ALONSO MUÑOZ**

Morelia. Michoacán, Abril de 2012

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	viii
I. RESUMEN	1
II. ABSTRAC.	2
III. INTRODUCCIÓN	3
1. Clasificación de las neoplasias mieloides (leucemias mieloides).	4
1.1 Criterios de la Organización Mundial de la Salud para la clasificación de neoplasia mieloide	5
1.2 Neoplasias mieloproliferativas (NMP)	7
1.3 Criterios diagnósticos de Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)	8
2. Leucemia mieloide crónica	9
2.1 Marcador molecular <i>BCR-ABL1</i>	11
3. Policitemia vera	13
4. Mielofibrosis primaria	15
5. Trombocitemia esencial	17
6. Marcador molecular <i>JAK2V617F</i>	18
7. Metodologías moleculares	20
8. Diseño de experimentos basado en la metodología Taguchi	24

IV.	ANTECEDENTES	29
V.	JUSTIFICACIÓN	30
VI.	HIPOTESIS	31
VII.	OBJETIVOS	31
	1. Objetivo general	31
	2. Objetivos específicos	31
VIII.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
IX.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
	1. Manipulación de ácidos nucleicos	33
	1.1. Extracción de ácidos nucleicos	33
	1.2. Cuantificación y análisis de ácidos nucleicos	34
	2. Transcripción reversa (RT)	34
	3. PCR acoplado a transcripción reversa para la detección de transcritos <i>BCR-ABL1</i>	34
	4. PCR-alelo específico para la detección de la mutación <i>JAK2V617F</i>	35
	5. Determinación de la variante alélica de la mutación <i>JAK2V617F</i>	36
	6. PCR acoplado a transcripción reversa para detectar transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2</i>	36
	7. Secuenciación	37
	8. Análisis de resultados por la Metodología Taguchi	37
X.	RESULTADOS	40
	1. Utilización de la metodología Taguchi en la optimización de técnicas de identificación de marcadores moleculares	40

1.1 PCR acoplado a transcripción reversa para la detección de transcritos <i>BCR-ABL1</i>	40
1.2 PCR-alelo específico para la detección de la mutación <i>JAK2V617F</i>	41
1.3 Determinación de la variante alélica de la mutación <i>JAK2V617F</i>	42
2. PCR acoplado a transcripción reversa para detectar transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2</i>	44
XI. DISCUSIÓN	49
XII. CONCLUSIONES	58
XIII. REFERENCIAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación y maduración de las células tronco hematopoyéticas	3
Figura 2. Clasificación de Neoplasias Mieloproliferativas de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud	8
Figura 3. Puntos de ruptura de los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> y estructura de los RNAm quiméricos	13
Figura 4. Estructura de la proteína <i>JAK2</i> y la ubicación de la mutación V617F	20
Figura 5. Programa aplicado a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
Figura 6. Comparación de un arreglo ortogonal L_8 contra una factorial 2^7	27
Figura 7. Secuencia obtenida del amplificados de los exones 11-16 del transcrito <i>JAK2</i>	41
Figura 8. Análisis electroforético de los productos de amplificación para el ensayo de detección de transcritos <i>BCR-ABL1</i>	41
Figura 9. Análisis electroforético de los productos de amplificación para el ensayo de detección de la mutación <i>JAK2V617F</i>	42
Figura 10. Análisis por electroforesis de los productos de digestión por RFLP para <i>JAK2</i>	43
Figura 11. Región de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los transcritos <i>JAK2</i>	44
Figura 12. Productos de amplificación esperados en la detección simultanea de transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2</i>	45
Figura 13. Productos de amplificación de los transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2V617F</i>	46
Figura 14. Productos de amplificación de los transcrito <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2V617F</i>	46
Figura 15. Productos de amplificación de los transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2V617F</i>	47
Figura 16. Analisis de la secuenciacion de los exones 11 al 16 del gen <i>JAK2</i>	48
Figura 17. Análisis electroforético comparativo de la detección de los transcritos <i>BCR-ABL1</i>	50

Figura 18. Análisis electroforético comparativo de la detección dela mutación <i>JAK2V617F</i> por la técnica PCR-alelo especifico	52
Figura 19. Análisis electroforético de los transcritos <i>JAK2</i> controles internos	55
Figura 20. Productos de amplificación de los transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2</i> ensayos óptimos	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de las Neoplasias mieloides	6
Tabla 2. Datos clínicos de Neoplasias mieloproliferativas clásicas	8
Tabla 3. Etiología y epidemiología de la leucemia mieloide crónica	10
Tabla 4. Criterios diagnósticos para policitemia vera	14
Tabla 5. Etiología y epidemiología de policitemia vera	14
Tabla 6. Criterios diagnósticos para mielofibrosis primaria	16
Tabla 7. Etiología y epidemiología de la mielofibrosis primaria	16
Tabla 8. Criterios diagnósticos para trombocitemia esencial	17
Tabla 9. Etiología y epidemiología de la trombocitemia esencial	18
Tabla 10. Variables que influyen en la técnica de PCR	24
Tabla 11. Oligonucleótidos para las variantes del transcrito <i>BCR-ABL1</i>	34
Tabla 12. Oligonucleótidos para el transcrito <i>B2M</i>	34
Tabla 13. Variables analizadas en la detección de los transcritos <i>BCR-ABL1</i>	35
Tabla 14. Oligonucleótidos para la mutación <i>JAK2V617F</i>	35
Tabla 15. Variables analizadas en la detección de la mutación <i>JAK2V617F</i>	36
Tabla 16. Variables analizadas para la variante alélica de <i>JAK2V617F</i>	36
Tabla 17. Oligonucleótidos para las variantes del transcrito <i>BCR-ABL1</i>	37
Tabla 18. Oligonucleótidos para <i>JAK2V617F</i> y wt <i>JAK2</i>	37
Tabla 19. Variables analizadas en la detección de transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2</i>	37
Tabla 20. Matriz del arreglo ortogonal <i>L</i> ₄	38

Tabla 21 Matriz del arreglo ortogonal L_{12}	38
Tabla 22. Formulas utilizadas en los cálculos para el análisis de los datos	39
Tabla 23. Cantidad de DNA amplificado de los transcritos <i>BCR-ABL1</i>	40
Tabla 24. Contribución de las variables para los transcritos <i>BCR-ABL1</i>	40
Tabla 25. Cuantificación de DNA amplificado para la detección de <i>JAK2V617F</i>	41
Tabla 26. Contribución de las variables para la detección de <i>JAK2V617F</i>	42
Tabla 27. Escala de valores para la comparación de ensayos de electroforesis	43
Tabla 28. DNA amplificado en la detección de transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>JAK2</i>	46
Tabla 29. Contribución de las variables de los transcritos <i>JAK2</i> y <i>BCR-ABL1</i>	47
Tabla 30. Contribución de las variables de los transcritos <i>JAK2</i> y <i>BCR-ABL1</i>	47
Tabla 31. Contribución de las variables de los transcritos <i>JAK2</i> y <i>BCR-ABL1</i>	48
Tabla 32. Análisis de las variables de los transcritos controles de <i>JAK2</i>	54

Lista de abreviaturas

LCM	leucemia mieloide crónica
NPM	neoplasia mielo proliferativa
PV	policitemia vera
TE	Trombocitemia esencial
MFP	mielofibrosis primaria
OMS	organización mundial de la salud
MO	medula ósea
SP	sangre periférica
PTK	proteína cinasa de tirosina
RT	transcripción reversa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
FISH	fluorohibridación <i>in situ</i>
Kb	kilo bases
kDa	kilo daltones
pb	pares de base
<i>bcr</i>	breakpoint cluster región
ATP	trifosfato de adenosina
Epo	eritropoyetina
AO	arreglo ortogonal

I. RESUMEN

El análisis de los transcritos del gen de fusión *BCR-ABL1* por RT-PCR es usualmente empleado para establecer el diagnóstico y la respuesta al tratamiento en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC). Otras neoplasias mieloproliferativas (NMP) incluyendo policitemia vera (PV), Trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP) han sido recientemente caracterizadas a nivel molecular por la presencia de una mutación puntual en el gen *JAK2* (*JAK2V617F*), el cual es adoptado como un excelente marcador molecular para el diagnóstico por la organización mundial de la salud (OMS) y forma parte de los criterios mayores de diagnóstico para estas neoplasias mieloides. El descubrimiento de *JAK2V617F* redefinió el diagnóstico y clasificación de las neoplasias mieloproliferativas crónicas. El uso de la metodología Taguchi es una atractiva alternativa en la estandarización de un RT-PCR Multiplex para la detección de los marcadores *BCR-ABL1* y *JAK2V617F* en un ensayo único útil en el diagnóstico molecular de rutina.

El desarrollo y la estandarización de la prueba RT-PCR Multiplex para detectar la mutación *JAK2V617F* y las variantes del gen de fusión *BCR-ABL1* se realizó utilizando un arreglo ortogonal considerando las variables y los niveles de las mismas que influyen principalmente en un PCR (concentraciones de oligonucleótidos y Mg^{+2} , Taq polimerasa, temperatura y tiempos de alineamiento, y ciclos de amplificación). Usando el arreglo ortogonal a través de 36 ensayos independientes se logró obtener exitosamente las condiciones óptimas para realizar en una prueba única la detección de ambos marcadores moleculares. Adicionalmente, la prueba optimizada es útil también para discernir entre la variante homocigota y heterocigota de la mutación *JAK2V617F*. La prueba también se diseñó para realizar la detección de mutaciones adicionales en el exón 12 y 13 del gen *JAK2*, por secuenciación de un producto de amplificación, que a la vez es control interno de la reacción de PCR.

Nuestros resultados indican que la utilización de arreglos ortogonales es una herramienta útil para la optimización de técnicas moleculares, se determinó las variables que influyen significativamente en la técnica. La metodología Taguchi nos permitió estandarizar un método rápido y robusto para la detección de los transcritos *BCR-ABL1* y la mutación *JAK2V617F* con características favorables para ser utilizado en el diagnóstico clínico.

II. ABSTRAC

Analysis of *BCR -ABL1* transcripts by RT-PCR is routinely used to assess both diagnostic and treatment response in patients with chronic myeloid leukaemia (CML). Other Myeloproliferative Neoplasm (MPN) including polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) has been recently characterized at a molecular level showing the prevalence of a single point mutation in the cytoplasmic tyrosine kinase *JAK2* (*JAK2V617F*), introducing a new excellent diagnostic molecular marker that been adopted by the World Health Organization (WHO) as a diagnostic criteria for these myeloid neoplasms. These discoveries have changed the landscape for diagnosis and classification of chronic myeloproliferative disorders. The use of Taguchi method as an alternative approach to standardized a multiplex RT-PCR to detect both *BCR-ABL1* and *JAK2V617F* markers in a simple test useful in a routine molecular diagnostic practice.

The development and standardization of the RT-PCR test to detect *JAK2 V617F* mutation and *BCR -ABL1* translocation variants b2a2 and b3a2 was carried out using an orthogonal array including major factors affecting the PCR reaction (primer and Mg^{+2} concentration, Taq polymerase, annealing time and temperatures and PCR cycles) and their associated levels. Using this array through 36 independent assays we successfully optimized a simple test for both molecular markers. Additionally, the optimized test distinguishes homozygous from heterozygous mutations. The test was also designed to analyze the presence of additional mutations on *JAK2* exons 12 and 13 by sequencing analysis.

Conclusions: Our results suggest that orthogonal arrays are useful tools for optimization molecular techniques leading to determine the most significant variables during the test. The Taguchi method allowed us to standardized a rapid and robust method for detection of the *BCR - ABL1* transcripts and *JAK2 V617F* mutation with favorable performance characteristics that make it advantageous for clinical diagnosis.

III. INTRODUCCIÓN

La producción de células sanguíneas -hematopoyesis- es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea (MO), tejido esponjoso que se encuentran en la cavidad central de los huesos. En recién nacidos todos los huesos tienen una médula activa, pero en la juventud solo la médula de la columna, crestas ilíacas, omóplatos, costillas, esternón y el cráneo permanecen con actividad de maduración de las células sanguíneas. La hematopoyesis inicia con la activación de un programa de diferenciación de las llamadas células tronco y culmina con la formación de células especializadas (Figura 1).

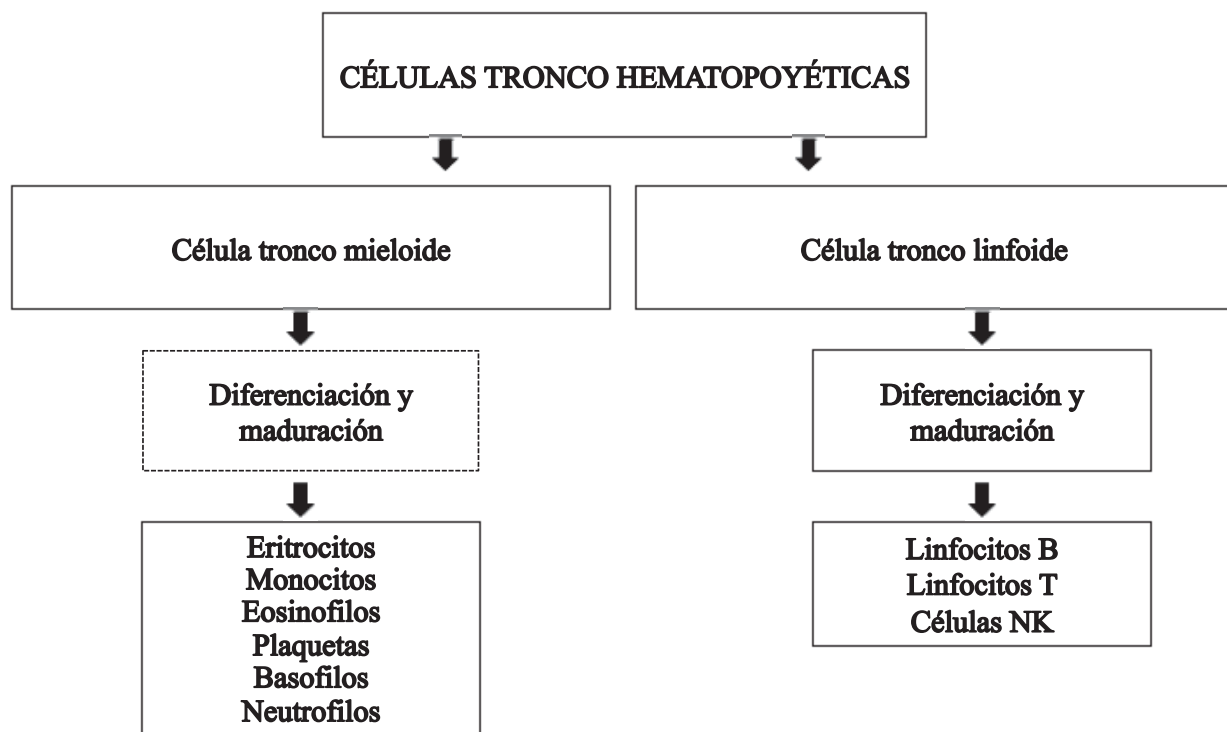


Figura 1. Diferenciación y maduración de las células tronco hematopoyéticas.

En personas sanas, existen suficientes células tronco para mantener la producción constante de células hematológicas, de tal forma que cuando la sangre pasa por la MO incorpora eritrocitos, leucocitos y plaquetas totalmente diferenciados. Bajo ciertas condiciones, la producción de

células hematológicas puede estar alterada ocasionando leucemia o cáncer hematológico que afecta a la MO y a la sangre periférica (SP). La leucemia se puede presentar con características fenotípicas diferentes, generando 4 tipos: leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica. En la leucemia clasificada como linfoblástica, las alteraciones genéticas se dan en células progenitoras linfoides, mientras que en las mieloides se ven afectados los progenitores mieloides. El término agudo a un padecimiento leucémico se asocia con una rápida evolución de la enfermedad, con presencia de células inmaduras que son incapaces de realizar sus funciones normales. Por otra parte, una leucemia crónica se refiere a un desarrollo lento de la enfermedad con una diferenciación completa de la mayoría de las células, las cuales realizan solo algunas de sus funciones. Los cuatro tipos principales de leucemias están clasificadas en subtipos de acuerdo a características específicas de las células afectadas.¹

1.- Clasificación de las neoplasias mieloides (leucemias mieloides)

La neoplasia o leucemia mieloide, es una indisposición de las células hematológicas de estirpe mieloide, en las que su proceso de diferenciación, proliferación o muerte programada esta alterado. Como esta condición es propia de las células mieloides, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha realizado una recolección de características (morfología, histología, clínica, mutaciones genéticas) que presenta este linaje celular con la finalidad de relacionarlas directamente con un subtipo de neoplasia para llevar a cabo un diagnostico adecuado. La leucemia mieloide crónica (LMC) es el prototipo para la identificación y clasificación de las neoplasias mieloides. Este padecimiento es identificado por sus características clínicas y morfológicas, su progresión natural esta caracterizada por el aumento de blastos mieloides y linfoides o blastos con inmunofenotipo combinado linfoide/mieloide. La LMC presenta como marcador patognomónico al gen de fusión *BCR-ABL1*, producto de una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Este gen de fusión codifica para una proteína cinasa de tirosina (PTK) con actividad enzimática aumentada y su presencia es causa suficiente para desencadenar una LMC.²

En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides publicada en el año 2008, se establece que al igual que en la LMC,

las anormalidades recurrentes no solo generan criterios específicos de diagnóstico de enfermedades sino también el conocimiento de productos anormales de genes o vías de señalización que son potencialmente dianas terapéuticas^{3,4,5}. Un claro ejemplo, fue la identificación de mutaciones que inducen la actividad de la proteína *JAK2* asociadas a neoplasias mieloproliferativas (NMP)^{6,7,8,9}.

1.1 Criterios de la Organización Mundial de la Salud para la clasificación de neoplasias mieloides

La clasificación propuesta por la OMS sobre las neoplasias mieloides depende de características morfológicas, citoquímicas e inmunofenotípicas de las células neoplásicas, estableciendo así su linaje y grado de maduración. La evaluación de estas características permite decidir si la proliferación es citológicamente normal o displásica, efectiva o inefectiva (Tabla 1). Esta clasificación, esta basada en criterios aplicados a las muestras clínicas recolectadas antes de establecer una terapia definitiva, incluyendo aquella con factores de crecimiento. El porcentaje de blastos en médula ósea, sangre periférica y otros tejidos involucrados mantiene importancia práctica para categorizar a la neoplasia mieloide y evaluar su progresión. Los estudios citogenéticos y de biología molecular son requeridos al tiempo del diagnóstico, no solo para la identificación de anormalidades específicas, sino para establecer una base contra la cual estudios de progresión posteriores puedan ser comparados. Para realizar el diagnóstico de neoplasia mieloide, se requiere de un enfoque multidisciplinario, donde varios estudios diagnósticos en correlación con los hallazgos clínicos se asocien en un reporte único e integral.

La clasificación de la OMS, incluye numerosas entidades neoplásicas definidas por anormalidades genéticas específicas, incluyendo rearrreglos cromosómicos debidos a translocaciones, deleciones, inserciones y mutaciones específicas, en todos los casos es importante determinar las características genéticas de las células neoplásicas.

Tabla 1. Características clínicas de las Neoplasias mieloides

Enfermedad	Celularidad en médula ósea	Porcentaje: blastos en médula	Maduración	Morfología	Hematopoyesis	Recuento sanguíneo
NMP	Incrementada, a menudo permanece normal en TE	Normal o ligeramente incrementada; <10% en fase crónica	Presente	Granulocitos, eritroides normales, anormales	Eficaz	Variables; uno o mas linajes mieloides incrementados
Neoplasia Infoide/mielode con eosinofilia y anomalías de PDGFRB, PDGFRB o FGFR1	incrementada	Normal o ligeramente incrementada; <20% en fase crónica	Presente	Relativamente normal	Eficaz	Eosinofilia ($\geq 1.5 \times 10^9/L$)
SMD	Incrementada, ocasionalmente normal o baja	Normal o incrementada ; <20%	Presente	Displasia en uno o mas linajes mieloides	Ineficaz	Citopenia(s)
SMD/NMP	incrementada	Normal o ligeramente elevada; <20%	Presente	Usualmente uno o mas linajes displas (Walter, 2009)icos; LMMJ ocasionalmente presenta displasia mínima	Puede variar entre linajes	Variable, usualmente eritrocitos elevados
LMA	Usualmente incrementada	Incrementada, $\geq 20\%$, excepto en algunos casos con anomalías genéticas específicas o en algunos casos de eritroleucemia	Variada, usualmente mínima	Puede asociarse o no con displasia en uno o varios linajes	Ineficaz o eficaz	Conteo de leucocitos variable, usualmente se presenta anemia y trombocitopenia

WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2008

Es recomendable que la evaluación inicial incluya un análisis citogenético completo de médula ósea con el fin de confirmar el diagnóstico presuntivo basado por estudios clínicos, morfológicos e inmunofenotípicos. El análisis citogenético se debe realizar en intervalos regulares para evaluar la evolución genética y respuesta al tratamiento. En algunos casos, técnicas moleculares como son la amplificación en cadena de la polimerasa acoplada a una transcripción reversa (RT-PCR) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) podrían utilizarse para detectar rearrreglos de genes que estén presentes en bajo nivel y no sea posible observarlos en el análisis cromosómico inicial. Un gran número de mutaciones detectadas por secuenciación y otras técnicas moleculares han surgido como marcadores importantes de diagnóstico y pronóstico en todas las categorías de neoplasia mieloide, algunas de ellas incluyen a los genes *JAK2*, *FLT2*, *RUNX1* y *CEBPA*. La sobreexpresión o supresión de estos y otros genes, así como la pérdida de heterocigocidad son ahora reconocidas como anormalidades importantes que podrían influir en un futuro cercano en modelos diagnósticos y pronósticos.¹⁰

1.2 Neoplasias mieloproliferativas (NMP)

Los desordenes clonales de células tronco hematopoyéticas caracterizados por la proliferación de uno o mas linajes mieloides (granulocitos, eritrocitos, megacariocitos o mastocitos) son dominados neoplasias mieloproliferativas (Figura 2). Estas neoplasias son principalmente frecuentes en adultos entre 50 y 70 años, pero algunas como leucemia mieloide crónica (LCM) y trombocitemia esencial (TE) también están reportadas en niños. La incidencia combinada de todas las neoplasias mieloproliferativas es de 6 a 10 casos por cada 100,000 personas al año^{11,12,13}. Inicialmente, la neoplasia mieloproliferativa se caracteriza por hiper celularidad en MO con maduración hematopoyética efectiva, granulocitos, eritrocitos y/o plaquetas elevados en SP. La esplenomegalia y hepatomegalia son comunes debido al secuestro del exceso de células sanguíneas o por la proliferación en exceso de células hematológicas anormales. Cada NMP, tiene el potencial de sufrir una progresión gradual que culmina en insuficiencia de la médula ósea debido a la mielofibrosis, hematopoyesis ineficaz o la transformación a una fase blástica aguda. La progresión de la enfermedad es anunciada por incremento en la organomegalia, aumento o disminución del recuento sanguíneo, mielofibrosis y el comienzo de mielodisplasia. El conteo de blastos, en SP o MO de 10 a 19% indica fase acelerada y 20% de blastos o mas es suficiente para diagnosticar fase blástica.

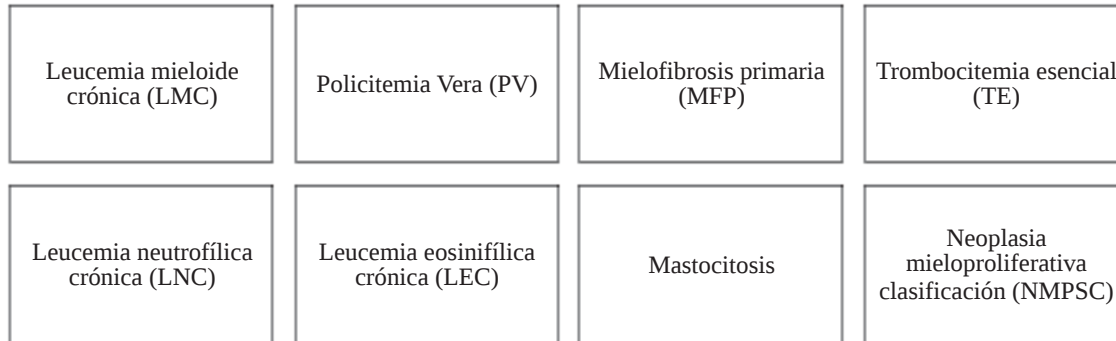


Figura 2. Clasificación de Neoplasias Mieloproliferativas de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud

1.3 Criterios diagnósticos de Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)

Los criterios de clasificación por parte de la OMS para este tipo de neoplasias fueron influenciados por 2 factores: a) el reciente descubrimiento de anormalidades genéticas en NMP *BCR-ABL1* negativas y b) la amplia apreciación de características histológicas (morfología y topografía de megacariocitos, cambios estromales en médula, identificación de linaje celulares específicos relacionados con proliferación) correlacionadas con características clínicas y que pueden ser útiles para identificar los subtipos de NMP. En la Tabla 2 se muestran las características clínicas y moleculares de las neoplasias mieloproliferativas clásicas.^{14,15,16}

Tabla 2. Datos clínicos de Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas

Neoplasia mieloproliferativa clásica	Leucocitos	Eritrocitos	Plaquetas	Marcador molecular	Hemoglobina
Leucemia mieloide o granulocítica crónica (LGC)	Granulocitos elevados de $10 \times 10^9/L$ hasta $1000 \times 10^9/L$	Normales o alterados	En la mayoría de los casos elevadas	Gen de fusión <i>BCR-ABL1</i>	Normal o elevada
Policitemia Vera (PV)	Ligeramente elevados o normales	Elevados Mayor de 25% de lo normal	Ligeramente elevadas mayor a 400	95% de los casos <i>JAK2V617F</i>	Hombres mayor a 18.5 g/dL Mujeres mayor a 16.5 g/dL
Trombocitemia esencial (TE)	Ligeramente elevados o normales	Normales	Elevadas mayor a $450 \times 10^9/L$	50% de los casos <i>JAK2V617F</i>	Menor a 13g/dL
Mielofibrosis Primaria (MFP)	Ligeramente elevados, normales o disminuidos	Normales	Presencia de plaquetas gigantes	50% de los casos <i>JAK2V617F</i>	Menor a 10g/dL

WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2008

La mayoría de las NMP están relacionadas con anormalidades clónales que involucran mutaciones en aquellos genes que codifican para receptores o proteínas cinasas de tirosina (PTK). Estas alteraciones involucran mutaciones puntuales que dan como resultado la activación anormal de PTKs asociadas a rutas de transducción de señales generando una proliferación anormal. Estas anormalidades genéticas, como el gen de fusión *BCR-ABL1* en la LMC, se asocian consistentemente con resultados de los estudios clínicos y que se pueden utilizar como criterios mayores para su clasificación. Mutaciones somáticas adquiridas en el gen *JAK2* (9p24), han demostrado tener un papel esencial en la patogénesis de NMP *BCR-ABL1* negativas.^{17,18,19} La mutación mas común, *JAK2V617F*, resulta en la activación constitutiva de la proteína *JAK2* que activa vías de transducción de señales reguladas por transductores de señales y activadores de transcripción denominados *STAT* (por sus siglas en inglés), cinasas de proteínas activadas por mitógenos (*MAPK*), y cinasas dependientes de 3-fosfatidilinositol (*PI3K*).^{20,21} Estas vías están asociadas con la transformación y proliferación de progenitores hematopoyéticos. La mutación *JAK2V617F* se encuentra en casi todos los pacientes con policitemia vera (PV) y en aproximadamente la mitad de los que cursan con mielofibrosis primaria (MFP) y trombocitemia esencial (TE). En los pacientes con PV que carezcan de la mutación *JAK2V617F*, puede encontrarse mutaciones en el exón 12 o 13 del mismo gen. Aun cuando las mutaciones en el gen *JAK2* no son específicas de NMP los algoritmos de diagnostico para PV, MFP y TE se han modificado para incluir a las mas frecuentes. Esta mutación ha sido reportada en otros casos de SMD/NMP, en LMA y en combinación con el marcador *BCR-ABL1*.²²

2. Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC), es una neoplasia mieloproliferativa que se origina por células tronco anormales en la médula ósea y se asocia con el gen de fusión *BCR-ABL1* generado por la formación del cromosoma filadelfia (derivativo 22 formado por la translocación de los brazos largos de los cromosomas 9 y 22).^{23,24,25,26} El gen se detecta en neutrófilos, aunque se puede encontrar en todas las células de linaje mieloide y en algunas células endoteliales y linfocitos. El curso natural de una LMC sin tratamiento consta de 2 o 3 fases bien definidas: una fase crónica inicial indolente, seguida de una fase acelerada o una fase blástica o ambas. En el desarrollo de la fase crónica, las células leucémicas son poco invasivas y la proliferación se

confina al tejido hematopoyético. En la fase blástica el tejido extramedular como nódulos linfáticos, piel y tejidos suaves pueden mostrar infiltración por blastos.^{27,28,29} La mayoría de los pacientes, son diagnosticados en la fase crónica durante una examinación médica de rutina, un 40% de ellos son asintomáticos, la LMC se presenta entre los 50 a 60 años indistintamente del genero (Tabla 3).^{30,31,32} Comúnmente se presentan síntomas como fatiga, perdida de peso, sudoraciones nocturnas, esplenomegalia y anemia.^{33,34} Algunos casos atípicos presentan una marcada trombocitosis sin acompañarse por un número elevado de eritrocitos al igual que en el inicio de la fase blástica, sin una fase crónica detectada anteriormente.^{35,36} En ausencia de un tratamiento, la mayoría de los casos evolucionan de una fase crónica a una fase blástica, ya sea atravesando por una fase acelerada o no. Sin embargo, algunos pacientes mueren presentando la fase acelerada sin evolución a la fase blástica. La transformación de las fases son acompañadas por un malestar mayor con marcados síntomas relacionados con anemia severa, aumento de trombocitopenia o esplenomegalia.³⁷

Tabla 3. Etiología y epidemiología de la leucemia mieloide crónica

Sinónimos	Etiología	Epidemiología		
		Casos al año /100000 personas	Edad	Género afectado
Leucemia granulocítica crónica	Radiaciones ionizantes	1 a 2	50 a 60 años	Hombres
Leucemia mielógena crónica	No hereditaria			Mujeres

WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2008

En el 95% de los casos de LMC presentan la translocación recíproca t(9;22)(q34;q11.2) que generan el cromosoma filadelfia [Ph=der(22q)].^{38,39} Esta translocación genera la fusión del gen *BCR* del cromosoma 22 con el gen *ABL1* del cromosoma 9.⁴⁰ Menos del 5% de pacientes con LMC presentan variantes de la translocación que involucran un tercer o cuarto cromosoma además del 9 y 22, o bien se encuentra críptica para el análisis citogenético. En estos casos el gen de fusión *BCR-ABL1* es identificado por técnicas como FISH, RT-PCR o southern blot.⁴¹

2.1 Marcador molecular *BCR-ABL1*

La fusión de los genes *BCR* y *ABL1* ocurre por la ruptura de las regiones génicas involucradas. El punto de ruptura en el gen *ABL1* en la región cromosómica 9q34 puede ocurrir en cualquier sitio hacia el extremo 5' (hasta 300kb), puede ser río arriba del primer exón alternativo Ib, río abajo del segundo exón alternativo Ia o mas frecuentemente entre ambos (Figura 3A).⁴² La exacta ubicación del punto de ruptura es poco predecible, por lo que en el análisis de transcritos híbridos, se encontró que se generan por la edición (splicing) de una molécula de RNAm en la cual la secuencia del gen *BCR* esta fusionada en el exón a2 del gen *ABL1*. Contrario a lo que pasa con *ABL1*, en *BCR* se encuentran 3 puntos de ruptura (Figura 3A). En la mayoría de pacientes con LMC y en aproximadamente un tercio de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) *BCR-ABL1* positivos, el punto de ruptura ocurre en un área de 5.8kb que abarca los exones 12 al 16 (originalmente referidos como exones b1 al b5) del gen *BCR* denominada M-*bcr* (major breakpoint cluster region). Esto por que al ser editados se obtiene cualquiera de los transcritos de fusión b2a2 y b3a2 (Figura 3B), de estos RNAm se deriva una proteína quimérica de 210kDa (p210^{BCR-ABL1}). En el resto de los pacientes con LLA y raramente en pacientes con LMC, caracterizados por una monocitosis prominente, los puntos de ruptura se encuentran en una región de 54.4kb entre los exones alternativos e2' y e2 del gen *BCR*, sitios denominados m-*bcr* (minor breakpoint cluster región).^{43,44} El resultante RNAm e1a2 es traducido en una proteína de 190kDa (p190^{BCR-ABL1}). Un tercer punto de ruptura es el denominado μ -*bcr* (micro breakpoint cluster region), este fue encontrado río abajo del exón 19, generando una proteína de fusión de 230kDa (p230^{BCR-ABL1}) que es asociada a una rara leucemia neutrofilica crónica *BCR-ABL1* positiva, pero no se encuentra en todos los casos.^{45,46} Además de los transcritos mencionados también se pueden encontrar los transcritos b2a3, b3a3, e6a2 o e2a4 en pacientes con LMC y LLA.^{47,48} Basado en la observación se determina que la parte *ABL1* en la proteína quimérica permanece casi invariable mientras que la porción *BCR* es muy variada. Se puede deducir que *ABL1* esta encargado en principio de la transformación mientras que la longitud de *BCR* dicta el fenotipo de la enfermedad.⁴⁹ La actividad aumentada de la cinasa de tirosina *BCR-ABL1* es responsable de la activación constitutiva de varias vías de transducción de señales.⁵⁰ El resultado de esto es el fenotipo de la LMC con células que proliferan de manera irregular, que reducen su adherencia al estroma de la médula ósea y una respuesta defectuosa a la apoptosis estimulada por

mutagénesis. La comprensión de la señalización anormal en la LMC llevó al diseño y síntesis de pequeñas moléculas que inhiban la actividad cinasa de tirosina de la proteína *BCR-ABL1*, de las cuales la primera que fue usada exitosamente para el tratamiento de LMC fue el Imatinib®.^{51,52} El Imatinib® compite con el ATP por la unión al dominio cinasa de *BCR-ABL1* para así prevenir las fosforilaciones en residuos de tirosina de los sustratos de *BCR-ABL1*. La interrupción de las señales oncogénicas de esta forma son muy efectivas para el control de la enfermedad, particularmente cuando se usa en etapas tempranas de la fase crónica. Sin embargo, la aparición de sub-clonas celulares leucémicas con mutaciones puntuales evitan la unión del inhibidor al dominio cinasa de *BCR-ABL1* generando así, resistencia al Imatinib® asociada a las fases acelerada y blástica.^{53,54} La segunda generación inhibidores incluyen al linotinib® y dasatinib®, los cuales no son útiles para la mayoría de las mutaciones del dominio cinasa, pero si en algunos casos donde se ha generado resistencia al imatinib®.^{55,56} Las bases moleculares de la transformación de la enfermedad continúan siendo desconocidas. La progresión de la enfermedad se relaciona con la evolución clonal y con la transformación a fase blástica o fase acelerada, el 80% de casos presenta anormalidades citogenéticas adicionales, +Ph, +8, +19 o i(17q).^{57,58,59} Entre los genes que muestran alteraciones en las transformaciones de fases están *TP53*, *RB1*, *MYC*, *p16^{INK4a}* (*CDKN2A*), *RAS*, *AML1* y *EVII*, pero su papel en la transformación esta aún en estudio.^{60,61,62} El análisis de los perfiles de expresión del genoma por microarreglos ha revelado otros genes candidatos asociados con estados avanzados de la enfermedad, la expresión de genes en las fases acelerada y blástica presentan mucha similitud, sugiriendo que los eventos génicos que las inducen inicia en la fase crónica tardía o en la fase acelerada temprana.^{63,64,65}

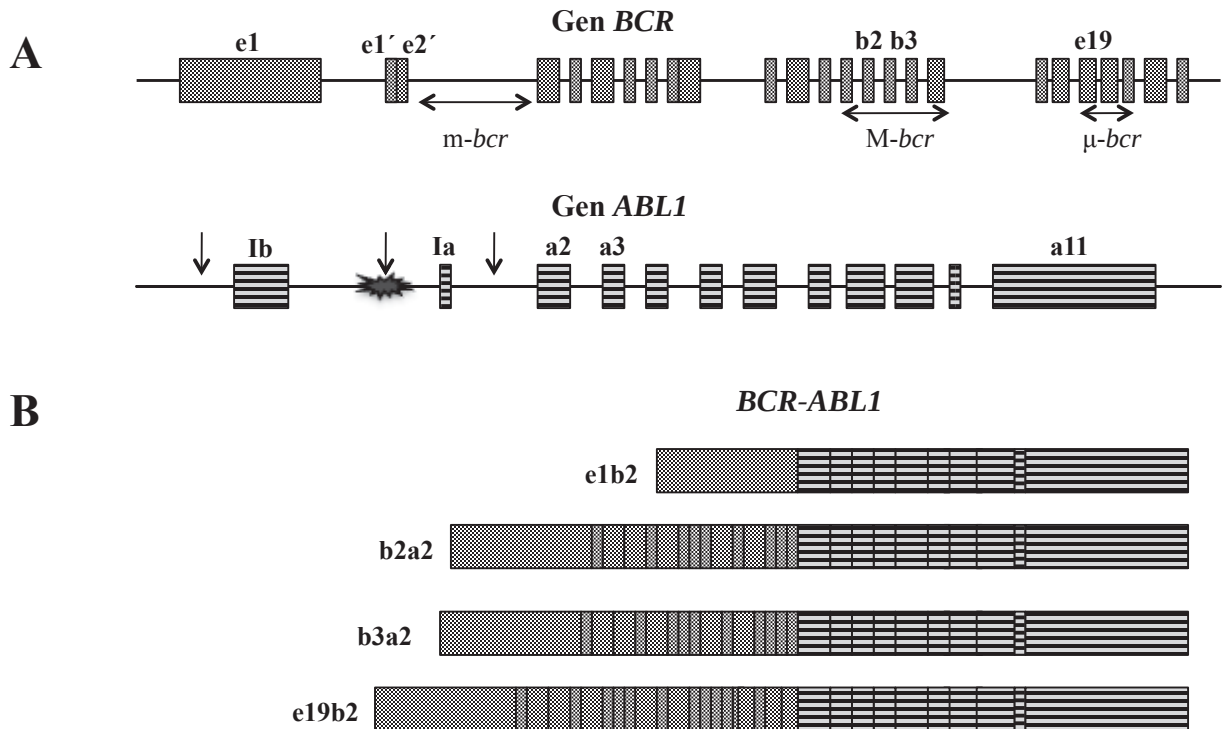


Figura 3. Puntos de ruptura de los genes *BCR* y *ABL1* y estructura de los RNAm quiméricos. (A) Las flechas indican las regiones de mayor probabilidad de ruptura en los genes *ABL1* y *BCR* (M-*bcr*, m-*bcr* y μ -*bcr*). (B) Estructura de RNAm quiméricos producidos por la fusión de los genes *BCR* y *ABL1* (se muestran las variantes e1b2, b2a2, b3a3, y e19b2)

3. Policitemia vera

La policitemia vera (PV), es una neoplasia mieloproliferativa crónica (NMP) caracterizada por un incremento de eritrocitos debido a una producción independiente del mecanismo que normalmente regula la eritropoyesis. Virtualmente casi todos los pacientes presentan una mutación somática, *JAK2V617F* o mutaciones funcionales similares, en el gen Janus cinasa 2 que genera una ganancia de función que da como resultado la proliferación no solo de la línea eritroide sino también granulocítica y megacariocítica. En la PV se han identifica tres fases: una fase pre-policitemica, caracterizada por un aumento menor en los eritrocitos; una fase policitémica asociada con un incremento significativo eritrocitos y una fase post-policitemica mielofibrotica en la cual se presentan citopenias, como anemia, las cuales son asociadas al hematopoyesis ineficaz, fibrosis de la médula ósea, hematopoyesis extra medular e hiperesplenismo. El progreso natural de la PV, incluye una incidencia baja a una fase

preleucémica/mielodisplásica y/o leucemia mieloide aguda. Deben excluirse, todas las causas de eritrocitosis secundaria, policitemia inherente o de otra NMP. El diagnóstico requiere una integración de los análisis de laboratorio, clínica y estudios histológicos de médula ósea (Tabla 4).

Tabla 4. Criterios diagnósticos para policitemia vera^a

Criterios mayores	
a)	Valores de hemoglobina > 18.5 g/dl en hombres, 16.5 g/dl en mujeres u otra evidencia de aumento en el volumen de eritrocitos
b)	Presencia de la mutación <i>JAK2V617F</i> u otra mutación funcional similar como las reportadas en el exón 12 del gen <i>JAK2</i>
Criterios menores	
a)	Biopsia de MO que muestre hiper celularidad. Panmielosis con elevada proliferación de eritrocitos, granulocitos y megacariocitos
b)	Niveles por debajo de lo normal de eritropoyetina en suero
c)	Formación de colonias de eritrocitos endógenas <i>in vitro</i>

a) El diagnóstico requiere la presencia de 2 criterios mayores y uno menor, o la presencia del primer criterio mayor y 2 menores.

La policitemia vera afecta con una ligera preferencia al género masculino, generalmente entre 60 años y muy raramente en menores de 20 años (Tabla 5).

Tabla 5. Etiología y epidemiología de policitemia vera

Sinónimos	Etiología	Epidemiología		
		Casos al año /100000 personas	Edad	Genero afectado
Policitemia rubra vera	radiaciones ionizantes, exposición ocupacional, predisposición genética en algunas familias	0.7 a 2.6	Media 60 años	Ligeramente mayor en hombres

WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2008

La sangre y la MO, son los sitios principales de desarrollo de las células neoplásicas. El hígado y el bazo, son los sitios donde ocurre la hematopoyesis extramedular en estadios avanzados de la enfermedad. Ningún órgano puede ser dañado como consecuencia vascular por el aumento de la masa eritroide.⁶⁶ Los síntomas relacionados con PV son hipertensión y anomalías vasculares causadas por el incremento de los eritrocitos. En aproximadamente el 20% de los pacientes se reporta un episodio de trombosis arterial o venosa y podría ser la primera manifestación clínica

de PV.^{67,68,69} Dolor de cabeza, mareos, alteración de la visión, eritromegalia y gota son las principales molestias. Se presenta esplenomegalia y hepatomegalia palpable en el 70% y 40% de los pacientes respectivamente.⁷⁰ Los niveles subnormales de eritropoyetina (Epo), formación de colonias eritroides endógenas, y la detección de la mutación *JAK2V617F* o mutaciones funcionales similares en el exón 12 del gen *JAK2* contribuyen en el diagnóstico.^{71,72,73,74,75,76} La mutación *JAK2V617F*, se presenta en mas del 95% de los pacientes con PV.^{77,78,79,80} Las mutaciones ocurren en células tronco hematopoyéticas, y es encontrada en todos los linajes mieloides. Por tanto las células que utilizan la cinasa *JAK2* en las vías de transducción intracelulares son hipersensibles a factores de crecimiento y citoquinas, como Epo. Una mutación funcional similar ha sido reportada en el exón 12 del gen *JAK2*.⁸¹ Virtualmente todos los pacientes con PV tiene aberraciones en el gen *JAK2*, sin embargo no se ha detectado una anormalidad patognomónica. En el diagnóstico citogenético se detectan anormalidades en cerca del 20% de los casos. La anormalidades recurrentes son: +8, +9, del(20q), del(13q) y del(9q).^{82,83}

4. Mielofibrosis primaria

Mielofibrosis primaria (MFP), neoplasia mieloproliferativa clonal caracterizada por una predominante proliferación de megacariocitos y granulocitos en MO, se relaciona con el depósito reactivo de tejido conectivo fibroso y hematopoyesis extramedular en el desarrollo completo de la enfermedad.⁸⁴ La evolución de una fase inicial prefibrotica, caracterizada por una hipercelularidad en la MO con ausencia o presencia de fibrosis reticulínica, pasa a una marcada fase fibrotica de colágeno y reticulina en MO generan la MFP, caracterizada por leucoeritroblastosis en la sangre con eritrocitos en forma de lagrime, hepatomegalia y esplenomegalia (Tabla 6).⁸⁵ Se presenta hematopoyesis extramedular particularmente en el bazo.⁸⁶ El incremento de las células CD34+ en sangre periférica es un fenómeno exclusivo de MFP y no se observa en PV no fibrotica o TE.^{87,88,89} Mas del 30% de los pacientes son asintomáticos y es diagnosticada por el descubrimiento de esplenomegalia durante una examen físico de rutina o cuando un conteo sanguíneo revela anemia, leucocitosis y/o trombocitosis.

Tabla 6. Criterios diagnósticos para mielofibrosis primaria^a

Criterios mayores
a) presentar proliferación y atípicos megacariocitos, acompañados de fibrosis colágena y/o reticulínica.
b) no presentar ningún criterio de clasificación de la OMS de PV, LMC, SDM u otra neoplasia mieloide
c) presencia de JAK2V617F u otro marcador clonal (<i>MPL</i> W515K/L) o en la ausencia del marcador clonal, no presentar evidencia de fibrosis en la médula ósea.
Criterios menores
a) leucoeritroblastosis
b) incremento en suero del nivel de lactato deshidrogenasa
c) anemia
d) esplenomegalia

a) El diagnóstico requiere la presencia de los 3 criterios mayores y 2 criterios menores

La MFP afecta indistintamente del género y la media de edad está entre 60 y 70 años (Tabla 7). También se diagnostica por el descubrimiento de una inexplicada leucoeritroblastosis o un incremento en la lactato deshidrogenasa.^{90,91,92} Entre los síntomas se encuentran fatiga, disnea, pérdida de peso, sudoraciones nocturnas, fiebre ligera y sangrados, también la esplenomegalia es encontrada en el 90% de los pacientes y el 50% presenta hepatomegalia, la mutación *JAK2V617F* está presente en aproximadamente el 50% de los casos de MFP.^{93,94,95,96,97,98}

Tabla 7. Etiología y epidemiología de la mielofibrosis primaria

Sinónimos	Etiología	Epidemiología		
		Casos al año /100000 personas	Edad	Género afectado
Mielofibrosis crónica idiopática, metaplasia mieloide angiogenica, mielofibrosis/esclerosis con metaplasia mieloide, mielofibrosis idiopática.	Exposición a benceno, radiaciones ionizantes, condición autosómica recesiva y predisposición genética en algunas familias	0.5 a 1.5	60-70 años	Indistinto

WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2008

Aproximadamente el 50% de los casos de MFP exhiben la mutación *JAK2V617F*.⁹⁹ La presencia de la mutación confirma la proliferación clonal, esta mutación también se encuentra en PV y TE por lo que no ayuda a distinguir entre MFP de otra NMP.^{100,101,102,103,104} La mutación en *MPL* W515K/L se ha reportado en el 5% de los casos de MFP y ocasionalmente en TE.¹⁰⁵ La presencia de del(13)(q12-22) o der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3) sugiere pero no diagnostica MFP.¹⁰⁶ El 30% de los casos presentan anomalías citogenéticas, las recurrentes son del(20q), trisomía parcial 1q,

+9 y +8.^{107,108,109,110} Las deleciones de los brazos largos de los cromosomas 5 y 7 también ocurren, pero éstas pueden atribuirse a la terapia citotóxica usada en el tratamiento del proceso mieloproliferativo.

5. Trombocitemia esencial

La Trombocitemia esencial (TE) es una neoplasia mieloproliferativa crónica, que involucra principalmente la línea megacariocítica. Es caracterizada por una trombocitosis sostenida $\geq 450 \times 10^9/L$ en sangre periférica, un incremento en la cantidad de megacariocitos maduros en médula ósea y clínicamente por episodios de trombosis y hemorragias. Dado que no se conoce un marcador específica de TE se deben excluir otras causas de trombosis, otras NMP, desordenes infecciosos e inflamatorios, hemorragias y otros tipo de neoplasias hematológicas y no hematológicas. La presencia del gen de fusión *BCR -ABL1* excluye el diagnostico de TE (Tabla 8).

Tabla 8. Criterios diagnósticos para trombocitemia esencial^a

a) conteo de plaquetas sostenido $\geq 450 \times 10^9/L$
b) en biopsia de médula ósea mostrar proliferación del linaje megacariocítico principalmente con presencia elevada de megacariocitos maduros. No hay incremento significativo de granulopoyesis neutrófila o eritropoyesis
c) no presentar criterios de la OMS para PV, MFP, LMC <i>BCR -ABL1</i> positiva, síndrome mielodisplásico u otra neoplasia mieloide
d) presencia del marcador <i>JAK2V617F</i> u otro marcador clonal, en la ausencia de <i>JAK2V617F</i> no presentar evidencia de trombocitosis reactiva

a) El diagnostico requiere de la presencia de los 4 criterios

La sangre y la médula ósea son los principales sitios de desarrollo de TE. No se desarrolla hematopoyesis extra medular en el bazo significativamente, pero si es un sitio de secuestro de plaquetas.^{111,112,113} La TE afecta indistintamente del genero a personas entre 60 a 70 años, pero en ujeres de cerca de 30años se observa una ligera incidencia, mas de la mitad de los pacientes son asintomáticos con una cantidad de plaquetas elevado como parte de un conteo de células sanguíneas de rutina (Tabla 9).¹¹⁴ Los pacientes restantes presentan algunas manifestaciones de oclusión vascular y hemorragias.^{115,116} Ocurre trombosis en arteria y venas principales y TE puede ser la causa de trombosis en venas de hígado y bazo como en el síndrome de Budd-Chiari. Los sangrados ocurren principalmente en mucosas gastrointestinales y respiratorias.^{117,118,119} Raramente pacientes que caen en los criterios de TE han presentado megacariopoyesis no clonal o bajo grado de episodios tromboticos.¹²⁰

Tabla 9. Etiología y epidemiología de la trombocitemia esencial

Sinónimos	Etiología	Epidemiología		
		Casos al año /100000 personas	Edad	Genero afectado
Trombocitosis primaria, trombocitosis idiopática, Trombocitemia hemorrágica.	Desconocida	0.6 a 2.5	Entre 50 y 60 años, prevalencia secundaria a los 30 años.	Indistinto entre 50 y 60 años, Mujeres de 30 años

WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 2008

No se conocen anormalidades específicas de TE. Aproximadamente del 40 al 50% de los casos presentan la mutación *JAK2V617F* o mutaciones funcionales similares.^{121,122,123,124,125} En 1% de los casos de TE se ha reportado la mutación *MPLW515K/L*.¹²⁶ En solo 5 a 10% de los casos se encuentra un cariotipo anormal (+8, del(20q) y anormalidades 9q).^{127,128} Ninguna de estas mutaciones son encontradas en trombocitemia reactiva.

6. Marcador molecular *JAK2V617F*

En la familia de las proteínas *JAK* cinasas se han identificado cuatro *JAK* cinasas: *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y *TYK2*. La primera *JAK* que se identificó fue *TYK2* a partir de una librería de DNA complementario de linfocitos T mientras que las restantes *JAK* fueron clonadas usando oligonucleótidos correspondientes a motivos conservados dentro del dominio catalítico de las cinasas de tirosina.¹²⁹ Las proteínas *JAK* son grandes, aproximadamente 1.150 aminoácidos y con un peso molecular entre 120 a 140 kDa. Los transcritos de RNA varían entre 4400 a 5400 pares de bases. En la estructura se pueden observar siete regiones conservadas las cuales han sido denominadas desde el extremo carboxilo terminal de JH1 a JH7 (Figura 4). La estructura principal que define a estas proteínas es la existencia en tándem de un dominio cinasa (JH1) y un dominio pseudocinasa (JH2). Esta dualidad es la que precisamente da el nombre a esta familia de tirosina cinasas ya que al igual que el dios romano de las puertas Jano (Janus), las *JAK* cinasas “tienen dos caras”.

Dominios de *JAK2* (JH1-JH7)

En el dominio JH1 reside la función catalítica de la proteína de modo que en su asa de activación

se han identificado varios sitios de autofosforilación constituidos por residuos de tirosina. Dependiendo de cada *JAK*, mutaciones en estos sitios pueden producir diferentes consecuencias funcionales. Mientras que la mutación de la tirosina 1007 en *JAK2* elimina la actividad cinasa de la proteína,¹³⁰ la mutación en los residuos correspondientes en *TYK2* (tirosina 1054 y tirosina 1055), no suprime dicha actividad catalítica. En el caso de *JAK3*, la mutación de la tirosina 980 no elimina la actividad cinasa de *JAK3* y en cambio la mutación de la tirosina 981 aumenta la actividad catalítica de la proteína. Por lo tanto, parece que hay diferencias en la regulación de la actividad catalítica de cada uno de las *JAK*. El dominio JH2 carece de los residuos críticos requeridos para la actividad catalítica. Algunos estudios indican que el dominio JH2 puede tener una función reguladora sobre la actividad catalítica inhibiéndola mientras que otros, postulan la necesidad de este dominio precisamente para mantener la función cinasa de las *JAK*. Otra de las funciones en las que se ha implicado al dominio JH2 es el de ser el potencial sitio de unión para los *STAT*. Resulta interesante el hecho de que algunos de los pacientes que padecen inmunodeficiencia combinada severa (SCID: Severe Combined Immunodeficiency) presentan mutaciones en el dominio JH2 de la cinasa *JAK3*.¹³¹ El extremo amino terminal de las *JAK* (JH3-JH7) presenta homología con el dominio FERM (Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin) y SH2. Los dominios amino terminales están involucrados en la unión de la proteína *JAK* con el receptor de citosina correspondiente. Estudios usando construcciones quiméricas en las que se deleta la región amino terminal de las *JAK*, se suprime la unión *JAK*-receptor.¹³² Mientras que en otras *JAK* cinasas la interacción con el receptor parece que se extiende más allá de los dominios JH6 y JH7, en el caso de *JAK3* estos dos dominios son necesarios y suficientes para la unión a la subunidad γ c de su receptor. Por último, se ha descrito que el dominio FERM de las *JAK* interviene en la unión con el receptor de citosinas y que además regula la actividad catalítica.¹³³

JAK2 cinasa y *JAK2V617F*

Al igual que *JAK1*, la cinasa *JAK2* está expresada en numerosos tejidos y su peso molecular es de 130 kDa. *JAK2* está involucrada en la señalización a través de los receptores de citosinas que comparten la cadena β así como en la señalización de ciertos miembros de las citosinas tipo II. Los ratones deficientes en *JAK2* (*jak2*^{-/-}) presentan mortalidad en la fase embrionaria debido a una ausencia total de eritropoyesis.

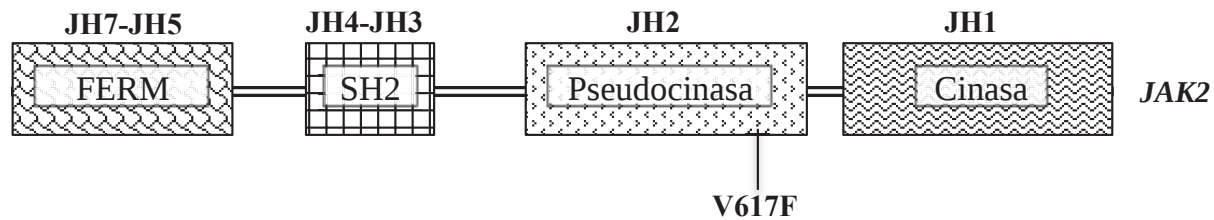


Figura 4. Estructura de la proteína JAK2 y la ubicación de la mutación V617F. La proteína jak2 está constituida por 7 dominios denominados JH1 a JH7. El dominio JH1 lleva a cabo la actividad catalítica cinasa. El dominio JH2 es un dominio pseudocinasa el cual realiza la autofosforilación para activar el dominio cinasa y es donde tiene lugar la mutación JAK2V617F. Los dominios JH3 al JH7 se involucran con la unión de la proteína con el receptor y guardan homología con los dominios SH2 y FERM.

JAK2 resulta esencial para la señalización de eritropoyetina, trombopoyetina, IL-3, IL-5, GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) e interferón-gamma (IFN- γ) pero no lo es para G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), INF-alfa (α), IFN-beta (β) e IL-6. Parece que JAK2 no resulta esencial para el desarrollo de los linfocitos T tal y como lo demuestra la transferencia de hepatocitos fetales *jak2*^{-/-} en un ratón *jak3*^{-/-} irradiado, que resulta en un desarrollo normal de todas las subpoblaciones de linfocitos T.

En la primavera de 2005, grupos de trabajo independientes descubrían, al mismo tiempo y por vías diferentes la mutación de otra PTK, JAK2V617F: la sustitución de guanina por timina en el nucleótido 1849, del exón 14, con el consiguiente cambio de valina por fenilalanina en el codón 617. Esta mutación se demostraba mediante técnicas de secuenciación en la mayoría de las PV y en el 50% de las TE y MFP.^{134,135,136,137} JAK2V617F es una mutación puntual, somática, adquirida, presente sólo en patologías hematológicas, fundamentalmente en NMPC filadelfia negativas (PV, TE, MFP) pero no exclusivamente,¹³⁸ sin embargo su descubrimiento redefinió los criterios mayores de diagnóstico para el caso de neoplasias mieloproliferativas en la revisión de la OMS del 2008.¹³⁹

7. Metodologías moleculares

Los estudios de citogenética son usados en la detección de marcadores moleculares como las anomalías numéricas, estructurales, translocaciones e inversiones en los cromosomas, un claro ejemplo es la detección del cromosoma filadelfia. En algunos eventos cromosómicos las anomalías son indetectables por citogenética y se recurre al uso de metodologías moleculares

mas específicas entre estas están las basadas en PCR, el reconocimiento específico de secuencias de DNA por enzimas de restricción, en hibridaciones de regiones de DNA y su detección por marcaje radioactivo o sondas fluorescentes. De los marcadores que se relacionan con las neoplasias mieloproliferativas el gen de fusión *BCR-ABL1*, se utiliza en su identificación la técnica RT-PCR por lo que se detectan transcritos de fusión, el uso de esta metodología es frecuente en el monitoreo y seguimiento de pacientes con tratamiento de inhibidores específicos de cinasa de tirosina como el imatinib y para determinar la enfermedad mínima residual, también se utiliza en el diagnostico de la fusión *BCR-ABL1* cuando no es perceptibles por metodologías citogenéticas. La mutación puntual *JAK2V617F* es detectada únicamente por metodologías moleculares específicas como el PCR-alelo específico, RFLP o secuenciación, y esta mutación se puede detectar a nivel de DNA y RNA.

RFLP (polimorfismos por los tamaños de fragmentos de restricción)

Es una metodología, basada en la especificidad de enzimas de restricción (endonucleasas) en el reconocimiento de secuencias de ácidos nucleicos y en la digestión del sitio reconocido de la molécula. Esta técnicas se basa el la presencia de polimorfismos entre organismos los cuales al ser digerido su genoma por una endonucleasa se generaran diferentes patrones de restricción y la comparación entre estos genera información de presencia de polimorfismos. Esta técnica se aplicación en la detección de mutaciones puntuales, ya que puede generar un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción o eliminarlo¹⁴⁰.

Secuenciación

El conocimiento de las secuencias de genes es el método de mayor escrutinio en la búsqueda de mutaciones. La secuenciación consiste en conocer el orden de los nucleótidos, las técnicas de secuenciación son variadas y todas tiene características favorables y también limitaciones, entre ellas la pirosecuenciación y la secuenciación por método de Sanger son las mas confiables para fines de investigación. La pirosecuenciación se usa en la secuenciación masiva de genomas. El método de Sanger es utilizado en el análisis de secuencias cortas (400pb a 1000pb), este se basa en el empleo de dideoxinucleótidos que carecen de uno de los grupos hidroxilo, de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de DNA en crecimiento, está cadena no puede continuar elongándose ya que la DNA polimerasa necesita un extremo 3' OH para

añadir el siguiente nucleótido y el deoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo. Para realizar la secuenciación se preparan cuatro tubos de reacción, cada uno con el DNA molde de hélice sencilla que se desea secuenciar, con DNA polimerasa, con el oligonucleótido y con los cuatro nucleótidos trifosfato, a cada tubo se le añade una pequeña proporción de un dideoxinucleótido trifosfato, un tubo con ddATP, otro con ddTTP, el tercero con ddGTP y el cuarto con ddCTP. En cada uno de estos tubos se producirán cadenas de DNA de distintas longitudes, terminando todas en el lugar en el que se incorporó el dideoxi correspondiente añadido al tubo, posteriormente, estas piezas de DNA se separan mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida. Las piezas más pequeñas migran más rápidamente que las grandes y la secuencia se puede leer directamente sobre el gel de acrilamida¹⁴¹

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR son las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de DNA utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas (79-95°C). Cuando se hace una PCR se simula lo que sucede en una célula en la replicación del DNA. Los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, oligos, etc.) son parte determinante del diseño de la PCR, ya que estos marcan el lugar que se amplificara para su detección, su diseño debe ser específico para una única región en el genoma, las características a cuidar en el diseño de los oligonucleótidos son: temperatura de alineamiento, contenido de GC, repetidos de G o C, extremo 3' de preferencia G o C, compatibilidad entre los oligonucleótidos a utilizarse en el mismo PCR. Los dinucleótidos (dNTPs), condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa).¹⁴² El ciclo del PCR consiste en tres etapas bien definidas: la reacción comienza con el calentamiento de la muestra de DNA a amplificar a 90-95°C para lograr que la molécula de doble cadena de DNA se separe en dos moléculas simple cadena (desnaturalización). Luego se permite el pegado de los iniciadores al DNA molde a temperaturas que pueden variar entre 40-60°C (etapa de pegado de iniciadores o alineamiento). Finalmente, se permite la síntesis enzimática (por medio del uso de la enzima Taq polimerasa) de las nuevas cadenas de DNA a 72°C (proceso llamado extensión). Este ciclo estándar se repite entre 25 y 40 veces usando termocicladores programados para tal propósito,

donde los productos de cada ciclo servirán de molde para los ciclos subsiguientes, esto resulta en la acumulación exponencial de la secuencia blanco, definida por los iniciadores flanqueantes, llegando a sintetizarse millones de copias. Entre las variantes de la PCR existentes, la RT-PCR tiene características muy importantes, ya que detecta transcritos y es un método semicuantitativo de expresión génica. Esta técnica esta acoplada a una transcripción reversa, donde interviene una transcriptasa reversa, para generar una molécula de cDNA, que será utilizado como molde ya que es una molécula mas estable que el RNA.

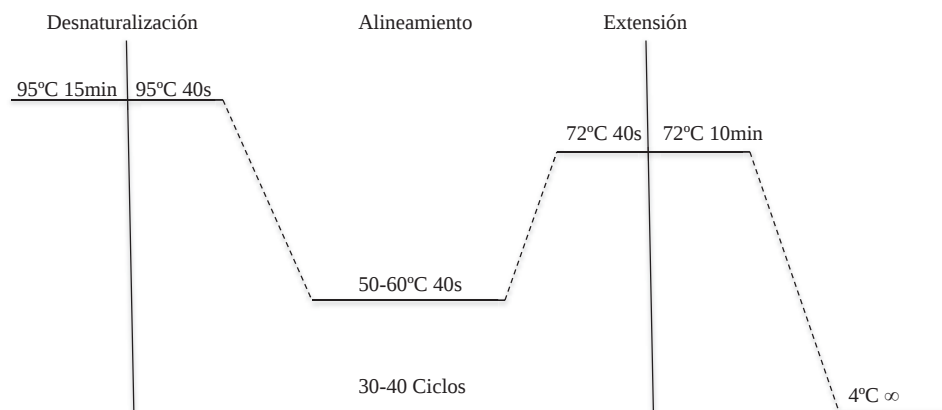


Figura 5. Programa aplicado a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La desnaturalización de DNA es el paso inicial el cual se realiza a una temperatura de 90 a 95°C, en el paso de alineamiento la temperatura y tiempo depende de la cantidad de oligonucleótidos en la reacción y de su T_m (Melting Temperature), la extensión debe realizarse a la temperatura óptima de funcionamiento de la polimerasa de 70 a 75°C y el tiempo depende de la longitud del fragmento amplificado (1min=1000pb). Estos pasos se repiten en ciclo precedidos de una desnaturalización y con una extensión final al concluir el numero de ciclos.

De las variables de la PCR, la cantidad de polimerasa, la concentración de magnesio y las temperaturas de alineamiento son las de mayor peso en la técnica (Tabla 10) y se deben determinar los niveles adecuados en cada PCR diseñado, la determinación de los niveles de estas variables utilizados en el PCR se realiza monitoreando concentraciones y temperaturas, para lo cual se realiza un diseño para el análisis del experimento, este diseño tradicionalmente se realiza analizando experimentalmente los niveles teóricos y variándolos de acuerdo a los resultados que se obtienen, el análisis se puede realizar por un diseño factorial el cual analiza todas las combinaciones posibles de las variables involucradas a los niveles de interés. Recientemente una herramienta del diseño experimental basada en la metodología Taguchi surgió como una alternativa económica y rápida para el análisis simultaneo de variables que influyen en un

proceso o desarrollo de un producto.

Tabla 10. Variables que influyen en la técnica de PCR

Variable	Unidades	Paso crítico
Polimerasa	Unidades de enzima	Extensión o síntesis
Mg ⁺²	Concentración molar	Extensión o síntesis
Oligonucleótidos	Concentración molar	Alineamiento e inicio de síntesis
Temperatura de alineamiento	Grados centígrados	Alineamiento específico
Temperatura de desnaturalización	Grados centígrados	Desnaturalización del DNA
Temperatura de extensión	Grados centígrados	Activación de la polimerasa
Nucleótidos	Concentración molar	Materia prima de síntesis

8. Diseño de experimentos basado en la metodología Taguchi

Los modelos de diseño de experimentos son modelos estadísticos clásicos basados en la experimentación, cuyo objetivo es averiguar y cuantificar si determinados factores influyen en la variable de interés. Es conocido que si se repite un experimento en condiciones indistinguibles, los resultados presentan variabilidad que puede ser grande o pequeña. Si la experimentación se realiza en un laboratorio donde la mayoría de las causas de variabilidad están muy controladas, el error experimental será pequeño y habrá poca variación en los resultados del experimento. Pero si se experimenta en procesos industriales, administrativos, etc., la variabilidad es grande en la mayoría de los casos. El objetivo del diseño de experimentos es estudiar si utilizar un determinado tratamiento produce una mejora en el proceso. Para ello se debe experimentar utilizando el tratamiento y no utilizándolo. Si la variabilidad experimental es grande, sólo se detectará la influencia del uso del tratamiento cuando éste produzca grandes cambios en relación con el error de observación. La metodología del diseño de experimentos estudia cómo variar las condiciones habituales de realización de un proceso empírico para aumentar la probabilidad de detectar cambios significativos en la respuesta, de esta forma se obtiene un mayor conocimiento del comportamiento del proceso de interés. Desde la época de los 40's el Dr. Genichi Taguchi ha introducido una variedad de conceptos estadísticos nuevos los cuales han sido probados y son una herramienta valiosa en la mejora de la calidad. Muchos japoneses han utilizado estos recursos en la mejora de calidad de procesos y productos con un éxito sin precedentes. La calidad de los automóviles japoneses es atribuida en gran medida a la aplicación de la metodología Taguchi.

Esta metodología se diseñó con un enfoque diferente a las practicas convencionales de ingeniería de calidad. Su metodología hace énfasis en el diseño de calidad en procesos y productos, mientras su práctica mas usada se basa en la inspección. En la práctica de mejora de calidad, Taguchi utiliza las herramientas esenciales de la estadística pero el las simplifica identificando un conjunto de directrices (lineamientos) estrictas para el diseño de experimentos y análisis de resultados. Las mejoras de Taguchi han sido extremadamente efectivas en la mejora de calidad de los productos japoneses. Recientemente las industrias occidentales han reconocido a los métodos Taguchi como una herramienta sencilla pero muy útil en la mejora de la calidad de productos y procesos.¹⁴³ Taguchi expone una excelente filosofía para el control de la calidad en las industrias de manufactura. Su doctrina fue creada en un entorno totalmente diferente donde los ingenieros piensan, respira y vive la calidad. Él dio inicio a una nueva cultura de calidad en E.U.A. por ejemplo, Ford Motors Company, ha decretado que todos los ingenieros de Ford Motor han sido entrenados en la metodología Taguchi y sus principios son usados para resolver sus problemas de calidad. Su filosofía ha tenido consecuencias muy grandes, aun cuando esta basada en 3 principios muy simples y fundamentales. Todas las tecnologías y técnicas caen dentro de estas 3 ideas. Los cuales son:

- 1.- La calidad debe ser diseñada sobre el producto y no inspeccionada sobre el.
- 2.- La calidad se mejora minimizando la desviación de un objetivo. El producto debe diseñarse como inmune a los factores ambientales incontrolables.
- 3.- El costo de la calidad debe ser medida en función de la desviación de los estándares y la perdida debe medirse a lo largo del todo el sistema.

Taguchi construye sobre las observaciones de W. E. Deming que el 85% de la falta de calidad es atribuida al proceso de manufactura y solo el 15% se atribuye al trabajador. Por lo tanto ha desarrollado sistemas de manufactura que sean robustos o insensibles a las variaciones ambientales diarias o de temporada, marca de equipo, y otros factores externos. Los 3 principios sobre los que se basa para el desarrollo de estos sistemas, examinan los factores que afectan la calidad del producción y los parámetros específicos del producto.

Taguchi construyo una serie especial de arreglos ortogonales (AO) para diseñar sus experimentos. El uso de cuadros latinos de arreglos ortogonales para el diseño de experimentos

data antes de la segunda guerra mundial. Por la combinación de un cuadro latino ortogonal de una manera única, Taguchi preparo un nuevo set de AOs estándar para ser utilizados en numerosas situaciones experimentales. Un AO comúnmente utilizado para el análisis de factores en 2 niveles se muestra en la tabla 1. Este arreglo, designado como L_8 , es usado para el diseño de experimentos don se deba analizar hasta 7 factores a 2 niveles cada uno. El arreglo se conforma por 8 filas y 7 columnas. Cada fila representa una condición a ensayar con los niveles de los factores indicados por los números en la fila. Las columnas corresponden a los factores específicos en estudio.

Cada columna contiene 4 condiciones al nivel 1 y cuatro al nivel 2 para el factor asignado en la columna. Los 2 niveles del factor puede combinarse en 4 posibilidades, como lo son (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Cuando 2 columnas de un arreglo tienen el mismo numero de combinaciones posibles, se dice que la columna esta balanceada ortogonalmente. Así el arreglo ortogonal L_8 , en cado par de columnas tienes el mismo numero de las posibles combinaciones (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Por lo tanto, las 7 columnas del arreglo son ortogonales una de otra.

Los AO facilitan el proceso del diseño de experimentos. Para llevar a cabo el diseño de un experimento se debe seleccionar el arreglo que sea el mas adecuado para cada experimento, asignar cada factor a la columna apropiada, y finalmente, describir las condiciones experimentales para cada experimento individual llamadas condiciones de ensayo. Así que en un AO L_8 , cada fila representa cada uno de los ensayos necesarios para completar el experimento. La descripción de cada experimento se observa por los números 1 y 2. En un diseño factorial se requiere 2^7 o 128 corridas experimentales, pero podría no generar información relevante extra a la obtenida por el AO L_8 .¹⁴⁴ El arreglo obliga a todos los experimentadores a diseñar casi experimentos idénticos. Los experimentadores pueden seleccionar diferente designación para las columnas pero las 8 corridas experimentales podrían incluir todas las combinaciones independientes de cada columna definida. Así los AOs aseguran consistencia en el diseño por experimentadores diferentes (Figura 6).

A Arreglo Ortogonal L8							
Variable	1	2	3	4	5	6	7
Ensayo	A	B	C	D	E	F	G
T1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	2	2	2	2
T3	1	2	2	1	1	2	2
T4	1	2	2	2	2	1	1
T5	2	1	2	1	2	1	2
T6	2	1	2	2	1	2	1
T7	2	2	1	1	2	2	1
T8	2	2	1	2	1	1	2

B Factorial 2 ⁷ =128 ensayos											
EXPERIMENTO FACTORIAL COMPLETO				A1				A2			
				B1		B2		B3		B4	
				C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
D1	E1	F1	G1	T1							
			G2								
		F2	G1								
			G2			T3					
	E2	F1	G1								
			G2					T5			
		F2	G1							T7	
			G2								
D2	E1	F1	G1								
			G2							T8	
		F2	G1					T6			
			G2								
	E2	F1	G1			T4					
			G2								
		F2	G1								
			G2	T2							

Figura 6. Comparación de un arreglo ortogonal L_8 contra una factorial 2^7 . (A) AO L_8 corridas necesarias para el análisis de un experimento que involucre 7 variables a 2 niveles cada una. (B) Ensayos necesarios en un diseño factorial completo 2^7 , se muestra la distribución que corresponde a los ensayos del arreglo ortogonal L_8

En la metodología Taguchi los resultados de los experimentos son analizados para lograr uno o mas de los siguientes objetivos:

- 1.- establecer la condición óptima para un producto o un proceso
- 2.-estimar la contribución de los factores individuales
- 3.- estimar la respuesta bajo condiciones optimas

La condición óptima es identificada por el estudio de los efectos principales de cada factor. El proceso involucra manipulación aritmética menor de los resultados y usualmente pueden realizarse con la ayuda de una calculadora simple. Los efectos principales indican la tendencia general de la influencia de los factores. Conociendo las características, por ejemplo,- se puede saber si un valor alto o bajo producen el resultado preferido, se predice el nivel que se ocupa de cada factor para obtener el mejor resultado.

El conocimiento de la contribución de cada factor individual es una llave para decidir la

naturaleza del control que se tiene que llevar a cabo para un proceso de producción. El análisis de varianza (ANOVA o ANDEVA) es la herramienta estadística comúnmente mas aplicada a los resultados de experimentos para determinar el porcentaje de contribución de cada factor. El estudio con un análisis ANOVA ayuda a determinar cuales factores necesitan control y cuales no. Una vez determinada la condición óptima es una practica sana una corrida de comprobación experimental.¹⁴⁵ Dentro de la biología la utilización de la metodología Taguchi a resultado atractiva en varios campos de la biotecnología como son: alimentos, para estandarizar procesos como fermentaciones industriales, biología molecular, tratamiento de aguas residuales, bioremediación y en el campo de la salud,¹⁴⁶ su utilización en la estandarización de técnicas diagnosticas para la identificación de marcadores moleculares no ha sido utilizada pero resulta una metodología muy atractiva para comprobarse si es efectiva en este campo de análisis.

IV. ANTECEDENTES

La policitemia vera, la mielofibrosis primaria (o idiopática), la trombocitosis esencial y la leucemia mieloide crónica suelen reunirse bajo la denominación común de procesos mieloproliferativos crónicos porque su fisiopatología depende del crecimiento clonal expansivo de una célula progenitora hematopoyética pluripotencial, dando como resultado la sobreproducción de uno o varios elementos formadores de la sangre¹. Estas entidades pueden transformarse en una leucemia aguda de forma espontánea o como consecuencia de un tratamiento con poder mutágeno. Ahora bien, así como la policitemia vera, la mielofibrosis idiopática, la trombocitosis esencial y la LMC poseen fenotipos característicos parecidos, la LMC es genotípicamente distinta, ya que en esta se distingue el intercambio de material genético entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 induciendo la formación de la proteína de fusión *BCR-ABL1*.¹⁴⁷

La identificación del gen de fusión *BCR-ABL1* en 1985 marcó el comienzo de una nueva era en el conocimiento de las bases moleculares de la LMC. En el 2005 el descubrimiento de la mutación *JAK2V617F* y su relación con las NMP redefinió los criterios mayores de diagnóstico en la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides del 2008.

La utilización de la metodología Taguchi en la detección de marcadores moleculares asociados a neoplasias mieloproliferativas no está reportada, sin embargo su utilización en el campo de la biología ha generado resultados muy favorables.¹⁴⁸ Resulta atractivo implementar el diseño de experimentos basado en la metodología Taguchi usando arreglos ortogonales para llegar a condiciones óptimas en la detección de los marcadores moleculares por la técnica de PCR.

V. JUSTIFICACIÓN

El estudio citogenético de cariotipo es el “estándar de oro” para dar seguimiento al tratamiento de los pacientes con LMC-filadelfia positivos, una vez alcanzada la respuesta citogenética completa (RCC), el estudio molecular es el único método que nos permite detectar los niveles de enfermedad residual. Para ello, se han desarrollado técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual se amplifica el transcrito de fusión *BCR-ABL1*. Si tenemos en cuenta que en la actualidad más de un 80% de los pacientes tratados con inhibidores de tirosincinasa (ITK) alcanzan una RCC, se hace necesario introducir en la práctica de rutina del laboratorio paneles de prueba moleculares que nos permitan medir las respuestas individuales al tratamiento. Se ha evidenciado que en pacientes que alcanzan RCC, el nivel del transcrito *BCR-ABL1* sigue disminuyendo con el tiempo, incluso en algunos casos hasta pasados tres años de la obtención de la respuesta citogenética completa.⁶

Por otra parte, el estudio de las mutaciones en el gen *JAK2* ha tenido un gran impacto en la aproximación diagnóstica a las NMP, en especial la PV, y constituye un gran avance en el conocimiento fisiopatológico de las mismas. La mutación *JAK2V617F* se ha convertido en el primer marcador biológico independiente, junto a los factores pronósticos convencionales para PV, TE y MFP. El estudio de la mutación *JAK2V617F* debe incluirse como prueba inicial en el estudio de enfermos con poliglobulia. Tefferi y colaboradores¹ proponen un algoritmo para el diagnóstico diferencial, donde los primeros pasos son el estudio de la mutación y la determinación de los niveles de EPO sérica. El estudio de las mutaciones del exón 12 estaría indicado en aquellos casos en que no se detectara la mutación *JAK2V617F* y los niveles de EPO fueran normales o bajos. La BMO se recomienda en todos los casos para confirmación.^{1, 2}

Conociendo los marcadores moleculares más sólidos para el diagnóstico diferencial de NMP (mutaciones del gen *JAK2* y el gen de fusión *BCR-ABL1*), el presente proyecto estableció y validó un panel diagnóstico para su detección usando como método de análisis un diseño experimental basado en arreglos ortogonales.

VI. HIPOTESIS

La aplicación de la metodología Taguchi permite la estandarización de una prueba molecular para la identificación de los marcadores moleculares *BCR-ABL1* y mutación *JAK2V617F* asociadas a NMP.

VII. OBJETIVOS

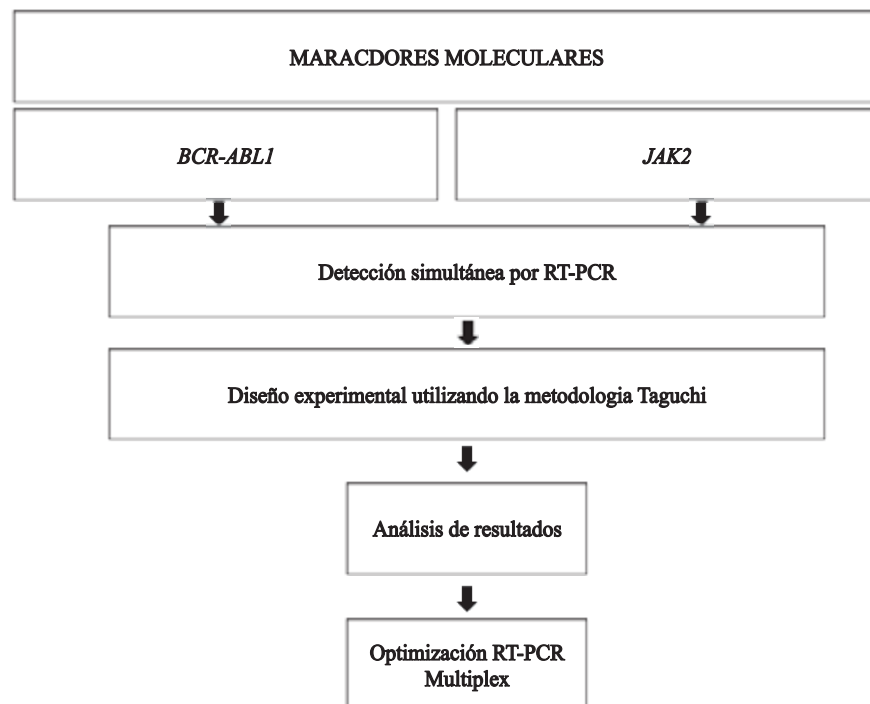
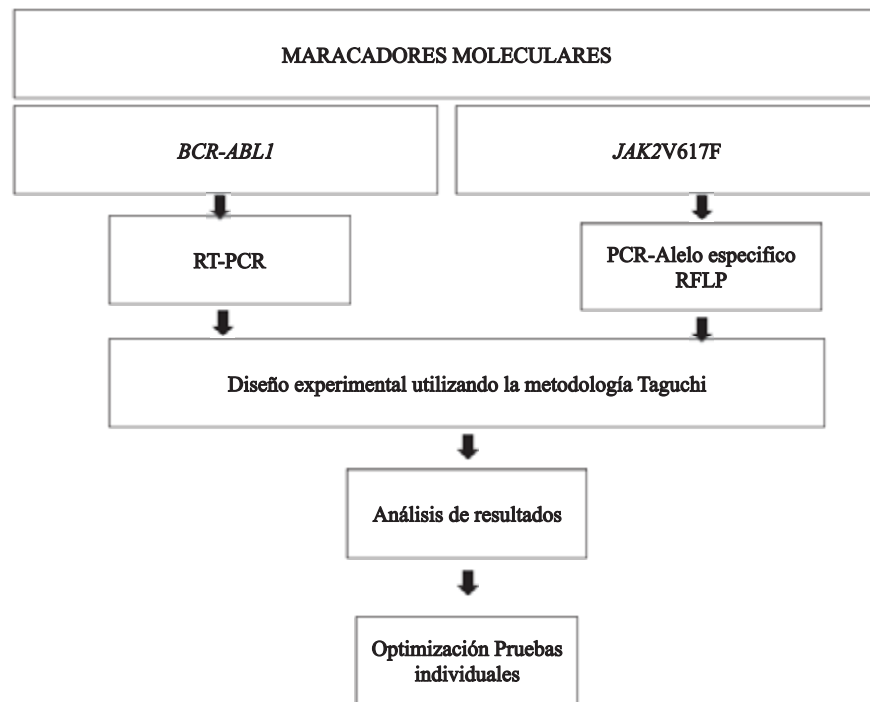
1. *Objetivo general*

Establecer un panel de pruebas basado en la técnica de la PCR para la determinación de marcadores moleculares asociados a neoplasias mieloproliferativas (NPM) clásicas y su aplicación en la práctica de diagnóstico por laboratorio.

2. *Objetivos específicos*

- a. Evaluar la aplicación de la Metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales en la identificación de los marcadores moleculares *BCR-ABL1* y la mutación *JAK2V617F*.
- b. Desarrollar un panel molecular estandarizado para la identificación simultanea del gen de fusión *BCR-ABL1* y las mutaciones en el gen *JAK2* mediante RT-PCR aplicando la metodología Taguchi.

VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IX. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Manipulación de ácidos nucleicos

1.1. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de RNA total de las células sanguíneas se llevo a cabo utilizando el QIAamp RNA Blood Mini Kit® de QIAGEN® de acuerdo a las especificaciones del proveedor; brevemente: la muestra (sangre o médula ósea) se sometió a una lisis selectiva de eritrocitos adicionando 5ml de buffer EL. Los leucocitos se recuperan por centrifugación y se cuantificaron a través de observación microscópica. A una cantidad de $1-1.5 \times 10^7$ leucocitos se adicionó el buffer de lisis RLT, el lisado se colocó en una columna QIAshredder® y se centrifugó para eliminar los restos celulares. Al filtrado se le agregó etanol al 70% libre de RNAsas y la mezcla se colocó en una columna QIAamp®. El filtrado producto de la centrifugación se eliminó y la columna se lavó con el buffer AW1 y se trató con DNAsa. El RNA se lavó dos veces con el buffer RPE y se recuperó por centrifugación adicionando 30 μ L de agua libre de RNAsas. Las muestras de RNA así obtenidas se guardaron a -20°C hasta su uso.

La extracción del DNA total de las células sanguíneas se llevó a cabo utilizando el QIAamp DNA Blood Mini Kit® de QIAGEN® de acuerdo a las especificaciones del proveedor, el proceso consistió en una lisis celular de la muestra, (médula ósea o sangre periférica) aproximadamente $1-1.5 \times 10^7$ leucocitos, con buffer AL. A la mezcla se adicionó etanol absoluto y se colocó en una columna QIAamp®, se centrifugó para desechar restos celulares y se lavó con buffer AW. Se realizó un segundo lavado al DNA con el buffer AW2 y se recuperó el DNA por centrifugación agregando buffer AE. Finalmente el DNA se cuantificó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Los productos de amplificación se extrajeron de los geles de agarosa de acuerdo a las especificaciones del proveedor (QIAEX II® Gel Extraction Kit de QIAGEN®). El producto de amplificación separado por electroforesis en gel de agarosa se corta con un bisturí, el bloque de agarosa se colocó en un tubo eppendorf, se agregó buffer QX1 y sílice QIAEX®. La agarosa se solubilizó y la muestra se centrifugó eliminando el sobrenadante. El sílice se lavó primeramente con buffer QX1 y posteriormente con el buffer PE. Finalmente se adicionó agua libre de nucleasas para recuperar el producto.

1.2. Cuantificación y análisis de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro BioPhotometer Eppendorf®.

Las muestras de ácidos nucleicos se analizaron por electroforesis en geles de 1.5 a 2% de agarosa invitrogen®, en buffer TBE 1x (Tris-Borax-EDTA invitrogen®). El gel se visualizó tiñéndolo con una solución de bromuro de etidio al 0.01% y documentando la imagen en un fotodocumentador Applied biosystem®.

2. Transcripción reversa (RT)

La transcripción reversa se realizó utilizando 0.5 a 1 µg de RNA y 4U de Transcriptasa Reversa OMNISCRIPT QIAGEN®, de acuerdo a las especificaciones del proveedor, se incubó a 37°C 60min, obteniendo así cDNA para su uso.

3. PCR acoplado a transcripción reversa para la detección de transcritos *BCR-ABL1*

El transcrito de fusión *BCR-ABL1* en sus diferentes variantes se detectaron utilizando los oligonucleótidos de la tabla 11.¹⁴⁹ Adicionalmente y como control de reacción se sintetizaron los oligonucleótidos para la amplificación de *B2M* (Tabla 12).

Tabla 11. Oligonucleótidos para las variantes del transcrito *BCR-ABL1*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm °C	PB	Región de alineamiento
BC-B1A	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC	53.6	22	Gen <i>BCR</i> exón 12
BC-E1A	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	56	21	Gen <i>BCR</i> exón 1
AB-A3B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	56.9	21	Gen <i>ABL1</i> exón 3

Oligonucleótidos diseñados y analizados con los software CLC 6.0 y OLIGOANALIZER 1.2

Tabla 12. Oligonucleótidos para el transcrito *B2M*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm °C	PB	Región de alineamiento
<i>B2M-F</i>	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT	63.5	24	Gen <i>B2M</i> exón 1
<i>B2M-R</i>	TGCCAGCCCTCCTAGAGCTACC	63	22	Gen <i>B2M</i> exón 4

Oligonucleótidos diseñados y analizados con los software CLC 6.0 y OLIGOANALIZER 1.2

Las variables que se muestran en la Tabla 13 fueron las analizadas por la metodología Taguchi para la optimización de la prueba, incluyó la aplicación de las matrices establecidas para el arreglo ortogonal (AO) L_{12} .

Tabla 13. Variables analizadas en la detección de transcritos *BCR-ABL1*

Clave	A	B	C	D	E	F	G	H
Variables	M Mix μl	Oligonucleótidos					Temp A ° C	Ciclos
		BC-B1A μM	BC-E1A μM	AB-A3B μM	B2M-F nM	B2M-R nM		
Nivel bajo (1)	10	0.4	0.4	0.4	40	40	54	30
Nivel alto (2)	12.5	08	0.8	0.8	80	80	57	35

M Mix :Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®

Temp A: Temperatura de alineamiento

4. PCR-alelo específico para la detección de la mutación *JAK2V617F*

Para la detección de la mutación *JAK2V617F* se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 14.¹⁵⁰ El oligonucleótido *JAK2F* es alelo específico para detectar *JAK2V617F*, simultáneamente se amplifica una región control del intron 13 al intron 14 (364pb) del gen *JAK2* usando los oligonucleótidos *JAK2F/IC* y *JAK2R* como control interno de la reacción.

Tabla 14. Oligonucleótidos para la mutación *JAK2V617F*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm	PB	Región de alineamiento
<i>JAK2F</i>	AGCATTGGTTTAAATTATGGAGTATATT	52.5	30	Gen <i>JAK2</i> exón 14
<i>JAK2F/IC</i>	ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG	55.9	30	Gen <i>JAK2</i> intron 13
<i>JAK2R</i>	CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA	56.7	30	Gen <i>JAK2</i> intron 14

Oligonucleótidos diseñados y analizados con los software CLC 6.0 y OLIGOANALIZER 1.2

Las variables que se muestran en la Tabla 15 fueron las analizadas por la metodología Taguchi para la optimización de la prueba, incluyó la aplicación de las matrices establecidas para el arreglo ortogonal (AO) L_{12} .

Tabla 15. Variables analizadas en la detección de la mutación *JAK2V617F*

Clave	A	B	C	D	E	F	G	H
Variable	M Mix μL	DNA μg	Oligonucleótidos			Temp A °C	Ciclos	Laboratorista
			F μM	F/IC μM	R μM			
Nivel bajo (1)	10	0.3	0.24	0.2	0.4	57	30	Sin experiencia
Nivel alto (2)	12.5	05	0.48	0.4	0.8	58	35	Con experiencia

M Mix :Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®, Temp A: Temperatura de alineamiento

5. Determinación de la variante alélica de la mutación *JAK2V617F*

La mutación *JAK2V617F* se presenta de manera homocigota y heterocigota, se utilizó la técnica RFLP (restriction fragment length polymorphism) para determinarla, sometiendo a la acción de la endonucleasa Bas XI el amplicon de 364pb del gen *JAK2* obtenido a partir de los oligos *JAK2F/IC* y *JAK2R*. Se realizaron ensayos para determinar los parámetros adecuados de digestión total del amplicon en los casos donde la mutación no este presente, generando 2 fragmentos: 203pb y 161pb.¹⁵¹ Las variables analizadas y los niveles de estudio se muestran en la Tabla 16, las corridas experimentales se obtuvieron utilizando la matriz descrita para el AO *L₄*.

Tabla 16. Variables analizadas para la variante alélica de *JAK2V617F*

Clave	A	B	C
Variable	Cantidad de amplicon μl	Minutos de digestión	Unidades de Enzima
Nivel de estudio bajo (1)	5	30	0.8
Nivel de estudio alto (2)	7.5	45	01

6. PCR acoplado a transcripción reversa para detectar transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*

La detección de los transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2* se realizó por un PCR multiplex acoplado a una RT. Los oligonucleótidos utilizados para detectar las variantes de transcritos del gen de fusión *BCR-ABL1* se muestran en la Tabla 17.¹⁵² Los oligos para detectar la mutación *JAK2V617F* y los utilizados para la amplificación de transcritos silvestres del gen *JAK2* se muestran en la Tabla 18.

Tabla 17. Oligonucleótidos para las variantes del transcrito *BCR-ABL1*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm °C	PB	Región de alineamiento
BC-B2C	CAGATGCTGACCAACTCGTGT	57.4	21	Gen <i>BCR</i> exón 13
AB-A3D	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA	53.4	23	Gen <i>ABL1</i> exón 3

Tabla 18. Oligonucleótidos para *JAK2V617F* y wt *JAK2*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm °C	PB	Región de alineamiento
<i>JAK2</i> F/IC e11	GTTACCAGATGGAACTGTTTCG CTCAGACA	61.5	30	Gen <i>JAK2</i> exón 11
<i>JAK2</i> F e14	AGCATTTGGTTTAAATTATGG AGTATATT	52.5	30	Gen <i>JAK2</i> exón 14
<i>JAK2</i> R e16	TGTCTTCCTGTCTTCTTCTCTGA TAAGCAG	59.2	30	Gen <i>JAK2</i> exón 16
<i>JAK2</i> R WT e14	TGAACCAGAATATTCTCGTCTC CACAGAC	59.7	30	Gen <i>JAK2</i> exón 14

Oligonucleótidos diseñados y analizados con los software CLC 6.0 y OLIGOANALIZER 1.2

Las variables analizadas por medio de la metodología Taguchi en los ensayos que se realizaron desarrollando el AO L_{12} se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Variables analizadas en la detección de transcritos *BCR-ABL1* y

Clave	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Variable	M Mix μl	Tiem A seg	Temp A °C	Oligonucleótidos					
				BC-B2C μM	AB-A3D μM	<i>JAK2</i> F e14 μM	<i>JAK2</i> R e16 μM	<i>JAK2</i> R WT e14 μM	<i>JAK2</i> F/IC e11 μM
Nivel bajo (1)	10	50	57	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Nivel alto (2)	12.5	90	58	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

M Mix :Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®,Tiem A: Tiempo de alineamiento, Temp A: Temperatura de alineamiento

7. Secuenciación

Los productos de PCR se purificaron kit QIAEX II® Gel Extraction Kit de QIAGEN® y se realizó su secuenciación por el método de Sanger, con la finalidad de detectar posibles mutaciones en los exones 12 y 13 del gen *JAK2*, que son asociadas al desarrollo de NMP.

8. Análisis de resultados por la Metodología Taguchi

Los resultados obtenidos de cada diseño experimental se analizaron por medio de un ANOVA (analyze of variance) resuelto por mínimos cuadrados. Las matrices de los experimentos realizados se obtuvieron descargando las variables y los niveles de estudio a las matrices de los

arreglos ortogonales L_{12} y L_4 (Tabla 20 y 21). Las formulas utilizadas para realizar los cálculos necesarios para el análisis por la metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales y resuelto por ANOVA se muestra en la Tabla 22.

Tabla 20. Matriz del arreglo ortogonal L_4

Variables	A	B	C
Ensayo			
T1	1	1	1
T2	1	2	2
T3	2	1	2
T4	2	2	1

Tabla 21 Matriz del arreglo ortogonal L_{12}

Variables	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Ensayo											
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
T3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
T4	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2
T5	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1
T6	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1
T7	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1
T8	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2
T9	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1
T10	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2
T11	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2
T12	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2	1

Tabla 22. Formulas utilizadas en los cálculos para el análisis de los datos

Formula	Descripción
$Fi = \frac{(\sum F_i)}{N}$	Promedio de los factores, se usa para obtener la sumatoria de los efectos de cada variable a sus diferentes niveles
$SSF = \frac{(F_2 - F_1)^2}{N}$	Suma de cuadrados
$MS = \frac{SSF}{gl}$	Cuadrado medio
$F0 = \frac{MSi}{MSerror}$	F calculada, se utiliza para obtener el estadístico de cada factor y representa el índice de variación respecto al error
$Yest = \bar{y} + \sum Eff_i$	Y estimada, indica la predicción de Y con los valores considerados como óptimos para cada variable

X. RESULTADOS

1.Utilización de la metodología Taguchi en la optimización de técnicas de identificación de marcadores moleculares

1.1 PCR acoplado a transcripción reversa para la detección de transcritos BCR-ABL1

El marcador molecular *BCR-ABL1* es patognomónico de la NMP leucemia mieloide crónica, el cual puede generar varios transcritos dependiendo del sitio de ruptura y fusión de los genes (b2a2, b3a2, b3a3, b2a3) originando una proteína quimérica (p210 de 210kDa). Para el análisis de las variables que influyen en la detección de este marcador por RT-PCR se cuantificó el DNA amplificado como variable de respuesta. Con este parámetro se realizó el análisis de los índices de variación de cada factor que intervine en la identificación de los transcritos *BCR-ABL1*, donde las variables analizadas fueron 8 ensayadas a 2 niveles (Tabla 13). La matriz de ensayos se obtuvo al descargar las variables y sus correspondientes niveles de estudio en el AO L_{12} , la cuantificación de DNA amplificado final de cada ensayo realizado se muestra en la tabla 23. Los porcentajes de contribución y el estadístico F (F de Taguchi o índice de variación) de cada variable y el error de la prueba se enlistan en la Tabla 24.

Tabla 23. Cantidad de DNA amplificado de los transcritos *BCR-ABL1*

Ensayo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
DNA µg/mL	18.5	20.6	21.1	16.1	21.8	20.9	13.9	17.7	16.3	13.4	17.2	18.8

T= ensayo (trial)

Tabla 24. Contribución de las variables para los transcritos *BCR-ABL1*

Clave	Variable	F	% de contribución
A	Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®	8.73	46.005
B	BC-B1A	0.00113	0.00586
C	BC-E1A	0.0313	0.165
D	AB-A3B	0.5211	2.74
E	B2M-F	0.988	5.205
F	B2M-R	2.99	15.757
G	Temperatura de Alineamiento °C	0.00167	0.00879
H	Ciclos	2.717	14.303
e	Error	1	15.804 ^a

a) Grado de confianza de la prueba

El análisis electroforético de los productos obtenidos en los ensayos realizados para la optimización en la detección de los transcritos *BCR-ABL1*, donde los amplificados de 417pb corresponden a la variante b3a2 del transcrito *BCR-ABL1*, los de 342pb corresponden a la variante b2a2 del transcrito *BCR-ABL1* y los de 592pb corresponden a una región del transcrito del gen *B2M* (beta-2-microtubulina) usado como control interno de la reacción se muestran en la figura 8.¹⁵³

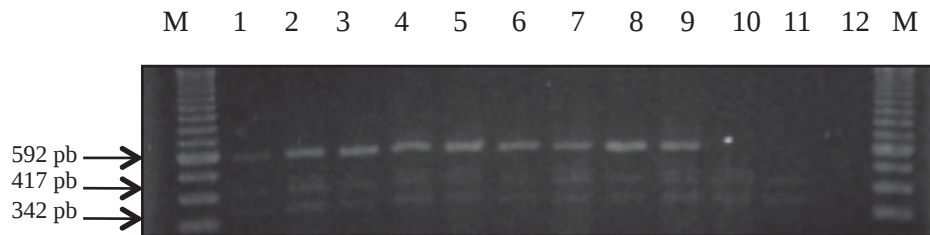


Figura 8. Análisis electroforético de los productos de amplificación para el ensayo de detección de transcritos *BCR-ABL1*. Los amplicones obtenidos de cada uno de los ensayos del arreglo ortogonal L12 (1-12) fueron separados en un gel de agarosa al 1.8%. Los transcritos corresponden a las fusiones b2a2 (342pb), b3a2 (417pb) y del gen *B2M* (592pb). (M) marcador de peso molecular de 100pb.

1.2 PCR-alelo específico para la detección de la mutación *JAK2V617F*.

En el análisis para determinar los índices de variación de cada factor que influye en la detección de la mutación *JAK2V617F* por la técnica de PCR alelo específico se utilizaron como parámetro cuantificable las concentraciones de DNA amplificado. Se examinaron 8 variables simultáneamente a 2 niveles cada una (Tabla 18). La matriz de ensayos se obtuvo descargando las variables y sus correspondientes niveles de estudio en el AO L_{12} , la cuantificación de DNA amplificado final de cada ensayo realizado se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Cuantificación de DNA amplificado para la detección de *JAK2V617F*

Ensayo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
DNA µg/mL	10.9	13.6	8.0	14.6	13.2	10.9	15.9	15.5	17.2	16.8	14.9	13.0

T= ensayo (trial)

Estas concentraciones se usaron para determinar los porcentajes de contribución y el estadístico F (F de Taguchi, índice de variación) de cada variable y el error de cada prueba (Tabla 26).

Tabla 26. Contribución de las variables para la detección de *JAK2V617F*

Clave	Variable	F	% de contribución
A	Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®	16.54	50.06
B	DNA molde	0.1788	0.541
C	<i>JAK2F</i>	0.5152	1.55
D	<i>JAK2F/IC</i>	0.0762	0.23
E	<i>JAK2R</i>	0.07662	0.23
F	Temperatura de Alineamiento °C	1.34	4.068
G	Numero de Ciclos	0.211	0.639
H	Técnico de laboratorio	11.097	33.57
e	Error	1	9.10 ^a

a) Grado de confianza de la prueba

Como se describe en materiales y métodos se realizó el análisis electroforético de los ensayos descritos en la matriz del arreglo ortogonal L_{12} , los amplificados de 203pb indican la presencia de la mutación *JAK2V617F* y los amplificados de 364pb corresponden a una región del gen *JAK2* entre el intron14 y el intron 15 (Figura 7) esto se realizó como comprobación de amplificación específica de las regiones de interés.¹⁵⁴

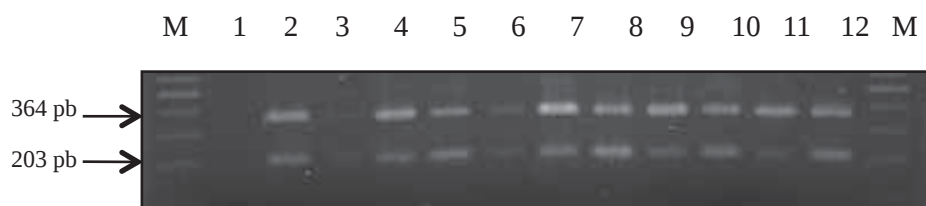


Figura 9. Análisis electroforético de los productos de amplificación para el ensayo de detección de la mutación *JAK2V617F*. Los amplicones obtenidos de cada uno de los ensayos del arreglo ortogonal L_{12} (1-12) fueron separados en un gel de agarosa al 1.8%. Los amplificados corresponden a la mutación *JAK2V617F* (203pb) y al control interno del gen *JAK2* (364pb). (M) marcador de peso molecular de 100pb.

1.3 Determinación de la variante alélica de la mutación *JAK2V617F*

Se realizó el análisis de las variables que afectan la identificación de la mutación *JAK2V617F* en su forma homocigota o heterocigota por la técnica RFLP, la enzima de restricción usada fue

BsaXI que reconoce la secuencia 5'-AAATTATGGAGTATGTGTCTGTGGAGACGA-3' del exón 14 del gen JAK2 donde tiene lugar la mutación JAK2V617F. Las variables analizadas fueron la cantidad de endonucleasa BsaXI, el tiempo de digestión y cantidad de amplificado a digerir (Tabla 19). Los productos de digestión se analizaron por electroforesis. Los productos amplificados, de 364pb corresponden a la región del intron 14 al intron 15 del gen JAK2, los de 203pb y 161pb son resultado de la digestión del fragmento de 364pb por de BsaXI, se ilustran en la Figura 10.



Figura 10. Análisis por electroforesis de los productos de digestión por RFLP de JAK2. Los fragmentos de DNA producto de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%, control (1); JAK2V617F (+) (2, 3 y 4), los productos de 364pb corresponde al amplificado sin digerir del gen JAK2 indicando la presencia de la mutación, los productos de 203 y 161 son el resultado de la digestión por BsaXI. Marcador de peso molecular 100pb (M).

Para este caso el análisis estadístico se realizó utilizando como parámetro cuantificable la resolución de bandas en el gel de electroforesis (variable cualitativa), de acuerdo a la tabla 27.

Tabla 27. Escala de valores para la comparación de ensayos de electroforesis

Definición de bandas en el gel de agarosa	Valor asignado
Óptima	5
Buena	4
Regular	3
Mala	2
Pésima	1

El análisis estadístico nos arrojó el resultado que ninguna variable contribuye significativamente en la digestión del producto de 364pb del gen JAK2.

2. PCR acoplado a transcripción reversa para detectar transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*

Para realizar la detección simultanea de la mutación *JAK2V617F* y el transcrito *BCR-ABL1* se diseñaron oligonucleótidos específicos para la detección de transcritos del gen *JAK2* que sirvieron como controles internos de la reacción y para detectar el transcrito con la mutación *JAK2V617F* (Tabla 18). Las regiones de alineamiento de estos oligos se muestran en la Figura 11.

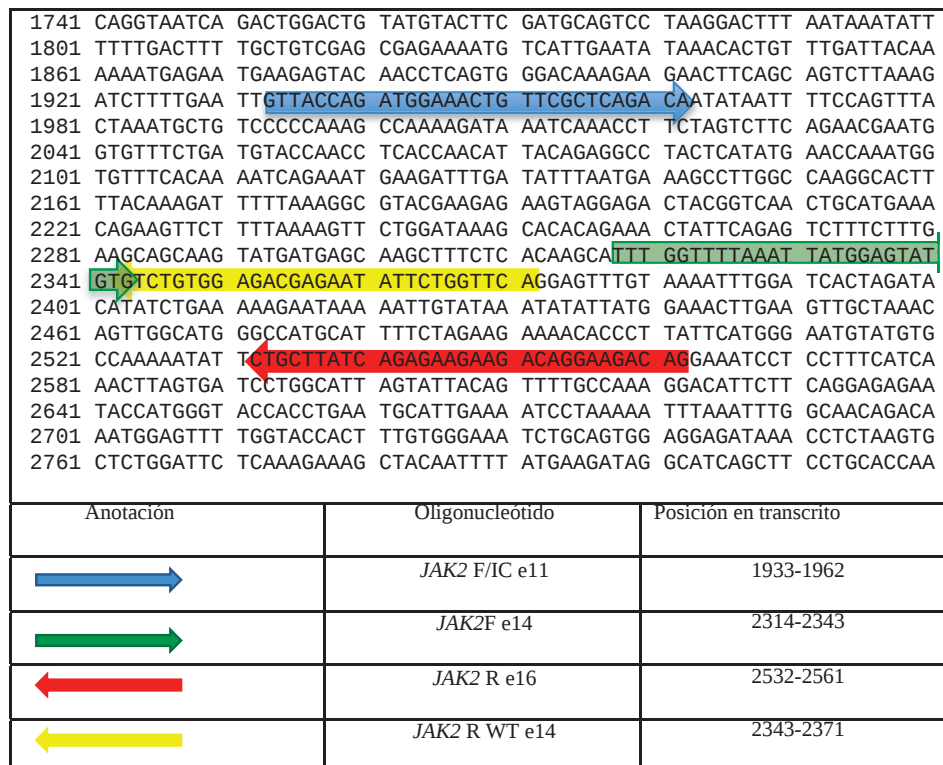


Figura 11. Región de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los transcritos *JAK2*. Regiones de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados para la detección de transcritos de interés en el gen *JAK2*, su longitud en pb y su ubicación en el transcrito *JAK2*.

A partir de la secuencia de cDNA analizada se esperan fragmentos de amplificación compatibles entre los transcritos de *BCR-ABL1* y *JAK2*, los cuales pueden ser analizados por electroforesis convencional. En la figura 12 se ilustra en gel virtual de los amplificadores donde se muestran la distribución en el gel de electroforesis de los amplificadores esperados en una muestra positiva al transcrito *BCR-ABL1* p210^{b2a2,b3a2}, una muestra positiva a la mutación *JAK2V617F* heterocigota y una muestra positiva a ambas mutaciones.

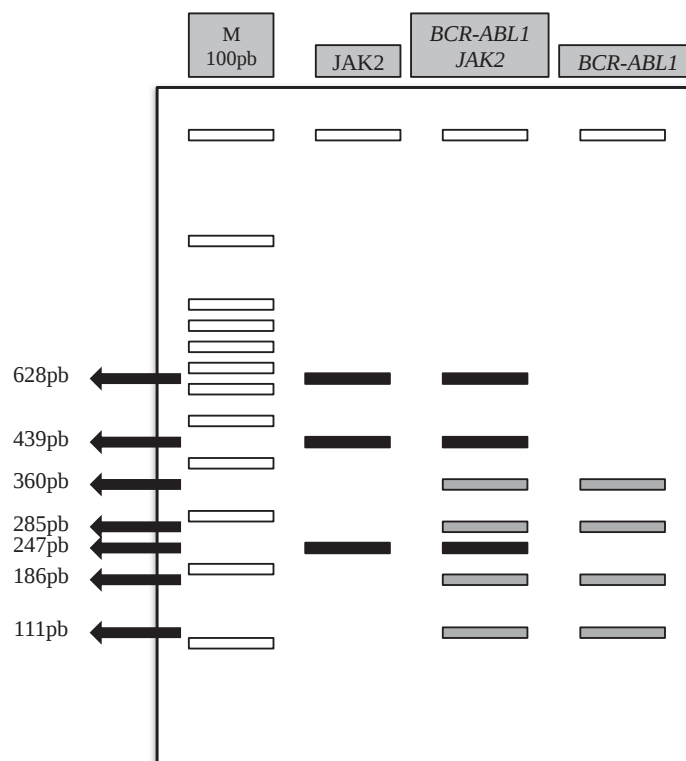


Figura 12. Productos de amplificación esperados en la detección simultanea de transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*. En bandas negras se muestran los posibles productos de amplificación de los transcritos *BCR-ABL1* (b2a2-285pb, b3a2-360pb, b3a3-186pb, b2a3-111pb), en bandas grises se muestran los transcritos *JAK2* (*JAK2V617F*-245pb, *JAK2V617F*-439pb, *JAK2* exones 11-16- 628pb) y en bandas blancas se muestran el marcador de 100pb.

Las variables utilizadas en el desarrollo de la prueba que detectó la presencia de cualquier variante p210 del transcrito *BCR-ABL1* y la mutación *JAK2V617F*, además de la amplificación de un control interno del gen *JAK2* (exones 11-16) y el amplificado *JAK2V617F* que sirvió para discernir entre la presencia de la mutación *JAK2V617F* de manera homocigota o heterocigota se enlistaron en la Tabla 19. Se realizó el análisis de los ensayos del AO L_{12} utilizando 3 muestras de cDNA distintas: muestra positiva a *BCR-ABL1* p210^{b2a2}, muestra positiva a mutación *JAK2V617F* heterocigota y muestra negativa a *BCR-ABL1* y *JAK2V617F*. La cuantificación de DNA amplificado de cada ensayo realizado se presentan en la Tabla 28. Estas concentraciones son el parámetro cuantificable que se usó para determinar los porcentajes de contribución y el estadístico F (F de Taguchi, índice de variación) de cada variable y el error de cada prueba (Tabla 29, Tabla 30 y Tabla 31).

Tabla 28. DNA amplificado en la detección de transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*

Ensayo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
DNA ^a µg/mL	18	17.4	21.4	14.1	19.4	19.1	29.8	22	23.6	18.4	19.4	20.4
DNA ^b µg/mL	15.8	18.5	24.3	20.3	23.8	20	22.5	20.6	22.7	23	17.8	22.9
DNA ^c µg/mL	15.4	16.7	19	16.1	10.7	13	23.2	16.2	17.2	20.1	15	16.2

a.- muestra utilizada negativa, b.- muestra positiva a *BCR-ABL1* p210b^{2a2}, c.- muestra positiva a *JAK2*V617F

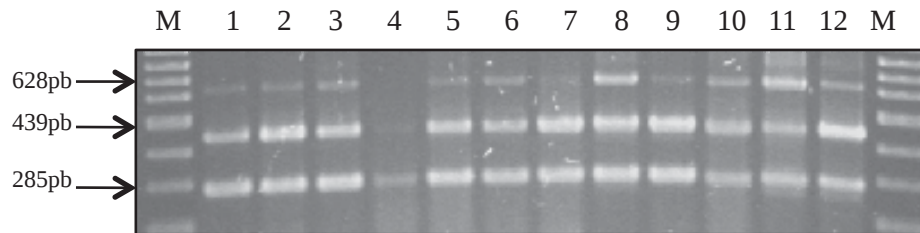


Figura 13. Productos de amplificación de los transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*V617F. Electroforesis de los ensayos realizados, utilizando una muestra positiva a *BCR-ABL1* p120^{b2a2}, descritos en el arreglo ortogonal L_{12} (1-12). Los amplificados de 285pb corresponden a los transcritos *BCR-ABL1* b2a2, los amplificados de 628pb corresponden al transcrito del gen *JAK2* (exones 11-16) y los amplificados de 439pb corresponden al transcrito silvestre *JAK2*V617F. Marcador de peso molecular 100pb (M).

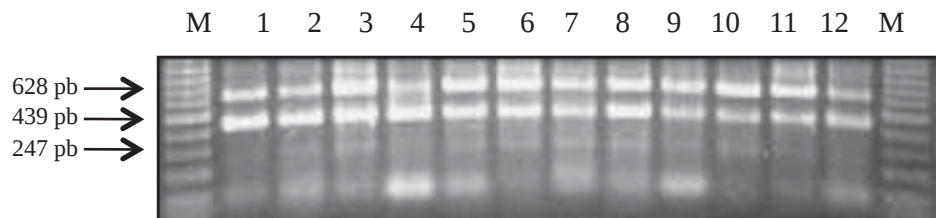


Figura 14. Productos de amplificación de los transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*V617F. Electroforesis de los ensayos realizados, utilizando una muestra positiva a *JAK2*V617F, descritos en el arreglo ortogonal L_{12} (1-12). Los amplificados de 247pb corresponden al transcrito *JAK2*V617F, los amplificados de 628pb corresponden al transcrito del gen *JAK2* (exones 11-16) y los amplificados de 439pb indican la presencia del transcrito *JAK2*V617F. Marcador de peso molecular 100pb (M).

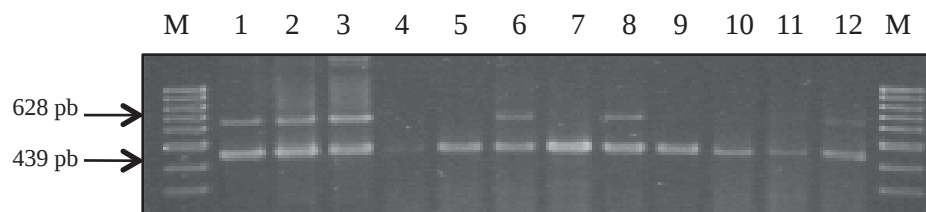


Figura 15. Productos de amplificación de los transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2V617F*. Electroforesis de los ensayos realizados, utilizando una muestra negativa a *BCR-ABL1* y *JAK2V617F*, descritos en el arreglo ortogonal L_{12} (1-12). Los amplificados de 628pb corresponden a un transcrito del gen *JAK2* entre el exón 11 y el exón 16 y los amplificados de 439pb indican la presencia del transcrito *JAK2V617*. Marcador de peso molecular 100pb (M).

Tabla 29. Contribución de las variables de los transcritos *JAK2* y *BCR-ABL1*^a

Denotación	Variable	F	% de contribución
A	Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®	4.51	5.02
B	Tiempo de alineamiento	1.12	1.25
C	Temperatura de alineamiento	25.62	28.52
D	BC-B2C	0.878	0.97
E	AB-A3D	28.22	31.41
F	<i>JAK2F</i> e14	2.84	3.16
G	<i>JAK2R</i> e16	0.660	0.743
H	<i>JAK2R</i> WT e14	8.62	9.60
I	<i>JAK2F</i> F/IC E11	10.97	12.29
J	Ciclos	5.34	5.95
e	Error	1	1.11 ^b

a) Muestra analizada positiva a *BCR-ABL1* p210^{b2a2}, b) Grado de confianza de la prueba

Tabla 30. Contribución de las variables de los transcritos *JAK2* y *BCR-ABL1*^a

Denotación	Variable	F	% de contribución
A	Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®	5.27	21.07
B	Tiempo de alineamiento	0.572	2.28
C	Temperatura de alineamiento	5.03	20.09
D	BC-B2C	0.572	2.28
E	AB-A3D	0.143	0.571
F	<i>JAK2F</i> e14	1.54	6.17
G	<i>JAK2R</i> e16	8.20	32.77
H	<i>JAK2R</i> WT e14	8.62	9.60
I	<i>JAK2F</i> F/IC E11	1.16	4.66
J	Ciclos	1.22	4.90
e	Error	1	3.99 ^b

a) Muestra analizada positiva a *BCR-ABL1* p210^{b2a2}, b) Grado de confianza de la prueba

Tabla 31. Contribución de las variables de los transcritos *JAK2* y *BCR-ABL1*^a

Denotación	Variable	F	% de contribución
A	Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®	1.89	29.75
B	Tiempo de alineamiento	1.47	23.26
C	Temperatura de alineamiento	0.955	15.029
D	BC-B2C	0.449	7.07
E	AB-A3D	0.004	0.073
F	<i>JAK2F</i> e14	0.004	0.073
G	<i>JAK2R</i> e16	0.021	0.343
H	<i>JAK2R</i> WT e14	0.018	0.292
I	<i>JAK2F</i> F/IC E11	0.018	0.29
J	Ciclos	0.512	8.06
e	Error	1	15.73 ^b

a) Muestra analizada positiva a *BCR-ABL1* p210^{b2a2}, b) Grado de confianza de la prueba

La secuenciación por el método de Sanger del amplicon correspondiente a los exones 11 al 16 del transcrito *JAK2* de una muestra positiva a *JAK2V617F* y una negativa, y la comparación con el RNAm *JAK2* se muestran en la figura 16.

```

TTACAAAGAT TTTTAAAGGC GTACGAAGAG AAGTAGGAGA CTACGGTCAA CTGCATGAAA
CAGAAGTTCT TTTAAAAGTT CTGGATAAAG CACACAGAAA CTATTCAGAG TCTTTCTTTG
AAGCAGCAAG TATGATGAGC AAGCTTTCTC ACAAGCATTT GGTTTTAAAT TATGGAGTAT
GTGTCTGTGG AGACGAGAAT ATTCTGGTTC AGGAGTTTGT AAAATTTGGA TCACTAGATA
CATATCTGAA AAAGAATAAA AATTGTATAA ATATATTATG GAAACTTGAA GTTGCTAAAC
AGTTGGCATG GGCCATGCAT TTTCTAGAAG AAAACACCCT TATTCATGGG AATGTATGTG
CCAAAAATAT TCTGCTTATC AGAGAAGAAG ACAGGAAGAC AGGAAATCCT CCTTTCATCA
AACTTAGTGA TCCTGGCATT AGTATTACAG TTTTGCCAAA GGACATTCTT CAGGAGAGAA
TACCATGGGT ACCACCTGAA TGCATTGAAA ATCCTAAAAA TTTAAATTG GCAACAGACA
AATGGAGTTT TGGTACCACT TTGTGGGAAA TCTGCAGTGG AGGAGATAAA CCTCTAAGTG
CTCTGGATTC TCAAAGAAAG CTACAATTTT ATGAAGATAG GCATCAGCTT CCTGCACCAA
AGTGGGCAGA ATTAGCAAAC CTTATAAATA ATTGTATGGA TTATGAACCA GATTTCAGGC
CTTCTTTTCA AGCCATCATA CGAGATCTTA ACAGTTTGT TACTCCAGAT TATGAACAT
TAACAGAAAA TGACATGTTA CCAAATATGA GGATAGGTGC CCTGGGGTTT TCTGGTGCCT
TTGAAGACCG GGATCCTACA CAGTTTGAAG AGAGACATTT GAAATTTCTA CAGCAACTTG
GCAAGGGTAA TTTTGGGAGT GTGGAGATGT GCCGGTATGA CCCTCTACAG GACAACACTG
GGGAGGTGGT CGCTGTAAAA AAGCTTCAGC ATAGTACTGA AGAGCACCTA AGAGACTTTG
AAAGGGAAAT TGAAATCCTG AAATCCCTAC AGCATGACAA CATTGTAAAG TACAAGGGAG

```

Figura 16. Analisis de la secuenciacion de los exones 11 al 16 del gen *JAK2*

XI. DISCUSIÓN

La detección de los marcadores moleculares en neoplasias mieloproliferativas forma parte de los criterios mayores en los algoritmos diagnósticos de la OMS, la detección de estos contribuye en la pronta y adecuada terapia con fármacos selectivos de las proteínas anormales que se encuentran en las NMP. La mutación puntual *JAK2V617F* y los transcritos *BCR-ABL1* son los marcadores asociados a las neoplasias mieloproliferativas. La identificación de estos marcadores se hace principalmente por técnicas moleculares basadas en la PCR, este trabajo se concentro en el desarrollo de un panel de identificación simultanea de los marcadores *JAK2V617F*, mutaciones en el exón 12 y los transcritos *BCR-ABL1*.

La primera fase de experimentación consistió en la utilización de la metodología Taguchi para la estandarización de las variables que afectan la técnica de identificación de los transcritos *BCR-ABL1*. Por lo que se realizó un diseño experimental usando la Metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales. Este diseño permite una exploración en experimentos de los cuales no se tenia información previa, dependiendo de las variables que afectan al ensayo se seleccionó el arreglo ortogonal. Los arreglos existentes son: L_4 , L_8 , L_{12} , L_{16} , etc, el que se utilizó en la primera exploración fue el L_{12} , ya que es ideal para experimentos de los que no se sabe el comportamiento de las variables. Con este arreglo se pueden analizar hasta 11 variables y se deben realizar 12 corridas experimentales. Las variables se trabajaron a 2 niveles y se designaron como 1 para el nivel bajo y 2 para el nivel alto.

La identificación del transcrito de fusión *BCR-ABL1* se realizó por RT-PCR. La optimización de la amplificación de los transcritos quiméricos se realizó analizando cada una de las variables que influyen en la PCR utilizando un arreglo ortogonal L_{12} , las variables analizadas fueron 8 y se estudiaron 2 niveles en cada una. Se obtuvieron las concentraciones de DNA amplificado el cual es nuestra variable respuesta y se utiliza para determinar los porcentajes de contribución y el estadístico F (F de Taguchi, índice de variación), el cual si es mayor de 2 indica que el aporte a la variación del experimento es significativo. Este análisis también determina el nivel óptimo a utilizar de cada variable y su efecto sobre la reacción, los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 24. De acuerdo a los resultados la variable que influye mas en la reacción con un porcentaje de contribución del 46% fue la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®. Esta variable esta constituida por una mezcla de HotstarTaq® DNA polimerasa (2.5U por cada

12.5 μ L), buffer Multiplex PCR con 6mM de Cl_2Mg (pH=8 a 20°C) y una mezcla 400 μ M de cada dNTP. Otras variables como los ciclos de amplificación y la concentración del oligonucleótido B2M-R contribuyen significativamente en un 14 y 15%. El cálculo de $Y_{\text{est}}=21.89$ que fue superior a cualquier valor de DNA amplificado, indica que las corridas experimentales realizadas en el arreglo L_{12} reflejan el comportamiento de la reacción en un 85% de acuerdo al grado de confianza de la prueba (aportación del error = 15%). Con estos resultados se hizo la predicción del ensayo óptimo, el cual se realizó utilizando todas las variables a nivel bajo, lo que resulta en un ensayo con el mínimo de recursos, con excepción de la cantidad de B2M-R que se utilizó a nivel alto, el resultado que arroja este ensayo es equiparable al mejor en el arreglo ortogonal L_{12} y ahorrando recursos. Así el ensayo óptimo se realizó con 10 μ L de Multiplex PCR Master mix QIAGEN®, una concentración de BC-B1A de 0.4 μ M, BC-E1A de 0.4 μ M, AB-A3B de 0.4 μ M, B2M-F de 0.04 μ M y B2M-R de 0.08 μ M en un volumen final de 25 μ L, con una temperatura de alineamiento de 54°C, con 30 ciclos de amplificación y utilizando 2 μ l de cDNA molde y tuvo una $Y=21.3$ la cual es muy similar a la Y estimada. El análisis electroforético se realizó (Figura 8) para observar los productos de amplificación del arreglo L_{12} y corroborar que son los productos deseados. Las corridas de comparación de los ensayos optimizados contra los ensayos realizados con las condiciones iniciales se muestran en la Figura 16 para la detección de los transcritos *BCR-ABL1*.

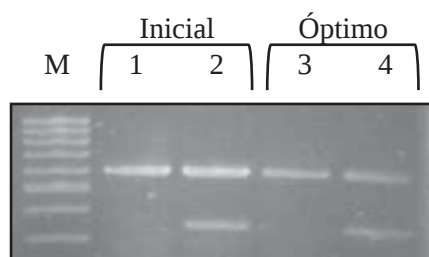


Figura 17. Análisis electroforético comparativo de la detección de los transcritos *BCR-ABL1*. Se realizaron los ensayos bajo las condiciones optimas obtenidas por el análisis de las variables que influyen en la técnica RT-PCR y se compararon contra los ensayos realizados bajo las condiciones iniciales. Control negativo (condición inicial) (1), control positivo (condición inicial) (2), control negativo (condición óptima) (3), control positivo (condición óptima) (4) y marcador peso molecular 100pb (M).

Para el análisis de las variables que afectan la detección de la mutación JAK2V617F el parámetro a maximizar fue la concentración de DNA amplificado en la técnica PCR-alelo específico y en la

técnica de RFLP solo fue la definición de bandas, este último parámetro se determino de acuerdo a la tabla 27.

Cada variable que influye en la técnica de PCR alelo específico fue analizada utilizando la metodología Taguchi (arreglo L_{12} , examina 8 variables a 2 niveles cada una) como método estadístico, con las concentraciones de DNA amplificado se determinaron los porcentajes de contribución y el estadístico F (F de Taguchi, índice de variación) para determinar el nivel a utilizar cada variable y su efecto sobre la reacción, los resultados del análisis están en la Tabla 26. La variable que mostro un porcentaje de contribución mayor fue la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® con una aportación del 50% en la variabilidad del producto final. El grado de confianza de la prueba refleja que tan certero es el análisis del diseño experimental en la técnica de identificación, describe el comportamiento del experimento mientras mas pequeño sea el valor mayor será la descripción del experimento para este caso el grado de confianza fue de 9.1% (variabilidad del error = 9.1%), esto nos indico que el diseño describe el 90.9% del comportamiento de experimento. El cálculo de $Y_{est}=17.052$ comparada contra la Y máxima obtenida del arreglo L_{12} que fue de 17.2 indican que el diseño experimental fue hecho de manera adecuada. Con estos resultados se predice el ensayo óptimo, el cual se realizó utilizando todas las variables a nivel bajo con excepción de la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® que se utilizó el nivel alto, el resultado que arroja este ensayo ($Y_{opt}=17.1$) es equiparable al mejor en el arreglo ortogonal L_{12} y utilizando el mínimo de recursos. El ensayo óptimo se realizó con 0.3µg de DNA molde, 12.5µL de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, una temperatura de alineamiento de 57°C, 30 ciclos de amplificación, una concentración 0.24µM de primer F, 0.2µM de primer F/IC y 0.4µM de primer R en un volumen final de 25µL. Se realizó el análisis electroforético de los ensayos realizados basados en el arreglo L_{12} (Figura 9) para poder observar los productos de amplificación. La comprobación de los resultados del análisis de la prueba PCR-alelo específico en la identificación de la mutación *JAK2V617F* se realizó comparando un ensayo realizado con las condiciones iniciales de trabajo contra las que se obtuvieron como optimas después de el análisis estadístico por la metodología Taguchi y se ilustró en la Figura 17.

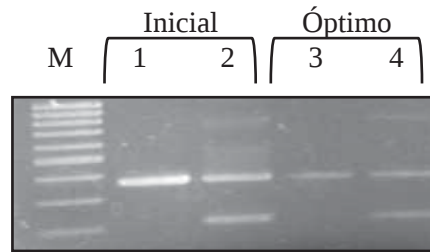


Figura 18. Análisis electroforético comparativo de la detección de la mutación JAK2V617F por la técnica PCR-alelo específico. Los amplicones productos del ensayo óptimo arrojados por el análisis de las variables que afectan en la detección de la mutación JAK2V617F se compararon con los realizados bajo las condiciones iniciales. Control negativo (condición inicial) (1), control positivo (condición inicial) (2), control negativo (condición óptima) (3), control positivo (condición óptima) (4) y marcador peso molecular 100pb (M).

Respecto al análisis RFLP, usando las condiciones de reacción optimizadas de PCR-alelo específico se realizó la amplificación de la región control del gen *JAK2*, se utilizó la misma cantidad de *JAK2F/IC* y de *JAK2R*, para aumentar la cantidad de amplificado. La optimización de la técnica de RFLP consistió, en analizar las variables de digestión del producto amplificado: cantidad de enzima, tiempo de digestión, cantidad de amplicon a digerir, los niveles analizados se ilustran en la Tabla 16. Con el objetivo de bloquear la variable del tipo de DNA ensayado, se realizó estos ensayos utilizando una muestra de DNA diferente en cada ensayo (Figura 10). Los efectos de las variables no fueron significativos, dado que ningún valor de F de Taguchi fue mayor de 2, por lo tanto cualquier combinación de niveles de las variables dará el mismo resultados. En este diseño la metodología Taguchi no fue útil ya que la variable respuesta no es cuantitativa y el convertirla en cualitativa por apreciación no tuvo éxito. Por lo observado en la electroforesis las condiciones del ensayo 3 se adoptan como las mejores en la técnica RFLP para detectar la mutación *JAK2V617F* y determinar el genotipo homocigoto o heterocigoto y fueron: Cantidad de DNA: 0.3 µg, concentración de *JAK2F/IC*: 0.4 µM, *JAK2R*: 0.4 µM en un volumen final de 25µL, Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® 12.5 µL, Temperatura de alineamiento: 57°C, 30 Ciclos de amplificación. Cantidad de amplicon a digerir: 7.5 µL, Tiempo de digestión: 30 minutos y Cantidad de enzima BsaXI: 0.5 µL (1 unidad, 1U).

La tercera y última parte del trabajo de tesis consistió en generar un multiplex PCR para la detección simultánea de *JAK2V617F* y *BCR-ABL1*, por lo que se tuvo que homogenizar la muestra a utilizar. Si se utilizara DNA se tendría que diseñar oligonucleótidos que detectaran las variantes del gen de fusión *BCR-ABL1* lo cual no es posible ni conveniente ya que las regiones amplificadas podrían llegar a un tamaño de 30kb, lo cual es imposible de realizar por la HotStarTaq® polimerasa utilizada. Por lo que el diseño se basó en la utilización de RNA y en la detección de los transcritos *BCR-ABL1* p210 (100pb a 500pb aproximadamente). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para transcritos *JAK2* en donde los amplificadores generados fueran compatibles con los amplificadores de los transcritos *BCR-ABL1*. El diseño de los oligos fue un proceso amplio con un análisis bioinformático donde se ubicaron las regiones exónicas del gen *JAK2* y la ubicación de la mutación *JAK2V617F*, un análisis en la secuencia del RNA *JAK2* con la finalidad de establecer el tamaño de los amplicones adecuado para su análisis por electroforesis, el diseño de oligonucleótidos y la elección de los más adecuados y compatibles que tengan las T_m más similares y altas, que no formaran homodímeros o heterodímeros probables entre ellos y los oligonucleótidos utilizados en la detección de los transcritos *BCR-ABL1* se mostraron en la Tabla 18. Esto se realizó utilizando el software libre CLC Sequence Viewer 6.5.4, consultando la base de datos NCBI y con uso del programa en línea OLIGOANALYZER 3.1.

Para dicha prueba se diseñaron arreglos ortogonales individuales para analizar los reactivos contenidos en el Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® (HotStarTaq polimerasa, cloruro de magnesio, dNTP's, buffer Multiplex PCR pH=8) de manera independiente, se realizó variaciones en ellos y se obtuvo la influencia individual que tienen en la reacción. Y se agregó otra variable al análisis que es el tiempo de alineamiento ya que es determinante al momento de coexistir en una reacción de PCR más de 5 oligonucleótidos, por que estos compiten por el alineamiento específico con su secuencia diana y por acoplamientos no específicos entre ellos y aumentar el tiempo de alineamiento mejora su alineamiento específico.

Para mejorar la especificidad del oligonucleótido *JAK2F* e14 que es alelo específico para la mutación *JAK2V617F* se adicionó un mismatch cercano a la posición 3' para elevar la especificidad del alineamiento al sitio de la mutación con lo cual la sensibilidad de detección aumenta de 95% a un 99.8%.¹⁵⁵ El mismatch consiste en el cambio de un nucleótido, en este

caso una guanina por una timina, cercano al extremo 3' del oligonucleótido alelo específico, con lo cual el alineamiento específico del nucleótido final en el extremo 3' se garantiza. Para llevar a cabo una optimización mas confiable se utilizaron los reactivos que contiene el Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® de manera individual para realizar su optimización completa.

El Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® esta compuesto por: HotStarTaq® DNA polimerasa de la cual una unidad incorpora 10nmol de dNTP en 30min a 72°C (sintetiza de 2-4 kb por minuto), buffer multiplex PCR (contiene Tris-Cl, KCl, [NH₄]SO₄, MgCl₂ 15nM, pH=8 a 20°C) el cual garantiza las condiciones optimas para el funcionamiento de la polimerasa y dNTPs 400 µM de cada uno que son los sustratos de la polimerasa para realizar la síntesis de una cadena de DNA. De estos constituyentes del Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® solo se variaron las unidades de polimerasa y la concentración de MgCl₂ la reacción de PCR.

Se propuso un ensayo para realizar la amplificación de un control interno del gen *JAK2* que abarca del exón 11 al 16 para su análisis por secuenciación además de la amplificación del genotipo silvestre *JAK2V617* para discernir cuando esta mutación estuviera presente de manera homocigota o heterocigota, para lo cual se realizó un diseño L_{12} donde las variables a analizar se enlistan en la Tabla 32. La finalidad de realizar este experimento fue determinar la cantribucion de manera independiente de los reactivos contenidos en el Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®.

Tabla 32. Análisis de las variables de los transcritos controles de *JAK2*

Clave	Variable	F	% de contribución
A	HotStarTaq® polimerasa	13.2	35.00
B	Magnesio	5.23	13.80
C	<i>JAK2F/IC</i> e11	0.025	0.07
D	<i>JAK2R</i> e16	1.42	3.77
E	<i>JAK2R</i> WT e14	0.446	1.18
F	Temperatura de Alineamiento	5.67	14.96
G	Tiempo de alineamiento	2.23	5.91
H	Ciclos	6.60	17.42
e	Error	1	7.91 ^a

a.-grado de confianza de la prueba

Una vez llevadas a cabo las corridas experimentales se cuantificó la cantidad de DNA amplificado final y realizó el análisis de los resultados para determinar el porcentaje de contribución y el estadístico de prueba F (F de Taguchi) de cada variable analizada en el experimento además del grado de confianza de la prueba (Tabla 32).

La $Y_{est}=35.93$ fue superior a la $Y_{max}=33.81$, por lo que el experimento describe el comportamiento de las variables de manera correcta, la Figura 18 ilustra el gel de electroforesis del arreglo ortogonal L_{12} para el cual se utilizó una muestra control negativa para *BCR-ABL1* y *JAK2V617F*.

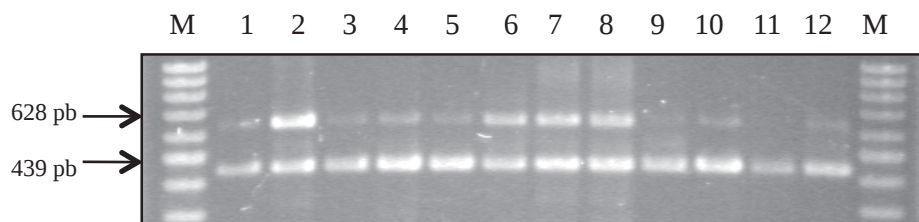


Figura 19. Análisis electroforético de los transcritos *JAK2* controles internos. Arreglo ortogonal L_{12} para la amplificación de transcritos del genotipo silvestre *JAK2*. Ensayos del arreglo L_{12} (1-12), los amplificados de 628pb corresponden a la region de los exones 11-16 del transcrito *JAK2* y el amplificado de 439 al amplificado *JAK2V617*. Marcador de peso molecular 100pb (M)

En el análisis electroforético se observó que se logró amplificar el control interno de 628pb del gen *JAK2* que fue el que se extrajo para su secuenciación y así determinar mutaciones en el exón 12 y 13 que son recurrentes en policitemia vera, además que el amplificado de 439pb que corresponde al genotipo *JAK2V617* se logró amplificar de manera constante en todos los ensayos, de este análisis se obtuvo la información de que variables son determinantes para que la amplificación del fragmento de 628pb se pueda realizar. Se obtuvo también que los niveles óptimos a usar en este ensayo de HotStarTaq® polimerasa y magnesio son los que contiene el Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®. Por tal motivo para el diseño combinado de las mutaciones y controles internos se usará master mix QIAGEN® y no los reactivos de manera individual, de esta manera se reduce el error que se genera al pipeteo de los reactivos.

Las variables que se utilizaron en el desarrollo de la reacción de PCR que detecte la presencia de cualquier variante de transcrito *BCR-ABL1* p210 y la mutación *JAK2V617F*, además de la

amplificación de un control interno del gen *JAK2* (exones 11-16) y el amplificado *JAK2V617* que sirve para discernir entre la presencia de la mutación *JAK2V617F* de manera homocigota o heterocigota se enlistan en la Tabla 19. Cabe resaltar que los oligonucleótidos específicos para detectar los transcritos *BCR-ABL1* son BC-B2C y AB-A3D los cuales son mas específicos que los utilizados en la RT-PCR individual para este gen de fusión, estos oligos se obtuvieron del reporte *BIOMED-1* (Tabla 17).¹⁵⁶

Se realizó el análisis de estas variables para determinar el índice de variación de cada una (estadístico F = F de Taguchi, índice de variación), el porcentaje de contribución y el nivel óptimo para su utilización en la detección de ambos marcadores, los ensayos experimentales se realizaron como lo describió el arreglo ortogonal L_{12} , que se aplicó en 3 muestras distintas: muestra positiva *BCR-ABL1* p210^{b2a2}, muestra positiva mutación *JAK2V617F* heterocigota y muestra negativa *BCR-ABL1* y *JAK2V617F*.

Una vez llevados a cabo los ensayos descritos en los AO's y cuantificada la cantidad de DNA amplificado final, se analizaron los resultados (Tablas 28, 29, 30 y 31) y los geles de electroforesis (Figuras 13, 14 y 15). Se obtuvo que variables influyen significativamente en la detección de los marcadores en los tipos de muestras que se pueden analizar. Las variables no afectan significativamente cuando se utilizó una muestra negativa a las mutaciones. Cuando se utilizó una muestra *BCR-ABL1* p210^{b2a2} positiva, las variables que afectan son la cantidad de Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®, la temperatura de alineamiento, la concentración de los oligos AB-A3D, JAK2F e14, JAK2R WT e14, JAK2 F/IC e11 y la cantidad de ciclos. Las variables que afectan significativamente cuando el análisis se realizó con una muestra *JAK2V617F* positiva, fue la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, la temperatura de alineamiento, la concentración de los oligos JAK2R e16 y JAK2 WT e14. Se realizó una combinación de las variables que afectan significativamente y son comunes a ambos arreglos. De esta manera se logró obtener el óptimo de detección simultanea de los transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*. El cual se realizó utilizando 12.5 µL de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, 58°C de temperatura de alineamiento, 90seg de tiempo de alineamiento, 40 ciclos y con una concentración de oligos de 0.4µM para BC-B2C, AB-A3D, JAK2F e14, JAK2R e16 y JAK2 F/IC e11 y de 0.2µM para JAK2R WT e14. En la figura 19A se muestra el análisis electroforético del ensayo

óptimo realizado con cada una de las muestras afectadas con las diferentes mutaciones y sin estar afectada. La figura 19B muestra la electroforesis de una mezcla de las mutaciones, con lo que se puede observar que la separación de todos los amplificados. Los amplificados de 628pb corresponden a un transcrito del gen *JAK2* entre el exón 11 y el exón 16, los amplificados de 439pb indican la presencia del transcrito silvestre *JAK2V617*, el amplificado de 360pb corresponde al transcrito *BCR-ABL1* b3a2 y el de 285pb al transcrito *BCR-ABL1* b2a2 y el amplificados de 247pb corresponden a los transcritos *JAK2V617F*.

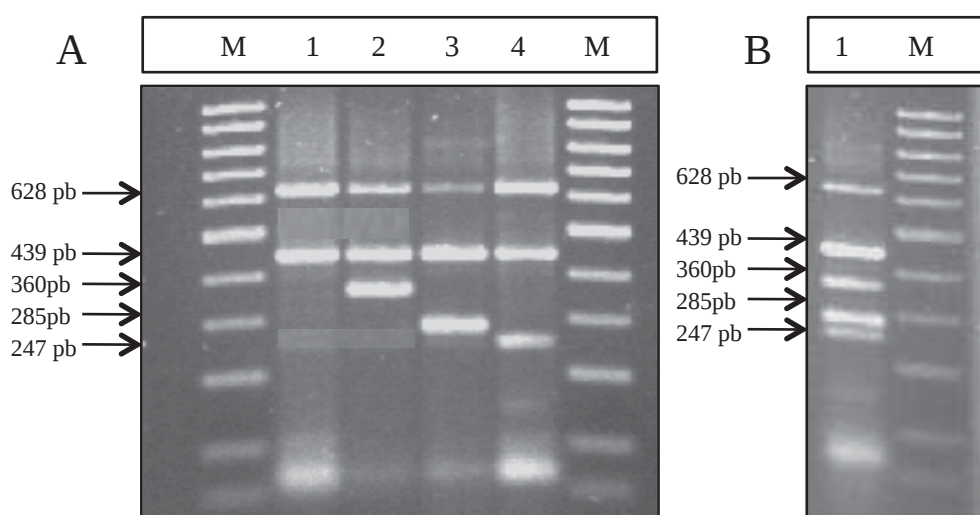


Figura 20. Análisis electroforético de los productos de amplificación de transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*. A) Ensayos óptimos resultado del análisis de las variables utilizando distintas muestras para la detección simultanea de los transcritos *BCR-ABL1* y *JAK2*. Ensayo realizado con una muestra control negativo a las mutaciones (1), muestra positiva al transcrito de fusión *BCR-ABL1* p210^{b3a2} (2), muestra positiva al transcrito de fusión *BCR-ABL1* p210^{b2a2} (3), muestra positiva a la mutación *JAK2V617F*. Marcador de peso molecular 100pb (M). B) Análisis electroforético de la mezcla de las mutaciones en un solo carril (1). Marcador de peso molecular 100pb (M).

XII. CONCLUSIONES

Concluimos que la utilización de la metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales nos permitió llegar a las condiciones óptimas para la detección de los posibles transcritos *BCR-ABL1* por medio de RT-PCR y la detección de la mutación *JAK2V617F* por medio de la técnica PCR alelo específico, la variable de mayor contribución fue el Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN® con un 46% y 50% de variación en el producto de amplificación respectivamente. Lo cual fue confiable, rápido y económico, generando un ensayo utilizando el mínimo posible de reactivos. Se realizaron 12 ensayos de 128 que eran necesarios para analizar todas las interacciones de 7 variables a 2 niveles de trabajo, de esta manera se ahorro tiempo y recursos, y se determinó la variable de mayor contribución.

El análisis realizado de manera independiente de los reactivos contenidos en el Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN® (HotStarTaq® polimerasa y magnesio) indican que de estas variables la que afecta mas los ensayos de PCR es la HotStarTaq® polimerasa. El porcentaje de contribución de la HotStarTaq® polimerasa fue de 35% en los ensayos que detectan los controles internos del gen *JAK2*. Mientras que el magnesio contribuye a la variación en un 4% para los mismo ensayos, y las concentraciones que afectan en mayor proporción son las contenidas en el Multiplex PCR Master Mix de QIAGEN®.

Finalmente se desarrolló un panel de pruebas para detectar los marcadores moleculares asociados a neoplasias mieloproliferativas clásicas, utilizando un diseño de experimentos económico, rápido y confiable. Con este panel se detectan las variantes p210 (b3a2, b2a2, b2a3m b3a3) del transcrito *BCR-ABL1*, la mutación *JAK2V617F*, el tipo de variante que presenta la mutación *JAK2V617F* (homocigota o heterocigota) y se obtiene un amplificado de los exones 11 al 16 del gen *JAK2* para su secuenciación, con lo que se buscan aquellas mutaciones en el exón 12 y 13 que se asocian a PV y otras NMP.

XIII. REFERENCIAS

-
- ¹ Lichtman MA, Liesveld JL. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Lichtman M, Beutler E, Kipps I, et al, eds. Williams Hematology. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill Book Company; 2006:1237-1294.
- ² Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T. 2006. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355; 2408-2417.
- ³ Bain BJ, Fletcher SH. 2007. Chronic eosinophilic leukemias and the myeloproliferative variant of the hypereosinophilic syndrome. *Immunol Allergy Clin North Am.* 27; 377-388.
- ⁴ Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, Kutok J, Clark J, Galinsky I, Griffin JD, Cross NC, Tefferi A, Malone J, Alam R, Schrier SL, Schmid J, Rose M, Vandenberghe P, Verhoef G, Boogaerts M, Wlodarska I, Kantarjian H, Marynen P, Coutre F. FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348: 1201-1214.
- ⁵ Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG 1994. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77: 307-316.
- ⁶ Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR 2005. Acquired mutation of the tyrosine Kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054-1061.
- ⁷ James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W 2005. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144-1148.
- ⁸ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790.
- ⁹ Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387-397.
- ¹⁰ Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 169-77.
- ¹¹ Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54: 8-29.
- ¹² Johansson P, 2006. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 32: 171-173.
- ¹³ Johansson P, Kutti J, Andreasson B, Safai-Kutti S, Vilen L, Wedel H, Ridell B (2004). Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99. *J Intern Med* 256: 161-165.
- ¹⁴ Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD,

Vardiman JW (2007). Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 110: 1092-1097.

¹⁵ Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A (2005). Bone marrow histopathology in myeloproliferative disorders-current diagnostic approach. *Semin Hematol* 42: 184-195.

¹⁶ Thiele J, Kvasnicka HM, Vardiman J (2006). Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: a forgotten pearl. *Best Pract Res Clin Hematol* 19: 413-437.

¹⁷ Klion AD, Robyn J, Akin C, Noel P, Brown M, Law M, Metcalfe DD, Dunbar C, Nutman TB (2004). Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood* 103: 473-478.

¹⁸ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790.

¹⁹ Levine RL, Pardananani A, Tefferi A, Gilliland DG (2007). Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 7: 673-683.

²⁰ Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387-397.

²¹ James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144-1148.

²² Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 106: 2162-2168.

²³ Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts vK, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M (1983). Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306: 277-280.

²⁴ Melo JV, Barnes DJ (2007). Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 441-453.

²⁵ Nowell PC, Hungerford DA (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497-1500.

²⁶ Rowley JD (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293.

²⁷ Cotta CV, Bueso-Ramos CE (2007). New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Diagn Pathol* 11: 68-78.

²⁸ Jacknow G, Frizzera G, Gajil-Peczalska K, Banks PM, Arthur DC, McGlave PB, Hurd DD (1985). Extramedullary presentation of the blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 61: 225-236.

-
- ²⁹ Muehleck SD, McKenna RW, Arthur DC, Parkin JL, Brunning RD (1984). Transformation of chronic myelogenous leukemia: clinical, morphologic, and cytogenetic features. *Am J Clin Pathol* 82: 1-14.
- ³⁰ Cotta CV, Bueso-Ramos CE (2007). New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Diagn Pathol* 11: 68-78.
- ³¹ Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz m, Kantarjian HM (2003). Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer* 98: 437-457.
- ³² Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 96: 111-116.
- ³³ Cotta CV, Bueso-Ramos CE (2007). New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Diagn Pathol* 11: 68-78
- ³⁴ Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 96: 111-116
- ³⁵ Anastasi J, Feng J, Dickstein JI, Le Beau MM, Rubin CM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW (1996). Lineage involvement by *BCR* /*ABL* in Ph+ lymphoblastic leukemias: chronic myelogenous leukemia presenting in lymphoid blast vs Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10: 795-802.
- ³⁶ Peterson LC, Bloomfield CD, Brunning RD (1976). Blast crisis as an initial or terminal manifestation of chronic myeloid leukemia. A study of 28 patients. *Am J Med* 60: 209-220.
- ³⁷ Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz m, Kantarjian HM (2003). Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer* 98: 437-457.
- ³⁸ Nowell PC, Hungerford DA (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497-1500.
- ³⁹ Rowley JD (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293.
- ⁴⁰ Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts vK, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M (1983). Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306: 277-280.
- ⁴¹ Melo JV (1996). The diversity of *BCR* -*ABL* fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88: 2375-2384.
- ⁴² Melo JV. The diversity of *BCR* -*ABL1* fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996;88:2375-2384.
- ⁴³ Melo JV, Myint H, Galton DA, Goldman JM. P190 *BCR*-*ABL1* chronic myeloid leukemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukemia? *Leukemia*. 1994;8:208-211.
- ⁴⁴ Ravandi F, Cortes J, Albitar M, et al. Chronic myelogenous leukaemia with p185(*BCR* /*ABL1*) expression: characteristics and clinical significance. *Br J Haematol*. 1999;107:581-586.
- ⁴⁵ Pane F, Frigeri F, Sindona M, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (*BCR* /*ABL1* with C3/A2 junction). *Blood*. 1996;88:2410-2414.

-
- ⁴⁶ Wilson G, Frost L, Goodeve A, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. *BCR* -*ABL1* transcript with an e19a2 (c3a2) junction in classical chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1997;89:3064.
- ⁴⁷ Melo JV. *BCR* -*ABL1* gene variants. *Baillieres.Clin-.Haematol*. 1997;10:203-222.
- ⁴⁸ Leibundgut EO, Jotterand M, Rigamonti V, et al. A novel *BCR* -*ABL1* transcript e2a2 in a chronic myelogenous leukaemia patient with a duplicated Ph-chromosome and monosomy 7. *Br J Haematol*. 1999;106:1041-1044.
- ⁴⁹ Michael W. N. Deininger, John M. Goldman and Junia V. Melo. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 96: 3343-3356.
- ⁵⁰ Deininger MW, Goldman JM, Melo JV (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96: 3343-3356.
- ⁵¹ Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the *BCR* -*ABL* tyrosine Kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344: 1031-1037.
- ⁵² Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of *BCR* -Abl positive cells. *Nat Med* 2: 561-566.
- ⁵³ Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J (2006). New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern* 145: 913-923.
- ⁵⁴ Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD (2007). Second generation inhibitors of *BCR* -*ABL* for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7: 345-356.
- ⁵⁵ Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J (2006). New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern* 145: 913-923.
- ⁵⁶ Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD (2007). Second generation inhibitors of *BCR* -*ABL* for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7: 345-356.
- ⁵⁷ Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM, (1999). Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med* 131: 207-219.
- ⁵⁸ Mitelman F (1993). The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1: 11-15.
- ⁵⁹ Mitelman F, Levan G, Nilsson PG, Brandt L (1976). Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 18: 24-30.
- ⁶⁰ Gordon MY, Goldman JM (1996). Cellular and molecular mechanisms in chronic myeloid leukaemia: biology and treatment. *Br J Haematol* 95: 10-20.
- ⁶¹ Melo JV, Barnes DJ (2007). Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 441-453.
- ⁶² Mitelman F (1993). The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1: 11-15.
- ⁶³ Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T (2003). Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene* 22: 3952-3963.

-
- ⁶⁴ Ohmine K, Ota J, Ueda M, Ueno S, Yoshida K, Yamashita Y, Kirito K, Imagawa S, Nakamura Y, Saito K, Akutsu M, Mitani K, Kano Y, Komatsu N, Ozawa K, Mano H (2001). Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 20: 8249-8257.
- ⁶⁵ Radich, JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, Sawyers C, Shah N, Stock W, Willman CL, Friend S, Linsley PS (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2794-2799.
- ⁶⁶ Anon. (1995). Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Ann Intern Med* 123: 656-664.
- ⁶⁷ Berglund S, Zettervall O (1992). Incidence of polycythemia vera in a defined population. *Eur J Haematol* 48: 20-26.
- ⁶⁸ Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, Marilus R, Villegas A, Tognoni G, Barbui T (2005). Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol* 23: 2224-2232.
- ⁶⁹ Spivak JL (2002). Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood* 100: 4272-4290.
- ⁷⁰ McMullin MF, Bareford D, Campbell P, Green AR, Harrison C, Hunt B, Oscier D, Polkey MI, Reilly JT, Rosenthal E, Ryan K, Pearson TC, Wilkins B (2005). Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *Br J Haematol* 130: 174-195.
- ⁷¹ Birgegard G, Wide L (1992). Serum erythropoietin in the diagnosis of polycythaemia and after phlebotomy treatment. *Br J Haematol* 81: 603-606.
- ⁷² Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N, Lecron JC, Binquet C, Barro C, Hermouet S, Praloran V (2004). Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica* 89: 1194-1198.
- ⁷³ Dobo I, Donnard M, Girodon F, Mossuz P, Boiret N, Boukhari R, Allegraud A, Bascans E, Campos L, Pineau D, Turlure P, Praloran V, Hermouet S (2004). Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assays performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythemia vera. *Hematol J* 5: 161-167.
- ⁷⁴ Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 356: 459-468.
- ⁷⁵ Tefferi A (2006). The diagnosis of polycythemia vera: new test and old dictums. *Best Pract Res Clin Haematol* 19: 455-469.
- ⁷⁶ Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW (2007). Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 110: 1092-1097.
- ⁷⁷ Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005). Acquired mutation of the tyrosine Kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054-1061.
- ⁷⁸ James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144-1148.

-
- ⁷⁹ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790.
- ⁸⁰ Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387-397.
- ⁸¹ Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 356: 459-468.
- ⁸² Andrieux JL, Demory JL (2005). Karyotype and molecular cytogenetic studies in polycythemia vera. *Curr Hematol Rep* 4: 224-229.
- ⁸³ Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Pearson CE, Delord CF, Green AR, Huntly BJ, Lakhani A, McMullin MF, Pearson TC (2000). The incidences of trisomy 8, trisomy 9 and D20S108 deletion in polycythemia vera: an analysis of blood granulocytes using interphase fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 110: 839-846.
- ⁸⁴ Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, Levine R, Bousse-Kerdiles MC, Wadleigh M, Campbell PJ, Silver RT, Vannucchi AM, Deeg HJ, Gisslinger H, Thomas D, Odenike O, Solberg LA, Gotlib J, Hexner E, Nimer SD, Kantarjian H, Orazi A, Vardiman JW, Thiele J, Tefferi A (2007). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res* 31: 737-740.
- ⁸⁵ Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW (2007). Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 110: 1092-1097.
- ⁸⁶ Porcu P, Neiman RS, Orazi A (1999). Splenectomy in agnogenic myeloid metaplasia. *Blood* 93: 2132-2134.
- ⁸⁷ Andreasson B, Swolin B, Kutti J (2002). Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 68: 189-193.
- ⁸⁸ Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F (2001). Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 98: 3249-3255.
- ⁸⁹ Passamonti F, Vanelli L, Malabarba L, Rumi E, Pungolino E, Malcovati L, Pascutto C, Morra E, Lazzarino M, Cazzola M (2003). Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 88: 1123-1129.
- ⁹⁰ Cervantes F, Barosi G (2005). Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnosis, prognostic factors, and staging. *Semin Oncol* 32: 395-402.
- ⁹¹ Tefferi A (2000). Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 342: 1255-1265.
- ⁹² Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD,

Vardiman JW (2007). Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 110: 1092-1097

⁹³ Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gary GD (2005). The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 131: 320-328.

⁹⁴ Barosi G, Hoffman R (2005). Idiopathic myelofibrosis. *Semin Hematol* 42: 248-258.

⁹⁵ Cervantes F, Barosi G (2005). Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnosis, prognostic factors, and staging. *Semin Oncol* 32: 395-402.

⁹⁶ Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly G, Guarnone R, Dupriez B, Pereira A, Montserrat E (1998). Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol* 102: 684-690.

⁹⁷ Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, Mizoguchi H (2001). Primary chronic myelofibrosis: clinical and prognostic evaluation in 336 Japanese patients. *Int J Hematol* 73: 194-198.

⁹⁸ Tefferi A (2000). Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 342: 1255-1265.

⁹⁹ Reilly JT (2005). Cytogenetic and molecular genetic abnormalities in agnogenic myeloid metaplasia. *Semin Oncol* 32:359-364.

¹⁰⁰ Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005). Acquired mutation of the tyrosine Kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054-1061.

¹⁰¹ James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144-1148.

¹⁰² Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 106: 2162-2168.

¹⁰³ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790.

¹⁰⁴ 1288.- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387-397.

¹⁰⁵ Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A (2006). MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108: 3472-3476.

¹⁰⁶ Dingli D, Grand FH, Mahaffey V, Spurbeck J, Ross FM, Watmore AE, Reilly JT, Cross NC, Dewald GW, Tefferi A (2005). Der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3): a specific cytogenetic abnormality in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 130: 229-232.

-
- ¹⁰⁷ Reilly JT (2005). Cytogenetic and molecular genetic abnormalities in agnogenic myeloid metaplasia. *Semin Oncol* 32:359-364. 217.- Biggar RJ, Chaturvedi AK, Goedert JJ, Engels EA (2007). AIDS- related cancer and severity of immunosuppression in persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst* 99: 962-972.
- ¹⁰⁸ Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, Bauters F (1996). Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scorling system. *Blood* 88: 1013-1018.
- ¹⁰⁹ Reilly JT (2002). Cytogenetic and molecular genetic aspects of idiopathic myelofibrosis. *Acta Haematol* 108: 113-119.
- ¹¹⁰ Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, Hanson CA, Li CY, Dewald GW (2001). Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 113: 763-771.
- ¹¹¹ Finazzi G, Harrison C (2005). Essential thrombocythemia. *Semin Hematol* 42: 230-238.
- ¹¹² Harrison CN, Green AR (2003). Essential thrombocythemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 17: 1175-1190, vii.
- ¹¹³ Tefferi A, Murphy S (2001). Current opinion in essential thrombocythemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *Blood Rev* 15: 121-131.
- ¹¹⁴ Gisslinger H (2006). Update on diagnosis and management of essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 32: 430-436.
- ¹¹⁵ Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Sole F, Hernandez-Boluda JC, Woessner S, Sans-Sabrafen J, Rozman C, Montserrat E (1999). Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 13: 150-154.
- ¹¹⁶ Colombi M, Radaelli F, Zocchi L, Maiolo AT (1991). Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. A retrospective study of 103 patients. *Cancer* 67: 2926-2930.
- ¹¹⁷ Chait Y, Condat B, Cazals-Hatem D, Rufat P, Atmani S, Chaoui D, Guilmin F, Kiladjian JJ, Plessier A, Denninger MH, Casadevall N, Valla D, Briere JB (2005). Relevance of the criteria commonly used to diagnose myeloproliferative disorder in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol* 129: 553-560.
- ¹¹⁸ Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J (1997). Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 34: 29-39.
- ¹¹⁹ Schafer AI (2004). Thrombocytosis. *N Engl J Med* 350: 1211-1219.
- ¹²⁰ Colombi M, Radaelli F, Zocchi L, Maiolo AT (1991). Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. A retrospective study of 103 patients. *Cancer* 67: 2926-2930.
- ¹²¹ Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005). Acquired mutation of the tyrosine Kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054-1061.
- ¹²² James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villevall JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 434: 1144-1148.
- ¹²³ Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 106: 2162-2168.

-
- ¹²⁴ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790.
- ¹²⁵ Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387-397.
- ¹²⁶ Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, Bolli N, Pacini R, Tabarrini A, Carini M, Bigerna B, Pucciarini A, Mannucci R, Nicoletti I, Tiacci E, Meloni G, Specchia G, Cantore N, Di Raimondo F, Pileri S, Mecucci C, Mandelli F, Martelli MF, Falini B (2006). Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. *Blood* 108: 4146-4155.
- ¹²⁷ Hirose Y, Masaki Y, Sugai S (2002). Leukemic transformation with trisomy 8 in essential thrombocythemia: a report of four cases. *Eur J Haematol* 68: 112-116.
- ¹²⁸ Panani AD (2006). Cytogenetic findings in untreated patients with essential thrombocythemia. *In Vivo* 20: 381-384.
- ¹²⁹ Krolewski, J. J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T. B., Dalla-Favera, R. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* 5: 277-282, 1990.
- ¹³⁰ Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. Activation of JAK2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol.* 1997 May;17(5):2497-501.
- ¹³¹ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-1790.
- ¹³² James C, Ugo V, Le Couedic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144-1148.
- ¹³³ Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-1061.
- ¹³⁴ Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-1061.
- ¹³⁵ James C, Ugo V, Le Couedic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144-1148.
- ¹³⁶ Levine RL, Wadleigh M, Cools J et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387-397.
- ¹³⁷ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-1790.
- ¹³⁸ Albizua E, Ayala R, Martinez J. Alteraciones moleculares en las neoplasias mieloproliferativas crónicas y su repercusión clínica. Servicio de Hematología Hospital Universitario 12 de Octubre Madrid. *Cuaderno de hematología*. 2008.
- ¹³⁹ Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms *Nature leukemia* 2008; 22; 14-22.

-
- ¹⁴⁰ Steensma D, P. *JAK2* V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *JMD*. 2006; 8; 4; 397-411.
- ¹⁴¹ Steensma D, P. *JAK2* V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *JMD*. 2006; 8; 4; 397-411.
- ¹⁴² Mullis k.b., the polymerase chain reaction, birkhauser, boston 1994
- ¹⁴³ Roy,R.K. A Primer on the Taguchi Method,Van Nostrand Reinhold,New York 1990.
- ¹⁴⁴ Roy,R.K. A Primer on the Taguchi Method,Van Nostrand Reinhold,New York 1990.
- ¹⁴⁵ Roy,R.K. A Primer on the Taguchi Method,Van Nostrand Reinhold,New York 1990.
- ¹⁴⁶ Rao RS, Kumar CG, Prakasham RS, Hobbs PJ (2008) The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnol J* 2007; 3(4):510–523.
- ¹⁴⁷ Soler D, J, Mora V, C. et al. Policitemia vera y otros procesos mieloproliferativos. 1995; 7; 655-693.
- ¹⁴⁸ Rao, R. Kumar C. Praskasham R. y J. Hobbs. 2008. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnology Journal*. 3; 510-523.
- ¹⁴⁹ Hassan R, Ramli M, Abdullah WZ, Mustaffa R, Ghazali S, Ankathil R, Alwi Z, Abdullah AD, Baba AA. One-step multiplex RT-PCR for detection of *BCR/ABL1* gene in Malay patients with chronic myeloid leukaemia. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*2008; 16(2); 41-44.
- ¹⁵⁰ Lens D, Muxi P, Brunini A, Trias N, Pierri S. Determinación de la mutación V617F del gen *JAK2* en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. *Rev Med Urug.* 2007; 23; 122-125.
- ¹⁵¹ Steensma D, P. *JAK2* V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *JMD*. 2006; 8; 4; 397-411.
- ¹⁵² Hassan R, Ramli M, Abdullah WZ, Mustaffa R, Ghazali S, Ankathil R, Alwi Z, Abdullah AD, Baba AA. One-step multiplex RT-PCR for detection of *BCR/ABL1* gene in Malay patients with chronic myeloid leukaemia. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*2008; 16(2); 41-44.
- ¹⁵³ Hassan R, Ramli M, Abdullah WZ, Mustaffa R, Ghazali S, Ankathil R, Alwi Z, Abdullah AD, Baba AA. One-step multiplex RT-PCR for detection of *BCR/ABL1* gene in Malay patients with chronic myeloid leukaemia. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*2008; 16(2); 41-44.
- ¹⁵⁴ Lens D, Muxi P, Brunini A, Trias N, Pierri S. Determinación de la mutación V617F del gen *JAK2* en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. *Rev Med Urug.* 2007; 23; 122-125.
- ¹⁵⁵ Steensma D, P. *JAK2* V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *JMD*. 2006; 8; 4; 397-411
- ¹⁵⁶ Hassan R, Ramli M, Abdullah WZ, Mustaffa R, Ghazali S, Ankathil R, Alwi Z, Abdullah AD, Baba AA. One-step multiplex RT-PCR for detection of *BCR/ABL1* gene in Malay patients with chronic myeloid leukaemia. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.*2008; 16(2); 41-44.