

Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso

Dres. Daniela Lens*, Pablo Muxi†, Lics. Andreína Brugnini‡, Natalia Trías‡, Dra. Silvia Pierri§

Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina.
Universidad de la República. Montevideo, Uruguay

Resumen

La policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis idiopática (MI) son trastornos mieloproliferativos clonales estrechamente relacionados y caracterizados por una proliferación excesiva de una o más líneas mieloides tales como eritrocitos, plaquetas y fibroblastos de la médula ósea.

Si bien existen estrictos criterios para el diagnóstico de estos síndromes mieloproliferativos, la categorización precisa continúa siendo un objeto de debate y adicionalmente estos desórdenes son difíciles de diferenciar de procesos reactivos en muchas ocasiones.

Recientemente, en el año 2005, se identificó en varias de estas entidades una mutación en el gen tirosina quinasa Janus kinase 2 (JAK2). Esta mutación consiste en la sustitución de una G por una T en la posición 1849, resultando en la sustitución en la proteína de una fenilalanina por valina (JAK2 V617F).

La incidencia de esta mutación se observó en cerca de 90% de los casos con PV y en aproximadamente 50% de los casos con MI y TE.

En este trabajo describiremos la detección de esta mutación en un paciente con diagnóstico de probable PV mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica de alta sensibilidad para la detección de esta mutación y discutiremos la importancia de esta mutación de descubrimiento reciente en el diagnóstico y tratamiento de los síndromes mieloproliferativos BCR-ABL negativos.

Palabras clave: TRASTORNOS MIELOPROLIFERATIVOS - diagnóstico.
MUTACIÓN- genética.
PROTEÍNA-TIROSINA QUINASA.

* Prof. Agregada. Departamento Básico de Medicina.

† Prof. Agregado. Clínica Hematológica. Departamento Clínico de Medicina.

‡ Lic. Bioquímica. Ayudante. Departamento Básico de Medicina.

§ Prof. Adjunta. Clínica Hematológica. Departamento Clínico de Medicina.

Correspondencia: Dra. Daniela Lens.

Depto. Básico de Medicina. Hospital de Clínicas. Piso 15. Avda Italia s/n. Montevideo CP 11600. Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: dlens@hc.edu.uy

Recibido: 31/7/06.

Aceptado: 26/2/07.

Introducción

A diferencia de lo que ocurre en la leucemia mieloide crónica donde la identificación del rearrreglo específico BCR-ABL condujo a un gran avance en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de esta entidad, en los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMP) BCR-ABL negativos, tales como la policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis idiopática (MI), no se conocían hasta muy recientemente alteraciones genéticas específicas.

Entre mayo y junio de 2005, cinco grupos de investigadores describieron una nueva mutación puntual del gen tirosina quinasa JAK2, debida a la sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 1849 del exón 14, lo cual resulta en el reemplazo de una valina por una fenilalanina en la posición 617 de la proteína, por la cual se denomina a la mutación JAK2 V617F⁽¹⁻⁵⁾.

Esta mutación se observó en cerca de 90% de los casos con PV cuando se usan ensayos de alta sensibilidad para detectarla⁽⁶⁾. También se encontró en aproximadamente 50% de los casos con MI y TE, mientras que no se ha encontrado en sujetos sanos ni en pacientes con eritrocitosis secundaria, por lo cual esta mutación tiene un muy alto valor predictivo en distinguir SMPC de condiciones no clonales tales como las policitemias secundarias.

Esta mutación ocurre en una región altamente conservada de un dominio autoinhibitorio que regula negativamente la señalización del JAK2. Diversos trabajos han demostrado que esta mutación participa en la patogenia de estas condiciones, especialmente debido a una ganancia de función del gen JAK2 y mediante una pérdida de control que se asocian con la excesiva mieloproliferación de estos desórdenes.

En este trabajo describiremos la detección de esta mutación en un paciente con diagnóstico de probable PV y discutiremos la importancia de esta nueva mutación en el diagnóstico y tratamiento de los SMP BCR-ABL negativos.

Material y método

Extracción de ácido desoxirribonucleico

La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico se realizó a partir de 1 ml de sangre periférica citrada, utilizando el reactivo comercial dnazol (Life Technologies) y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Las muestras de ADN fueron conservadas a 4°C.

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados

Nombre	Secuencia
JAK2 F	5' AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT 3'
JAK2 F/IC	5' ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG 3'
JAK2 R	5' CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA 3'

Detección de la mutación V617F

La mutación V617F se detectó a partir del ADN genómico previamente obtenido, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica, según el método publicado por Baxter y colaboradores⁽¹⁾. Esta PCR está diseñada de forma que se utilizan tres cebadores diferentes, denominados JAK2R, JAK2F/IC y JAK2F (tabla 1). El cebador JAK2F es específico para el alelo mutante y el cebador JAK2F/IC se encuentra en todos los individuos independientemente de la presencia o no de la mutación, por lo que constituye un control interno de la reacción. De esta forma, en todos los individuos se amplifica un producto de 364 pares de bases (pb) con los cebadores JAK2F/IC y JAK2R, y solamente en los individuos que presentan la mutación en estudio se obtiene un producto de 203 pb utilizando los cebadores JAK2F y JAK2R (figura 1).

La amplificación por PCR fue realizada en un volumen final de 20 uL utilizando 500 ng de ADN, 200µM/L de cada dNTPs, 0,5 U de Taq polimerasa (New England Biolabs) y 2 uL de buffer Taq 10x conteniendo 2mM de MgCl (New England Biolabs), 0,5µM de los cebadores JAK2 F y JAK2 F/IC y 1µM del cebador JAK2 R.

El programa de PCR utilizado consta de 36 ciclos, y se inicia con una desnaturalización de 5 minutos, para luego ciclar: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, terminando con una extensión final de 5 minutos. Se incluyó siempre en todas las reacciones un

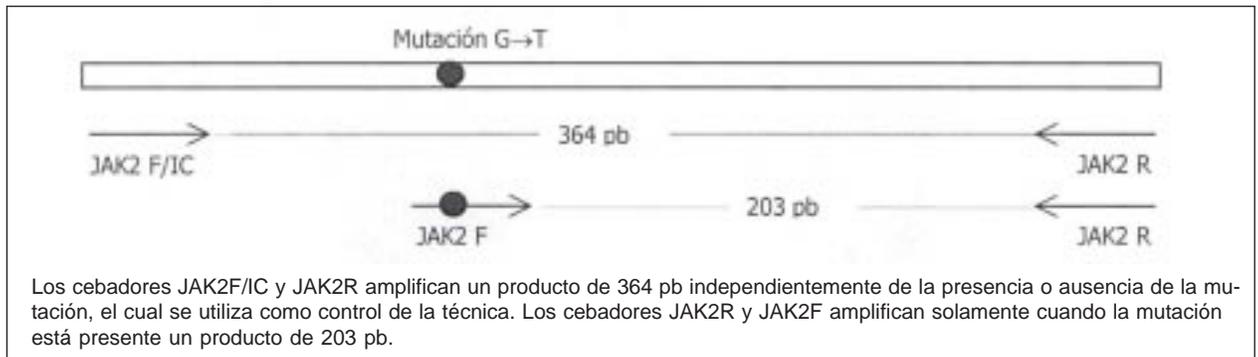


Figura 1. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica para amplificar un fragmento del gen JAK2

control negativo que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación y donde se sustituye el molde ADN por agua. La verificación del producto de PCR esperado se realizó en un gel de agarosa a 2% teñido con bromuro de etidio⁽⁷⁾.

Análisis del caso

Paciente de sexo masculino, 72 años, fumador intenso, con hipertensión arterial crónica en tratamiento y portador de una arteriopatía obstructiva crónica que en el año 2002 determina una amputación del quinto dedo del pie izquierdo. En diciembre de 2004, presentando un nuevo episodio obstructivo de miembro inferior izquierdo, mostró en su hemograma un aumento de las cifras de eritrocitos con un hematocrito de 66%, conjuntamente a una granulocitosis de 24.000 y plaquetas de 245.000. En la evolución se mantienen las cifras de hematocrito aumentando progresivamente las cifras de plaquetas hasta 710.000. En el estudio de biopsia de médula ósea se observó una médula ósea hiperclular donde destaca una hiperplasia de la serie eritroide, por lo cual concluyen en un síndrome mieloproliferativo crónico tipo PV.

El paciente es tratado con flebotomías y en mayo de 2005 se inicia tratamiento con hidroxiurea, el cual se suspende en febrero de 2006 por una complicación hemorrágica.

Como se ilustra en la figura 2, el paciente mostró en el estudio de PCR alelo específico para la mutación V617F del gen JAK2 un patrón con dos bandas. Por un lado, la banda control de 364 pb que también está presente en los dos controles sanos que se estudiaron. Por otro, se amplificó también en el paciente un producto de 203 pb demostrando la presencia de la mutación. Esta banda no se observó en los controles sanos.

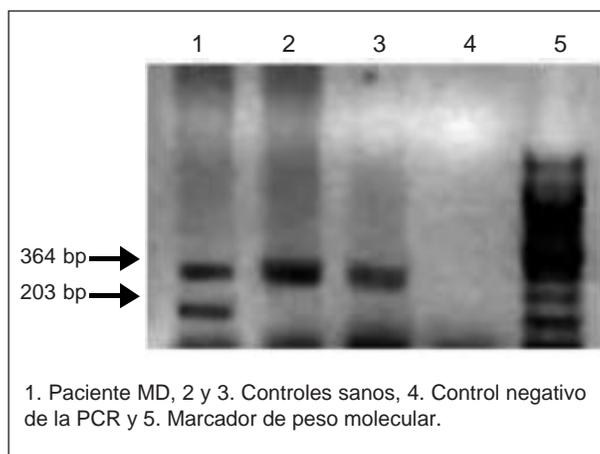


Figura 2. Mutación del JAK2 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica

Discusión y conclusiones

En este trabajo hemos descrito el primer caso en el cual se ha identificado la mutación V617 del gen JAK2 en nuestro país. Este trabajo se enmarca en un proyecto multidisciplinario entre el Departamento Básico de Medicina y el Servicio de Hematología del Hospital de Clínicas, con vistas a determinar la presencia de esta mutación en 100 pacientes con SMP BCR-ABL negativo.

La identificación reciente de la mutación activadora V617F en el gen JAK2 representa un importante avance en el conocimiento de la patogenia de los síndromes mieloproliferativos BCR-ABL negativos. Debido a la alta frecuencia en que esta mutación es encontrada en la PV y en menor grado en la TE y la MI, se ha postulado que la detección de esta mutación tendría un fuerte impacto en el diagnóstico, la clasificación y el tratamiento de estas entidades. Distintos grupos han propuesto incorporar la detección de esta mutación como un test diagnóstico de primera línea cuando nos encontramos con un hematocrito mayor a 51% o frente a sospecha de PV, dado que la detección del JAK2 V617F tiene 100% de valor predictivo positivo del diagnóstico de PV^(8,9). Por otra parte, distintos autores han postulado que la presencia de esta mutación permitiría una nueva clasificación de los SMP, ya que las TE, PV y MI portadoras de la mutación JAK2 podrían representar la misma enfermedad en distintas etapas evolutivas en lugar de distintas entidades⁽¹⁰⁻¹²⁾. De todos modos, el valor clínico exacto y el beneficio de la detección de esta mutación está por establecerse y necesita de ensayos clínicos prospectivos especialmente diseñados para resolver estas preguntas.

Adicionalmente, el descubrimiento de esta mutación abre nuevas perspectivas para terapias dirigidas específicamente a la proteína quinasa mutada, en forma similar a los inhibidores del BCR-ABL en las leucemias mieloides crónicas.

Summary

Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET-TE) and idiopathic myelofibrosis (IM-MI) are clonal myeloproliferative disorders characterized by an excessive proliferation of one or more myeloid lineage such as erythrocytes, platelets and fibroblasts of bone marrow.

Precise categorization of myeloproliferative syndromes still need to be debated even if diagnostic criteria are strict; additionally these disorders are difficult to differentiate from reactive processes.

Recently, in 2005, JAK2-mutation was identified in many of those entities. Sequencing of the coding region of JAK2 revealed a G to T transversion at position 1849, that changed a valine to a phenylalanine (JAK2 V617F).

Incidence of V617F-JAK2-mutation was almost 90% in patients with PV, and 50% in patients with IM and ET.

In this study we describe the detection of the V617F-JAK2-mutation in a patient suspected of PV using allele-specific polymerase chain reaction analysis (PCR) and we discuss the importance of the mutation for diagnosis and treatment of negative BCR-ABL myeloproliferative syndromes.

Résumé

La polycytémie vera (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose idiopathique (MI) sont des troubles myéloprolifératifs clonaux étroitement en rapport et caractérisés par une prolifération excessive d'une ou de plus de lignes myéloïdes telles que des érythrocytes, plaquettes et fibroblastes de la moelle osseuse.

Même s'il existe de critères stricts pour le diagnostic de ces syndromes myéloprolifératifs, la catégorisation précise demeure un objet de débat et, en outre, ces désordres sont difficiles à différencier des processus réactifs dans plusieurs occasions.

Récemment, en 2005, on a identifié dans plusieurs de ces entités une mutation dans le gène tyrosine kinase Janus kinase 2 (JAK2). Cette mutation consiste en la substitution d'un G par un T dans la position 1849, résultant dans la substitution dans la protéine d'une phénylalanine par valine (JAK2 V617F).

L'incidence de cette mutation a été observée dans près de 90% des cas avec PV et, dans environ 50% des cas avec MI et TE.

Dans ce travail nous décrivons la détection de cette mutation chez un patient ayant un diagnostic de probable PV moyennant un essai de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) allèle spécifique de haute sensibilité pour la détection de cette mutation et nous discuterons de l'importance de cette mutation récemment découverte dans le diagnostic et le traitement des syndromes myéloprolifératifs BCR-ABL négatifs.

Resumo

A Policitemia Vera (PV), a trombocitemia hemorrágica (TE) e a mielofibrose idiopática (MI) são transtornos mieloproliferativos clonais fortemente relacionados e caracterizados por uma proliferação excessiva de uma ou mais linhas mielóides tais como eritrócitos, plaquetas e fibroblastos da medula óssea.

Embora existam critérios rigorosos para o diagnóstico destas síndromes mieloproliferativas, a classificação precisa continua sendo discutida; ademais muitas vezes é muito difícil diferenciar estes distúrbios de processos reativos.

Em 2005, uma mutação no gen tirosina quinase Janus kinase 2 (JAK2) foi identificada em várias de estas entida-

des. Nesta mutação se observa a substituição de um G por um T na posição 1849, que leva a substituição de uma fenilalanina por valina (JAK2 V617F) na proteína.

Esta mutação foi observada em aproximadamente 90% dos casos com PV e em aproximadamente 50% dos casos com MI e TE.

Neste trabalho descrevemos a detecção desta mutação em um paciente com diagnóstico provável de PV utilizando um ensaio de reação na cadeia da polimerase (PCR) alelo específica de alta sensibilidade para a detecção desta mutação e discutimos a importância desta mutação recentemente descoberta no diagnóstico e no tratamento das síndromes mieloproliferativas BCR-ABL negativas.

Bibliografía

1. **Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al.** Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-61.
2. **James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Layout C, et al.** A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-8.
3. **Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al.** A gain of function mutation in JAK2 is frequently found in patients with myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-90.
4. **Levine RL, Waldleigh M, Cools J, Ebert BL, Werning G, Huntly BJ, et al.** Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythaemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-97.
5. **Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al.** Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005; 280: 22788-92.
6. **Vainshenker W, Constantinescu SN.** A unique activation mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of Polycythemia Vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005; 195-200.
7. **Sambrook J, Russell DW.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
8. **Tefferi A, Pardanani A.** Mutation screening for JAK2V617F: when to order the test and how to interpret the results. *Leuk Res* 2006; 30(6): 739-44.
9. **James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, et al.** Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006; 20: 350-3.
10. **Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al.** Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366: 1945-53.
11. **Antonioni E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al.** Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005; 19: 1847-9.
12. **Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al.** The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2 (V617F) in polycythemia vera. *Cancer* 2006; 106(3): 631-5.