

Estudio molecular en Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas: mutación JAK2V617F

Lev P.R., Heller P.G.

*Servicio de Hematología Investigación.
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.
Universidad de Buenos Aires. CONICET.*

paulaheller@hotmail.com

*Fecha de recepción: 29/06/2013
Fecha de aprobación: 05/07/2013*



LABORATORIO EN
HEMATOLOGIA

HEMATOLOGÍA, Vol.17 N°2: 176-178
136 Mayo - Agosto 2013

RESUMEN

La mutación JAK2V617F constituye la alteración molecular más frecuente en Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas BCR-ABL-negativas, detectándose en > 95% de los pacientes con Policitemia Vera y alrededor de 50-60% de aquellos con Mielofibrosis Primaria y Trombocitemia Esencial. Constituye un marcador clonal, siendo su utilidad diagnóstica principal la diferenciación entre desórdenes neoplásicos y condiciones reactivas. Además de las Neoplasias Mieloproliferativas BCR-ABL-negativas, puede detectarse con menor frecuencia en otras Neoplasias Mieloides. Los pacientes con Trombocitemia Esencial portadores de esta mutación presentan un moderado incremento en el riesgo trombótico, si bien su presencia no constituye por sí misma un parámetro que determine la decisión terapéutica. Hasta el presente, si bien se ha descrito mayor riesgo de trombosis y transformación a mielofibrosis en los pacientes con niveles más elevados de carga alélica JAK2V617F, la utilidad de su medición en el manejo clínico o el monitoreo del tratamiento en los pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas no es clara.

Palabras clave: JAK2617F, carga alélica, neoplasias mieloproliferativas crónicas

ABSTRACT

The JAK2V617 mutation is the most frequent molecular abnormality underlying the pathogenesis of chronic myeloproliferative neoplasms. More than 95% of patients with polycythemia vera and around half of those with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis carry this mutation. It is useful to distinguish clonal from reactive conditions and is one of the diagnostic criteria included in the WHO classification. It may be detected, albeit with low frequency, in other myeloid neoplasms. Although a moderate increase in the thrombotic risk has been described for JAK2V617F-positive essential thrombocythemia patients, its presence does not represent by itself a parameter to guide treatment recommendations. Patients with high JAK2V617F allelic burden have increased risk of thrombosis and myelofibrotic transformation. However, the role of allele burden measurement in the clinical management and treatment monitoring of patients with myeloproliferative neoplasms remains to be determined.

Key words: JAK2V617F, allele burden, myeloproliferative neoplasms

Introducción

JAK2 es una tirosina quinasa citoplasmática asociada a receptores de diversas citoquinas hematopoyéticas involucrada en la transducción de la señal intracelular en respuesta al estímulo con estas citoquinas. En el año 2005, se identificó la presencia de la mutación JAK2V617F en pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas BCR-ABL-negativas (NMP), contribuyendo al conocimiento de la biología molecular de estas neoplasias. Esta mutación consiste en una transversión G por T en el exón 14 del JAK2, resultando en un cambio de valina por fenilalanina en la posición 617 (V617F) e induce la activación constitutiva de la actividad quinasa del JAK2 y de las vías de transducción de la señal intracelular gatilladas por el mismo, favoreciendo la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. Esta mutación se encuentra en 50 a 60% de los pacientes con Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MP) y en más del 95% de aquellos con Policitemia Vera (PV). Alrededor de un tercio de los pacientes con PV y MP son homocigotas para la misma, mientras que éste es un evento poco frecuente en TE. Además de la presencia o ausencia de JAK2V617F, la carga alélica de esta mutación, determinada por la proporción entre el alelo mutado respecto al total, tendría importancia en la patogenia de la enfermedad.

La mutación JAK2V617F no es específica de las NMP BCR-ABL-negativas clásicas, sino que puede hallarse con menor frecuencia en otras neoplasias mieloides, como los síndromes mixtos mielodisplásicos/mieloproliferativos, especialmente en la anemia refractaria con sideroblastos en anillo asociada a trombocitosis (hasta 50% de los casos), neoplasias mieloproliferativas no caracterizadas y, raramente, en pacientes con mielodisplasia o leucemia mieloide aguda, generalmente secundaria a NMP. Por otra parte, los pacientes con trombosis venosa esplácnica, ya sea trombosis portal o síndrome de Budd-Chiari, son frecuentemente portadores de la mutación JAK2V617F, 40% y 28%, respectivamente, en ocasiones en ausencia de NMP evidente. Esta situación también puede ocurrir en pacientes con trombosis venosa cerebral, en los que se detecta esta alteración molecular en el 6% de los casos.

Además de la mutación JAK2V617F, se han descrito otras alteraciones moleculares en NMP, incluidas las mutaciones en el exón 10 del receptor MPL (en TE y MP), el exón 12 del gen JAK2 (en PV), en los genes LNK y CBL y, más recientemente, en el gen TET2 y otros reguladores epigenéticos, como ASXL1, EZH2,

IDH1/2 y DNMT3a. La identificación de mutaciones en otro grupo de genes, involucrados en la maquinaria de splicing del ARN, como SRSF2 y SF3B1, ha contribuido a poner de manifiesto la complejidad y heterogeneidad existente en la biología molecular de las NMP, especialmente en MP.

Fundamento del ensayo

La determinación de la mutación JAK2V617F se lleva a cabo utilizando una muestra de ADN genómico obtenido a partir de leucocitos totales de sangre periférica anticoagulada con EDTA. Alternativamente, puede efectuarse en granulocitos purificados o en ARN de plaquetas. La detección también puede realizarse en células de médula ósea, siendo la sensibilidad equivalente a la de sangre periférica. Una vez obtenido el ADN, que debe ser de adecuada calidad y pureza, la detección de la mutación JAK2V617F puede efectuarse mediante diversas técnicas, entre las que se incluyen la PCR alelo-específica, PCR seguida de digestión enzimática y la secuenciación de ADN, siendo la PCR alelo-específica la más frecuentemente utilizada. El nivel de sensibilidad recomendado para la detección de rutina de esta mutación es de 1-3%. La sensibilidad de la PCR alelo-específica o digestión enzimática oscila alrededor de 1-5%, dependiendo de la técnica, mientras que la secuenciación es menos sensible, alrededor de 10-20%.

PCR alelo-específica

Esta técnica se realiza con 3 primers diferentes, JAK2 reverse (R), JAK2 forward (F) y JAK2 mutado (M). El par JAK2R-JAK2F amplifica un fragmento del gen JAK2 que incluye la secuencia en la cual se localiza la mutación y se utiliza como control de amplificación y calidad de la muestra. El tercer primer (JAK2M), específico para la mutación, amplifica solo en caso de que la misma esté presente, utilizando el primer JAK2F o JAK2R como extremo. Como controles de la reacción se utiliza una muestra positiva, una muestra negativa y un tubo sin ADN. El producto de la amplificación se siembra en un gel de agarosa al 2% que se tiñe con bromuro de etidio. Según lo descrito, en un paciente con la mutación se observan dos bandas, el control de amplificación, que será visto en todas las muestras, incluidas las de los pacientes normales, y una banda de menor tamaño, presente solo en los pacientes JAK2 positivos.

PCR seguida de digestión enzimática.

El cambio de una guanina por una timina, que origina la mutación V617F, genera un sitio de restricción

específico para la enzima BsaXI. Por lo tanto, se amplifica por PCR la región flanqueante a la mutación con dos primers específicos, se realiza una digestión enzimática y se siembra el producto de la digestión en un gel de agarosa al 2%. En presencia de la mutación, se observan dos bandas de menor peso molecular correspondientes a los fragmentos digeridos, mientras que en ausencia de mutación se observa una sola banda de mayor peso molecular, no digerida. En los individuos heterocigotas se observa la banda no digerida correspondiente al alelo normal y las bandas de menor peso molecular que reflejan el alelo mutado. Por lo tanto, mediante esta técnica, además de determinar si un individuo es positivo o negativo para la mutación, es posible establecer si es homo u heterocigota para la misma.

Cuantificación de la carga alélica JAK2V617F

La cuantificación de la carga alélica JAK2V617F se encuentra, hasta el presente, poco estandarizada. Se han desarrollado una variedad de técnicas, la mayoría de las cuales se basan en PCR en tiempo real, utilizando primers alelo-específicos y SYBR Green I o, más frecuentemente, la detección se realiza con sondas tipo Taqman. La cuantificación puede efectuarse en ADN obtenido de granulocitos purificados de sangre periférica, leucocitos totales o células mononucleares de médula ósea, siendo la primera muestra la más utilizada. Los resultados se expresan como porcentaje del alelo mutado (% JAK2V617F) respecto al JAK2 total, requiriéndose disponer de un estándar con % JAK2V617F conocido, respecto al cual referir la determinación.

Utilidad clínica

La aplicación clínica principal de la detección de la mutación JAK2V617F radica a nivel del diagnóstico de las NMP. Constituye un marcador clonal, permitiendo diferenciar desórdenes neoplásicos de aquellos reactivos, constituyendo uno de los criterios diagnósticos para PV, TE y MP establecidos por la WHO. La presencia de esta mutación no permite discriminar entre los distintos NMP entre sí (TE vs. MF vs. PV), ni tampoco entre éstos y otras neoplasias mieloides, las cuales con menor frecuencia pueden presentar esta alteración molecular, siendo necesario utilizar otros criterios diagnósticos clínicos e histológicos para su adecuada clasificación. Por otra parte, la ausencia de la mutación JAK2V617F no excluye el diagnóstico de TE o MP, ya que alrededor de la mitad de los pacientes no presentan esta alteración, mientras que en el caso de la PV,

lo hacen poco probable, en cuyo caso la medición de los valores de EPO y la detección de mutaciones en el exón 12 podrían contribuir al diagnóstico. Excepto en trombosis venosa esplácnica o cerebral, la inclusión de rutina del JAK2V617F entre los estudios de trombofilia en pacientes con trombosis arterial o venosa en ausencia de NMP evidente no estaría justificada.

En cuanto a la implicancia clínica, la presencia de la mutación JAK2V617F en TE se asociaría a un moderado aumento en el riesgo trombótico, aunque su presencia no constituye por sí misma una indicación de tratamiento citoreductor. No existen evidencias de que la presencia de la mutación modifique el riesgo de evolución a mielofibrosis o leucemia aguda en TE ni el pronóstico de esta enfermedad. Por otra parte, en MP, no se han descrito diferencias consistentes entre pacientes positivos y negativos para JAK2V617F. La carga alélica también tiene implicancia en las manifestaciones clínicas y en la evolución de la enfermedad. Niveles superiores de carga alélica en PV y TE se relacionan con mayor frecuencia de trombosis y transformación a mielofibrosis, mientras que, llamativamente, en MP, los pacientes con niveles inferiores de carga alélica (1-25%) son los que presentan peor pronóstico. La importancia de la cuantificación de la carga alélica en el manejo clínico de los pacientes con NMP aún no está definida y la utilidad del monitoreo de la respuesta molecular durante el tratamiento con interferón-alfa o inhibidores de JAK1/2 se encuentra en evaluación.

Declaración de conflictos de intereses

Las autoras declaran no poseer conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Bench AJ, White HE, Feroni L y col. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol* 2013; 160: 25-34.
2. Heller PG, Lev PR, Salim JP y col. JAK2V617F mutation in platelets from essential thrombocythemia patients: correlation with clinical features and analysis of STAT5 phosphorylation status. *Eur J Haematol* 2006; 77: 210-6.
3. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008; 22: 1299-307.
4. Lippert E, Girodon F, Hammond E y col. Concordance of assays designed for the quantification of JAK2V617F: a multicenter study. *Haematologica* 2009; 94: 38-45.