

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA**  
**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD**  
**“LUIS FELIPE MONCADA”**  
**UNAN MANAGUA**



**MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN**  
**BIOANÁLISIS CLÍNICO.**

**Tema:** Estandarización de la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendidos en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo febrero-octubre 2015.

**Autores:**

Br. Santos Alberto Cruz Alemán.

Br. Adriana Belén Larios Roque.

Br. Uxmal Javier Caldera Suazo.

**Tutor:**

Dr. Allan Pernudi Ubau- MsC. PhD.

**Asesor metodológico:**

MsC. Martha Xiomara Guerrero Delgado.

Managua, Febrero 2016

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	4
<b>IV.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	5
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	5
<b>VI.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	6
<b>6.1</b>	<b>Janus cinasas y la vía JAK-STAT</b> .....	6
<b>6.2</b>	<b>Mutación JAK2 V617F</b> .....	7
<b>6.3</b>	<b>Activación de JAK2-Salvaje</b> .....	8
<b>6.4</b>	<b>Activación de JAK2-V617F</b> .....	9
<b>6.5</b>	<b>Síndromes mieloproliferativos crónicos asociados a la mutación JAK2 V617F</b> .....	9
6.5.1	Policitemia vera (PV). .....	9
6.5.2	Trombocitemia esencial (TE).....	10
6.5.3	Mielofibrosis idiopática (MI). .....	10
<b>6.6</b>	<b>Criterios diagnóstico de la OMS para PV, TE y MI</b> .....	11
<b>6.7</b>	<b>Criterios diagnósticos propuestos para enfermedades mieloproliferativas con mutación JAK2</b> .....	12
6.7.1	Policitemia Vera–JAK2 mutado.....	12
6.7.2	Trombocitemia esencial-JAK2 mutado.....	13
6.7.3	Mielofibrosis idiopática-JAK2 mutado.....	13
<b>6.8</b>	<b>Mutación JAK-2 (Exón 12)</b> .....	13
<b>6.9</b>	<b>Fundamensto de la PCR</b> .....	14
6.9.1	Tipos de PCR .....	14
6.9.2	Desnaturalización .....	15
6.9.3	Hibridación.....	15
6.9.4	Elongación.....	16
<b>6.10</b>	<b>Ensayos de diagnóstico molecular</b> .....	17
6.10.1	Determinación de los parámetros esenciales de control.....	17
6.10.2	Precisión .....	17
6.10.3	Sensibilidad y Especificidad analítica.....	19
<b>VII.</b>	<b>DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	20
<b>VIII.</b>	<b>OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES</b> .....	25

<b>IX.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
9.1	Estandarización de la extracción de ADN.....	28
9.2	Estandarización de la PCR.....	28
9.3	Estandarización de electroforesis en gel de agarosa .....	29
9.4	Determinación de la sensibilidad y especificidad analítica.....	32
9.5	Repetibilidad de la detección.....	32
9.6	Límite de detección.....	33
9.7	Detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes .....	33
<b>X.</b>	<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
10.1	Estandarización de la extracción de ADN.....	35
10.2	Estandarización de la PCR.....	37
10.3	Estandarización de electroforesis en gel de agarosa .....	38
10.4	Determinación la sensibilidad y especificidad analítica.....	40
10.5	Repetibilidad de la detección.....	41
10.6	Límite de detección.....	42
10.7	Detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes .....	43
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>XII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>XIII.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>XIV.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS.

Figura 1: Interacción entre receptores de citoquinas y JAK2.....	6
Figura 2: Dominios de homología Janus y mutación V617F .....	7
Figura 3: Mutación del JAK2 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	8
Figura 4: Esquema de activación de JAK 2.....	9
Figura 5: Principales rasgos clínicos de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos.....	11
Figura 6: Ensayo 1 para la estandarización de PCR y Electroforesis.....	27
Figura 7: Ensayo 2 para la estandarización de PCR y electroforesis .....	27
Figura 8: Ensayo 3 correspondiente a la primera corrida de pacientes .....	28
Figura 9: Ensayo 4 Disminución de alargamiento de bandas.....	28
Figura 10: Ensayo 5 correspondiente a la segunda corrida de pacientes.....	29
Figura 11: Ensayo 6 Introducción de bromuro de etidio .....	29
Figura 12: Ensayo de sensibilidad y especificidad.....	30
Figura 13: Ensayo de Repetibilidad de la detección.....	30
Figura 14: Ensayo límite de detección .....	31
Figura 15: Tercer corrida de pacientes .....	32
Gráfico 1: Estandarización de la extracción de ADN.....	33
Gráfico 2: Estandarización de la PCR .....	35
Gráfico 3: Estandarización de electroforesis en gel de agarosa .....	36
Gráfico 4: Determinación de sensibilidad y especificidad analítica.....	38
Gráfico 5: Repetibilidad de la detección .....	39
Gráfico 6: Limite de detección .....	40
Gráfico 7: Detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes.....	41

## **DEDICATORIA**

A Dios Nuestro Señor Dios: Por ser nuestro guía y creador, por darnos la existencia y proveer todo lo necesario para culminar esta etapa de nuestra vida.

A Nuestros Padres: Por su comprensión, apoyo y estímulo para seguir adelante en nuestra vida profesional, sin su ayuda no sería posible nuestra preparación.

Al Personal Docente: Por dedicarnos su tiempo para nuestra preparación académica.

## **AGRADECIMIENTO**

Nuestro profundo agradecimiento Al Instituto Politécnico de la Salud “Dr. Luis Felipe Moncada” UNAN Managua, al personal docente por darnos la oportunidad de prepararnos académicamente, ya que sin su apoyo no hubiera sido posible nuestra preparación.

A todas aquellas personas que nos ayudaron con su información y conocimientos para la elaboración del documento.

A todo el personal de salud involucrado en la recolección de datos y muestras necesarias para el estudio.

De manera muy especial a nuestro tutor PhD. Allan Pernudi Ubau y Asesora MsC. Martha Xiomara Guerrero Delgado, quienes no escatimaron tiempo para apoyarnos en la elaboración y culminación de la investigación.

## ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
ARMS PCR	Amplification Refractory Mutation System PCR
ARN	Ácido Ribonucleico
A-T	Adenina-Timina
BaF3	Células dependientes de Interleucina-3
BCR-ABL	Cromosoma Filadelfia
C	Citosina
CC	Control de Calidad
CM	Control Mutado
CN	Control Negativo
CNM	Control No Mutado
dATP	Desoxiadenosina Trifosfato
dCTP	Desoxicitidina Trifosfato
dGTP	Desoxiguanosin Trifosfato
dNTPs	Dinucleótidos
dTTP	Timidina Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
Epo	Eritropoyetina
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)

FERM	Proteína4.1, ezrina, radixina y moesina
FOXO	Factores de transcripción forkhead
G	Guanina
g/dL	Gramos por decilitros
g/L	Gramo por Litro
G-C	Guanina-Citocina
gp	Glicoproteína
Hb	Hemoglobina
HRM	Análisis de Alta Resolución de Fusión
Hto	Hematocrito
IL-3	Interleucina-3
JAK	Janus quinasa
JH2	Dominio pseudoquinasa del gen JAK2
kDa	KiloDalton
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
MI	Mielofibrosis Idiopática
MM	Marcador Molecular
mM	Milimolar
MO	Medula Ósea
mTOR	Proteína quinasa de 289 kDa (mammalian target of <i>rapamycin</i> )
ng	Nanogramo
ng/μl	Nanogramo por microlitro



Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatodilinositol 3-quinasa
Primers	Oligonucleótidos
PV	Policitemia Vera
RAS	Proteína interruptor-regulador
RPM	Revoluciones Por Minuto
SH2	Dominio de proteínas (Src Homology 2)
SMC	Síndromes Mieloproliferativos Crónicos
SOCS	Proteínas supresoras de la señalización de citocinas
SP	Sangre Periférica
src	Proteínas Oncogenicas
STAT	Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción
T	Timina
TAE	Tris acetato
Taq	Polimerasa
TBE	Tris borato
TPE	Tris fosfato
TyK2	Tirosina quinasa 2 (Tyrosine kinase 2)
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{M/L}$	Micromolar/Litro
V617F	Valina 617 Fenilalanina (Val617Phe)

## RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con el propósito de estandarizar la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendido en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo febrero - octubre 2015.

La mutación V617F en el gen JAK2 está implicada en la génesis de algunos síndromes mieloproliferativos crónicos (SMP) como la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis (MI) idiopática. Esta se genera la sustitución de una valina por una fenilalanina en la posición 617, debido a la sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 1849 del exón 14 del gen JAK2 y es detectada por el ADN genómico previamente obtenido, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica.

El diagnóstico de estos síndromes en Nicaragua se realiza mediante el cuadro clínico del paciente y pruebas presuntivas (hematocrito, conteo de plaquetas, reticulina, etc.); y la detección de la mutación no se había realizado en nuestro país, por lo cual no forma parte del esquema diagnóstico del Ministerio de Salud.

Por medio de este estudio estandarizamos la PCR punto final para la detección de JAK2 V617F conformada por: estandarización del protocolo para la extracción de ADN, protocolo de PCR, la electroforesis en gel de agarosa y la evaluación de: la sensibilidad, especificidad, límite de detección y reproducibilidad de la prueba, con resultados satisfactorios. Se detectó la mutación JAK2 V617F en 2 pacientes confirmando así el diagnóstico clínico de policitemia vera brindado por el personal médico.

Recomendamos a las distintas entidades, promover investigaciones científicas dentro del análisis molecular y el diagnóstico hematológicos e incluir dentro de los protocolos diagnósticos la detección de la mutación como prueba inicial para la clasificación de síndromes mieloproliferativos crónicos.

## I. INTRODUCCIÓN

Los síndromes mieloproliferativos (SMP) son una enfermedad hematológica maligna caracterizada por una proliferación clonal de una o varias series, a nivel de la célula madre multipotencial, con un incremento en la producción de células sanguíneas. Comúnmente se incluyen 4 entidades más representativas como es policitemia vera, trombocitosis esencial, mielofibrosis, así como leucemia mieloide crónica.

La mutación JAK2 V617F se observa en cerca de 90% de los casos con policitemia vera. También se encontró en aproximadamente 50% de los casos con mielofibrosis y trombocitosis esencial, mientras que no se ha encontrado en sujetos sanos, por lo cual esta mutación tiene un muy alto valor predictivo en distinguir síndromes mieloproliferativos de otras condiciones como la leucemia mieloide crónica.

Hasta la fecha la detección de la mutación no se ha realizado en Nicaragua. El diagnóstico de estos síndromes se basa en los datos clínicos de pacientes y la confirmación molecular solo la realizan algunos pacientes con suficientes recursos para viajar a Costa Rica.

La detección de esta mutación en el país tendría un fuerte impacto en el diagnóstico, la clasificación y el tratamiento de dichos síndromes. Por tanto pretendemos estandarizar la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos que contribuya a un diagnóstico exacto, clasificación y tratamiento oportuno de los pacientes.

## II. ANTECEDENTES

En el 2005 un grupo de investigadores en el Reino Unido, reportaron la identificación de la activación recurrente de una mutación de la tirosin cinasa, V617F, en el JH2 dominio pseudocinasa, de Janus cinasa 2, en pacientes con síndrome mieloproliferativo, 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 (Baxter, 2005).

En ese mismo año 2005, Jones y colaboradores realizaron un estudio con 480 pacientes con diagnóstico de síndrome mieloproliferativo, se observó que 81% de pacientes diagnosticados con PV presentaban JAK2 V617F de las cuales 31 pacientes eran del género masculino, contra 27 que eran del género femenino, con una media de edad de 57 años, en TE con un total de 59 pacientes con un total de 41% de pacientes con la presencia de V617F positivo. (Jones, 2005)

Para el año 2006 se realizó un estudio de cohorte con 72 familias, se observó mayor prevalencia en casos con PV, TE comparado con casos con LMC, solo 7% de los pacientes con LMC presentaban la mutación, 47% de los pacientes con PV y 40% de los paciente con TE, así pues está marcada diferencia nos indica que a pesar de que hay un alto porcentaje de pacientes con este tipo síndromes mieloproliferativos relacionados con la mutación. (Bellanné, 2006)

En el año 2007 en China se realizó un estudio en el cual se analizaron muestras de sangre aleatorizadamente en un laboratorio, 37 muestras de un total de 3935 se encontró una mutación JAK2 positiva. Los datos sugieren que la mutación se presenta más comúnmente en pacientes con síndromes mieloproliferativos.(Xu, 2007)

En Uruguay en el año 2007, Lens y colaboradores detectaron la mutación JAK2 V617F en un paciente con diagnóstico de probable PV mediante PCR alelo específica de alta

sensibilidad para la detección de esta mutación de descubrimiento reciente en el diagnóstico y tratamiento de los síndromes mieloproliferativos BCR-ABL negativos. (Lens, 2007)

La importancia de la mutación JAK2 V617F recae en la terapia dirigida que se puede realizar mediante la inhibición de la activación de la tirosin cinasa. Por tanto la identificación de la mutación JAK2 V617F ha permitido que nuevas terapias sean dirigidas contra la inhibición de cinasa de JAK2. Para los fármacos de clase I, se inhibe la fosforilación de la tirosina. Los estudios muestran que la dosis de los inhibidores va a depender de la citopenias más comúnmente observadas, esto con la precaución del efecto tóxico que pueda tener cada fármaco. (Pardanani, 2008)

Los criterios de la OMS 2008 sobre la clasificación de síndromes mieloproliferativos se sugiere el seguimiento de un algoritmo para el diagnóstico y tratamiento de estos, englobando la presencia o ausencia de la mutación, por tanto tenemos que la toma de muestra en sangre periférica para mutación de JAK2 V617F debe ser como método de *screening* así como lo es la medición de la eritropoyetina en suero, de acuerdo a los valores de la eritropoyetina y a la presencia o no de la mutación JAK2 V617F se podría normar una conducta a seguir, para distinguir la presencia de un síndrome mieloproliferativo. (Tefferi, 2008)

El descubrimiento de la mutación JAK2 V617F condujo a la integración de biomarcadores genéticos para estrategias diagnósticas y terapéuticas. La década pasada quedó marcada por el desarrollo rápido de terapias con inhibidores de JAK2 capaces de reducir la esplenomegalia, las citopenias y los síntomas constitucionales con mínima mielosupresión y toxicidad secundaria. El ruxolitinib fue el primer inhibidor JAK2 aprobado por la FDA en 2011 para riesgo alto e intermedio de mielofibrosis además con excelentes resultados en PV. (Geyer, 2013)

### III. JUSTIFICACIÓN

Los síndromes mieloproliferativos comprenden varios trastornos hematológicos clonales que se cree que surgen de una transformación en una célula madre hematopoyética. Las principales características clínicas de estas enfermedades son la sobreproducción de células sanguíneas maduras funcionales y un curso clínico largo. (Campbell, 2006)

El empleo de técnicas moleculares ha permitido explicar la patogénesis de estos trastornos por la detección de mutaciones que suscitan constitutivamente la actividad de las quinasas (JAKs), confiriéndole a la célula capacidad proliferativa y supervivencia. (Soto, 2014)

La mutación V617F, constituye la alteración molecular más frecuente en pacientes con SMP, detectándose en la mayoría (>95%) de los pacientes con policitemia vera y en aproximadamente la mitad (50-60%) de aquellos con trombocitosis esencial y mielofibrosis. (Heller, 2012)

Hasta la fecha la detección de esta mutación no se ha realizado en nuestro país. Actualmente el diagnóstico de estos síndromes en Nicaragua se realiza mediante el cuadro clínico del paciente y pruebas presuntivas (hematocrito, conteo de plaquetas, reticulina, etc.).

Por medio de este estudio se pretende estandarizar la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos que contribuya a un diagnóstico exacto, clasificación y tratamiento oportuno de los pacientes.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Se lograra obtener un protocolo estandarizado de la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, en base al procedimiento de referencia?

#### **V. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

Estandarizar la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendido en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo febrero-octubre 2015.

##### **Objetivo específico**

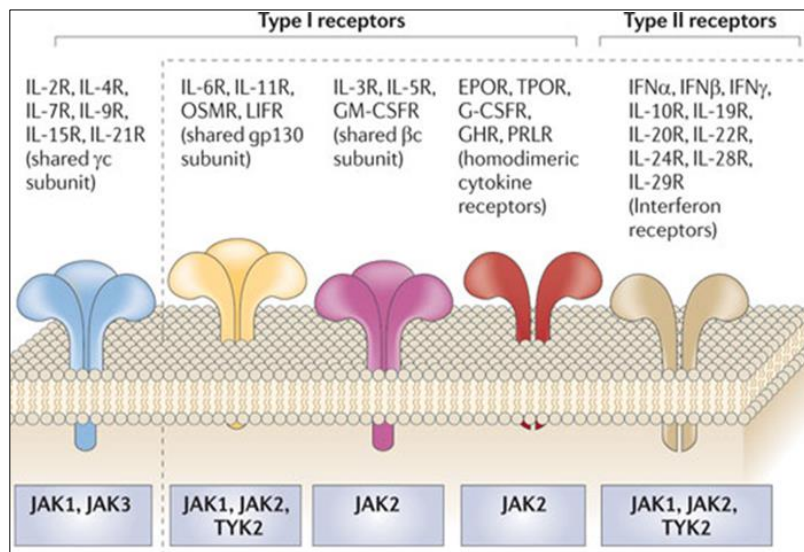
- Realizar la estandarización del protocolo para la extracción de ADN genómico a partir de sangre total mediante QIAamp DNA Mini Kit.
- Realizar la estandarización del protocolo de la técnica de PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa para la detección de la mutación JAK2 V617F
- Determinar la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y límite de detección para la detección de la mutación JAK2 V617F.
- Detectar la mutación JAK2 V617F en los pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos mediante la técnica estandarizada.

## VI. MARCO TEÓRICO

Las Janus cinasas (JAK) son una familia de proteínas pertenecientes a las enzimas asociadas a receptores de citoquinas. Son tirosinas quinasas no específicas. Forman parte de vías de señalización destinadas a la regulación de la expresión génica. Se encuentran unidas por la parte intracelular a receptores de hormonas de la membrana citoplasmática.

### 6.1 Janus cinasas y la vía JAK-STAT

La vía JAK STAT fue originalmente descubierta a través del estudio de la transducción de señales intracelulares inducidas por interferón. Entretanto, se han encontrado un gran número de citocinas, hormonas y factores de crecimiento que activan a las JAKs y STATs. Las proteínas JAK son la única clase de proteínas con actividad de tirosina cinasa que se asocian con receptores de citosinas (Figura 1). En la unión del ligando, ellas activan a los miembros de la familia de Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STAT). (Valle, 2005)



**Figura 1: Interacción entre receptores de citoquinas y JAK2.** Los receptores de citocinas de Tipo I y II, se clasifican de acuerdo a la estructura tridimensional de sus ligandos, carecen de actividad intrínseca de tirosina quinasa y confían en el JAK asociado al receptor para transmitir sus señales al citoplasma. Los que modulan la actividad del sistema hematopoyético pertenecen a la clase I (entre ellos se destacan GM-CSFR: Receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, EPOR: receptor de eritropoyetina, TPOR: receptor de trombopoyetina). (Quintás-Cardama, 2011)

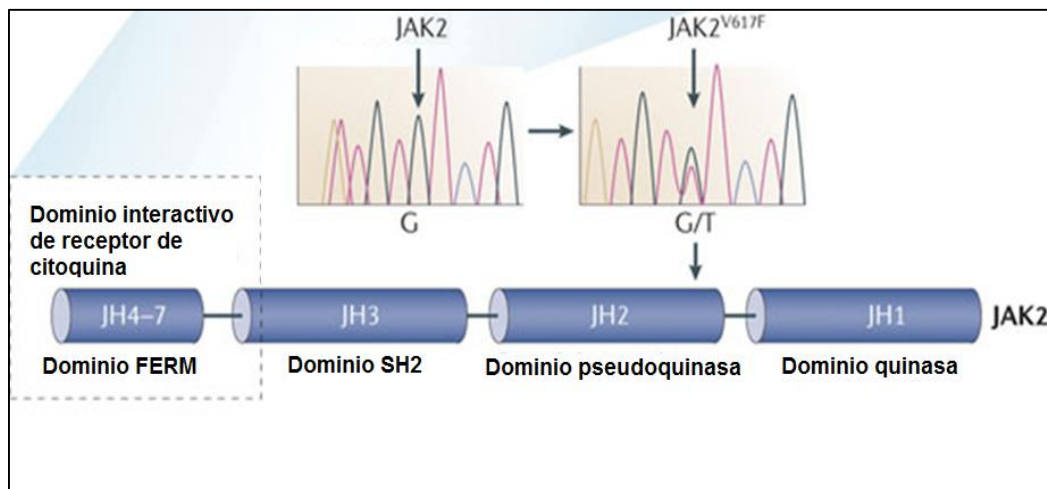


Hasta la fecha, se han identificado en los mamíferos cuatro miembros de la familia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2, todas ellas poseen más de 1000 aminoácidos y se encuentran en un rango de peso molecular que va desde 120 a 130 kDa) y siete factores STAT (STAT1-STAT6), con dos isoformas de STAT5, llamadas STAT5a y STAT5b, que existen como dos genes estrechamente relacionados. Cada receptor de citosina aparentemente se acopla a una serie específica de JAKs y STATs, aunque existe un traslapamiento sustancial entre los diferentes receptores en diversos contextos biológicos. (Valle, 2005)

## 6.2 Mutación JAK2 V617F

La mutación V617F en el gen *JAK2* está implicada en la génesis de algunos síndromes mieloproliferativos crónicos como la policitemia vera, la trombocitemia esencial y la mielofibrosis idiopática. Se ha valorado el papel diagnóstico de esta mutación en los SMP y se ha comparado con la formación espontánea de colonias eritroides. (Ramacha, 2006)

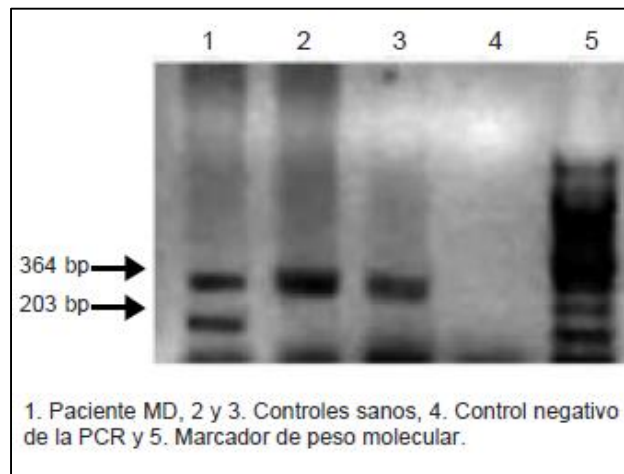
La mutación V617F, que genera la sustitución de una valina por una fenilalanina en la posición 617, debido a la sustitución de una guanina por una timina en el nucleótido 1849 del exón 14 del gen *JAK2* (Figura 2). (Quintás-Cardama, 2011)



**Figura 2: Dominios de homología Janus y mutación V617F.** La mutación JAK2 V617F surge de una única transversión de bases  $G \rightarrow T$  en el dominio pseudoquinasa de JAK2. Esta sustitución valina-a-fenilalanina en el codón 617 se cree que alterar la actividad auto inhibitoria del dominio pseudoquinasa. (Quintás-Cardama, 2011)

Esta se detecta a partir del ADN genómico previamente obtenido, PCR alelo específica. Esta PCR está diseñada de forma que se utilizan tres cebadores diferentes, denominados

JAK2R, JAK2F/IC y JAK2F. 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 3). (Lens, 2006)



**Figura 3: Mutación del JAK2 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** El paciente mostró un patrón con dos bandas. Por un lado, la banda control de 364 pb que también está presente en los dos controles sanos. Por otro, se amplificó también en el paciente un producto de 203 pb demostrando la presencia de la mutación. (Lens, 2006)

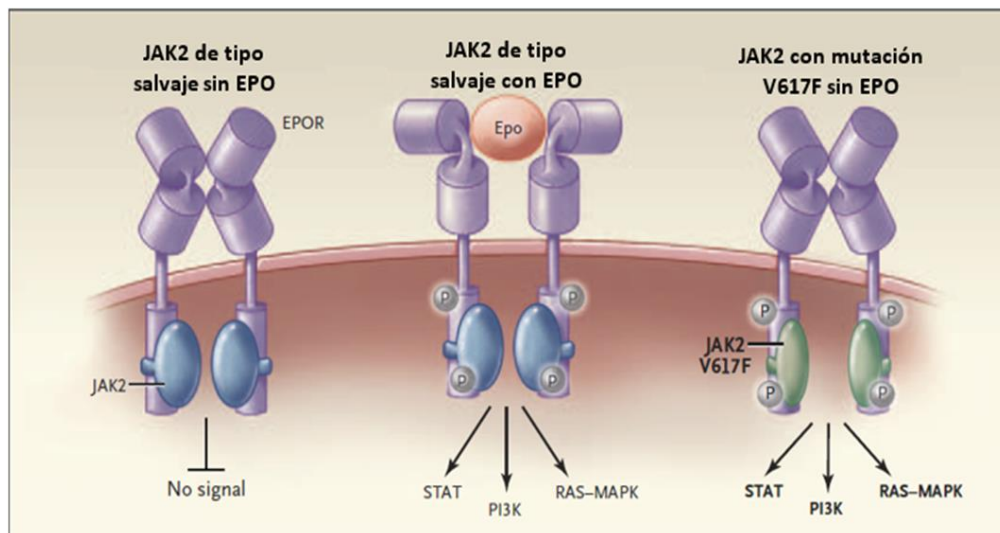
### 6.3 Activación de JAK2-Salvaje

La citoquinas se una al receptor induciendo la dimerización del receptor, que a su vez conduce a la participación de uno o más Janus quinasas citoplasmáticas. El JAK se activa a través de la fosforilación de tirosina en los dominios citoplasmáticos de receptores de citoquinas, lo que resulta en la activación de la señalización a través del reclutamiento del dominio SH2 que contiene proteínas complejo receptor, tales como los transductores de señal y activadores de la transcripción STAT3 y STAT5 (Figura 4). El JAK2 mediada por fosforilación de STAT conduce a la formación de homodímeros estables y heterodímeros a través de interacciones entre los dominios SH2 y residuos de tirosina fosforilados, precediendo a la translocación nuclear. En el núcleo, las moléculas STAT se unen

secuencias de ADN promotor afines, lo que resulta en la activación de la transcripción de genes que regulan la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. (Quintás-Cardama, 2011)

#### 6.4 Activación de JAK2-V617F

Cuando existe una mutación del gen JAK2, la cinasa mutante es capaz de fijarse al receptor de la citoquina en ausencia de esta, activándose por autofosforilización y uniéndose a las proteínas STAT con lo que la cascada de señales inductora de la proliferación se produce en ausencia del ligando activador (Figura 4) (Campbell, 2006). La señalización de JAK2 está regulada negativamente por supresor de la señalización de citoquinas, lo más importante SOCS1, pero en este caso no actúan sobre el JAK2 V617F. (Quintás-Cardama, 2011)



**Figura 4: Esquema de activación de JAK 2.** En ausencia de ligando, la eritropoyetina receptor se une JAK2 como un dímero inactivo en las células con la proteína JAK2 de tipo salvaje, la unión de la eritropoyetina a su receptor induce cambios conformacionales en el receptor, lo que resulta en la fosforilación del JAK. En las células con la mutación V617F, la señalización se incrementa constitutivamente, incluso en ausencia de eritropoyetina. (Campbell, 2006)

#### 6.5 Síndromes mieloproliferativos crónicos asociados a la mutación JAK2 V617F

##### 6.5.1 Policitemia vera (PV).

La PV es el resultado de una producción descontrolada de células sanguíneas, especialmente glóbulos rojos, como resultado de mutaciones adquiridas en las primeras etapas de una célula productora de sangre. La mayoría de los pacientes con PV no tienen

antecedentes familiares de la enfermedad. No obstante, en ocasiones hay más de un miembro de la familia con la enfermedad (Figura 5). (Verstovsek, 2012)

Se presenta habitualmente entre los 50 y 70 años, con ligero predominio en hombres (58%). Su evolución típica o clásica puede expresarse en 2 fases:

Fase de MI-post PV: la presencia de precursores inmaduros mieloides y/o dracriocitos en SP, la disminución de la Hb no relacionada al tratamiento, el aumento de LDH, la disminución de las plaquetas y el aumento del número de leucocitos y del tamaño del bazo, sugieren esta evolución. Existe una fase Preclínica de PV o “PV temprana”, caracterizado por masa eritrocitaria normal, valores de Hb y Hto en límite superior normal o levemente aumentado y con algunas de las alteraciones de PV. (Heller, 2012)

#### 6.5.2 Trombocitemia esencial (TE).

En la ET, existe principalmente una producción excesiva de células formadoras de plaquetas, llamadas "megacariocitos", en la médula ósea. El término "trombocitemia" designa un exceso de plaquetas en la sangre (Ver figura 5). El término "esencial" indica que el aumento en la cantidad de plaquetas es un problema inherente a la producción de células sanguíneas en la médula ósea. (Verstovsek, 2012)

La mayoría de los pacientes se presentan asintomáticos, pero los síntomas fundamentales son producto de fenómenos tromboembólicos y microvasculares. El riesgo de trombosis puede llegar hasta 50 % en pacientes con historia previa de trombosis y es mucho menor cuando está ausente este antecedente.

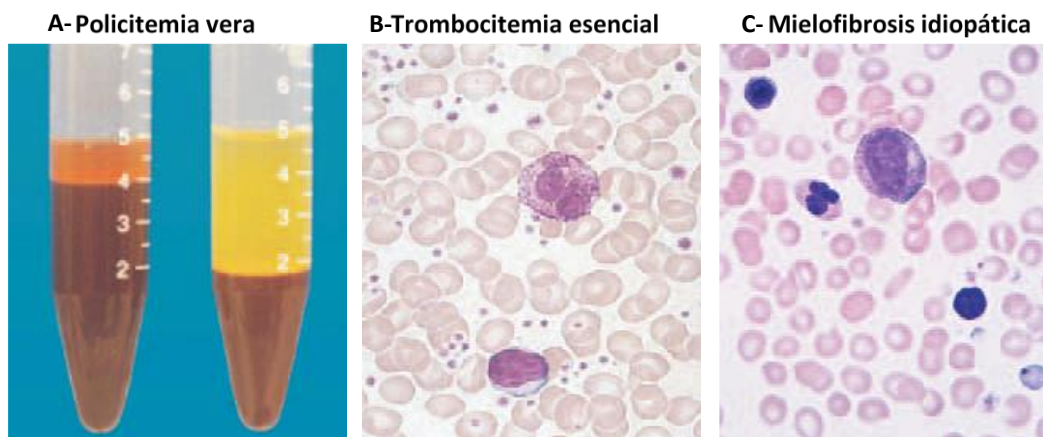
La expectativa de vida se señala igual que la población general, pero en pacientes jóvenes esta se ve disminuida, así como la calidad de vida. La progresión a una leucemia aguda es una posibilidad con el transcurso de los años y puede presentarse en su evolución natural o relacionada con el tipo de tratamiento utilizado. (Martinez, 2006)

#### 6.5.3 Mielofibrosis idiopática (MI).

Una característica importante y constante de la MI es la producción excesiva de “megacariocitos”, el término que se usa para referirse a las células gigantes de la médula ósea que se dividen en fragmentos y producen de cientos a miles de plaquetas (Figura 5).

En la MF, se producen megacariocitos adicionales, lo cual tiene como resultado la liberación de demasiadas plaquetas en la sangre y sustancias químicas llamadas “citocinas” en la médula. Las citocinas estimulan la producción de tejido fibroso en la médula. Paradójicamente la cantidad de megacariocitos puede volverse tan anormal que, en algunos pacientes, disminuye la producción de plaquetas. (Verstovsek, 2012)

Afecta normalmente a individuos mayores a 65 años, esta enfermedad acorta la supervivencia de los pacientes la mediana se acerca a los 7 años. Por otra parte en los pacientes jóvenes el curso de la enfermedad casi siempre es más agresivo que en los adultos. Alrededor de 25 % de los pacientes está asintomático al momento del diagnóstico, el cual se hace por la detección de la esplenomegalia o de las alteraciones hematológicas, en un examen médico por otra causa. (Besses, 2014)



**Figura 5: Principales rasgos clínicos de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos.** Policitemia vera se caracteriza por un aumento del hematocrito en la sangre periférica (tubo de ensayo de la izquierda); Trombocitemia esencial se caracteriza por un aumento en el número de plaquetas en la sangre periférica y un mayor número de megacariocitos en la médula ósea; Mielofibrosis idiopática se caracteriza por la presencia de eritroblastos, dracriocitos, mieloblastos, y la formación de fibras de colágeno en medula ósea. (Campbell, 2006).

### 6.6 Criterios diagnóstico de la OMS para PV, TE y MI

Los criterios diagnósticos de la OMS para 2008 PV, TE y MI fueron instigados por el descubrimiento de mutaciones JAK2 (JAK2V617F exón 14, mutaciones JAK2 exón 12) en prácticamente todos los pacientes con PV. Debido que JAK2 V617F es una neoplasia mielode específica y no se encuentra en otras causas de policitemia, se ha prestado como un marcador de diagnósticos sensibles para PV. (Soto, 2014)

Sin embargo, en el contexto de las neoplasias mieloides, JAK2V617F no es específico para PV y se encuentra en aproximadamente 50% de los pacientes con TE, 49-54% MF. Por lo tanto, la detección de mutaciones de JAK2V617F no se puede utilizar para distinguir una neoplasia mieloproliferativa de otra, pero sí complementar la histología en el diagnóstico de tanto TE y MI. (Tefferi, 2008)

La detección de JAK2V617F es actualmente la prueba inicial recomendado para la evaluación de un paciente con sospecha de PV. En este sentido, alentamos la determinación simultánea de nivel suero de eritropoyetina (Epo) con el fin de minimizar los resultados falsos positivos o falsos negativos de pruebas moleculares, y también se ocupan de la poco frecuente pero posible aparición de PV JAK2 V617F negativo es decir, es muy poco probable que la verdadera PV será a la vez JAK2 V617F negativo y mostrar niveles normal o elevada de Epo. Por otro lado, la detección de mutaciones de Mutación JAK2 exón 12 y el examen de médula ósea deben ser considerado en un paciente-JAK2V617F negativo que muestra nivel de Epo sérica inferior a la normal. (Tefferi, 2008)

Debido a JAK2V617F también se produce en aproximadamente el 50% de pacientes con TE o MI, es razonable incluir la detección de mutaciones en el estudio diagnóstico de ambos; la presencia de la mutación excluye la posibilidad de una neoplasia mieloproliferativa mientras que su ausencia no excluye un subyacente neoplasia mieloproliferativa. Como tal, el examen morfológico de médula ósea se requiere para hacer el diagnóstico de ambos TE y MI. (Tefferi, 2008)

### **6.7 Criterios diagnósticos propuestos para enfermedades mieloproliferativas con mutación JAK2.**

Campbell, (2006):

6.7.1 Policitemia Vera–JAK2 mutado: El diagnostico requiere la presencia de ambos criterios.

1. Hematocrito alto ( > 52 % en hombres o > 48 % en las mujeres) o un aumento de masa eritrocitaria ( > 25 % por encima del valor normal).
2. Mutación JAK2

6.7.2 Trombocitemia esencial-JAK2 mutado: El diagnóstico requiere la presencia de todos los criterios.

1. Conteo de plaquetas  $>450 \times 10^9/L$ .
2. Mutación JAK2.
3. Ningún otro cáncer mielóide, especialmente policitemia JAK2 - positivo, mielofibrosis, o mielodisplasia.

6.7.3 Mielofibrosis idiopática-JAK2 mutado: El diagnóstico requiere la presencia de los criterios 1 y 2, y al menos dos criterios del 3 al 7)

1. Reticulina grado 3 o superior ( en una escala de 0-4 )
2. La mutación en JAK2
3. esplenomegalia palpable
4. De lo contrario la anemia inexplicable (hemoglobina  $< 11,5$  g / litro para los hombres ;  $< 10$  g / l para las mujeres
5. Dracriocitos en sangre periférica.
6. Eritroblastos en sangre periférica (al menos 2 glóbulos rojos nucleados) o células mieloides inmaduras.
7. Síntomas sistémicos (sudores nocturnos, pérdida de peso  $> 10$  % durante 6 meses, o dolor óseo difuso).
8. Evidencia histológica de la hematopoyesis extra medular.

## **6.8 Mutación JAK-2 (Exón 12)**

En el año 2007 un grupo de investigadores identificaron cuatro mutaciones somáticas de ganancia función que afectan al JAK2 exón 12 en 10 pacientes V617F-negativos. Aquellos con mutaciones en JAK2 exón 12 presentaron una eritrocitosis aislada, morfología de la médula ósea distintiva, y los niveles de eritropoyetina en suero también reducida. Las colonias eritroides podían crecer en ausencia de eritropoyetina exógena. Las células BaF3 (Células dependientes de IL-3) que expresan el receptor de la eritropoyetina y también llevan mutaciones en el exón 12 podrían proliferar en ausencia de IL-3. También se exhibe un aumento de la fosforilación de JAK2 y de la quinasa regulada extracelular 1 y 2, en comparación con las células de tipo JAK2-salvaje o JAK2 V617F. (Scott, 2007)

En los casos donde no se detecta la mutación V617F, especialmente en sospecha de policitemia vera, podría estar indicado clínicamente un mayor estudio de JAK2. Se han detectado mutaciones que afectan al exón 12 de JAK2, que pueden ser de tipo puntual o pequeñas inserciones o deleciones. La mayoría de estas alteraciones se asocian con policitemia vera (aproximadamente un 5% de los casos de policitemia vera) y en menor frecuencia aún en mielofibrosis idiopática. (Scott, 2007)

## **6.9 Fundamento de la 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 ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: taq polimerasa.

### **6.9.1 Tipos de PCR:**

PCR tiempo real: La Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, también conocida como Real Time PCR (RT-PCR) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre. Este método revolucionó la forma en que se usaba la técnica de PCR para cuantificación de ADN y ARN. El RT-PCR usa moléculas de un reportero fluorescente para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados. (Stock, 2006)

PCR in situ. La hibridación in situ (ISH) ha demostrado ser una herramienta molecular muy importante en diagnóstico y la investigación y ha avanzado perceptiblemente el estudio de la estructura y de la expresión del gen a nivel de células individuales. Sin embargo, la utilidad de ISH es limitada por la sensibilidad de cerca de 20 copias del mRNA por la célula, un obstáculo de la detección que pueda ahora ser superado gracias a las nuevas tecnologías. (Espinoza, 2001)



Multiplex PCR. Es una PCR en la cual hay múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da una serie de productos. Éstos pueden verse como múltiples bandas en un gel de azarosa. Se usa frecuentemente en diagnóstico médico. Ahorra templado, tiempo y gastos. Requiere una cuidadosa optimización Nested PCR Consiste en dos procesos de amplificación sucesivos, de forma que en la segunda PCR se utilizan unos primers contenidos en la secuencia amplificada en la primera reacción. Es decir, el producto de amplificación de la primera PCR es el molde de la segunda. Se aplica cuando se quiere mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica, especialmente en el caso de muestras de baja calidad o con un pequeño número de copias de la secuencia a amplificar. (Stock, 2006)

PCR punto final: La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células, esta amplificación se lleva cabo en un determinado número de ciclos. (Tamay, 2013)

La PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. A continuación se describen cada una de las etapas:

#### 6.9.2 Desnaturalización:

Las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. (Tamay, 2013)

#### 6.9.3 Hibridación:

Las reacciones se enfrían con rapidez a una temperatura que puede variar entre 50-65 °C y se incuban a esta temperatura durante un periodo de entre 30s a 1 minuto para que los cebadores se unan a las secuencias complementarias en las cadenas molde. Los cebadores son fragmentos cortos de ADN, entre 15 y 35 nucleótidos, de secuencia inversa y complementaria a los extremos de la región de ADN que va a copiarse. Son además

específicos, de modo que se unen exclusivamente a los extremos del fragmento de ADN a amplificar, y no se unen a ninguna otra secuencia de ADN cercana. (Espinoza, 2001)

#### 6.9.3.1 Interacciones primer-primer.

El término "primer-dímer" o "dímeros de primers" se refieren a la acumulación de productos pequeños de PCR y que miden aproximadamente igual que dos primers unidos uno a continuación de otro estos se alinean en el proceso de hibridación. Incluso en reacciones muy optimizadas, se pueden obtener pequeñas cantidades de estos artefactos, pero en elevadas cantidades pueden disminuir la sensibilidad de la reacción al competir por los componentes de la misma. Normalmente, estos artefactos se pueden evitar eliminando la complementariedad en los extremos 3' (aunque sea en un solo nucleótido) de los dos primers utilizados para la amplificación o disminuyendo la concentración de los mismos en la reacción. (Vallat, 2006)

#### 6.9.4 Elongación:

En esta etapa, la *Taq* polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. (Tamay, 2013)

La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. El resultado final es un gran número de fragmentos de ADN flanqueados por los cebadores, que se obtienen en apenas unas horas (después de 30 ciclos, cada molécula de ADN molde inicial se habrá copiado más de 1000 millones de veces). (Tamay, 2013)

Los resultados de la PCR se analizan habitualmente mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. En esta técnica, la aplicación de un campo eléctrico permite la separación a través de un soporte sólido (gel de agarosa) de moléculas cargadas en función de su tamaño. Las moléculas más pequeñas avanzarán más en el gel y las moléculas más grandes avanzarán menos. El ADN tiene carga negativa y migrará desde el polo negativo hacia el polo positivo. La separación simultánea, en diferentes pocillos del gel, de los productos de PCR y de un marcador de peso molecular con fragmentos de ADN de tamaño conocido, permite determinar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR. (Espinoza, 2001)

## **6.10 Ensayos de diagnóstico molecular**

Cuando se realizan análisis diagnósticos de material clínico es importante producir datos de buena calidad.

Para esto, hay que cumplir algunos criterios clave. Es necesario establecer los sistemas de garantía de calidad (GC) y de control de calidad (CC), es decir, un juego de protocolos de calidad, incluyendo el empleo de muestras de control, que aseguren que el sistema está funcionando adecuadamente y que confirme la calidad de los datos. En muchos laboratorios de todo el mundo ya se han establecido los sistemas GC y CC y se dispone de personal adiestrado y competente. La validación de los ensayos es otro factor fundamental para garantizar que los resultados de las pruebas reflejan el estado real de las muestras. (Burkhardt, 2000)

### 6.10.1 Determinación de los parámetros esenciales de control

Durante la optimización de la prueba PCR, también se puede estimar la resistencia del método a ser afectado por pequeños cambios en los parámetros principales. La introducción de variables intencionadas en el proceso de validación caracterizará los parámetros fundamentales de la prueba. Los ejemplos de tales parámetros son: los tiempos y temperaturas de incubación, las concentraciones de tampones, los cebadores, MgCl<sub>2</sub>, etc., pH, cantidades de otros componentes añadidos (por ejemplo dNTP, albúmina de suero bovino, etc.). La caracterización de dichos parámetros de control es crucial para la identificación de los puntos críticos que deben controlarse correctamente en el ensayo. (Burkhardt, 2000)

### 6.10.2 Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad son dos parámetros importantes de la precisión de un ensayo. La repetibilidad se mide como el grado de concordancia entre las réplicas probadas durante la realización de un ensayo y las probadas en distintas realizaciones del mismo

ensayo. La reproducibilidad se determina utilizando un ensayo idéntico (protocolo, reactivos y controles) en diferentes laboratorios. (Llamosa, 2007)

#### 6.10.2.1 Repetibilidad de los resultados de las mediciones:

Cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud por medir, efectuadas en las mismas condiciones de medición.

1. Estas condiciones se llaman condiciones de repetibilidad.
2. Las condiciones de repetibilidad incluyen: El mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones, el mismo lugar y repetición dentro de un período de tiempo corto.
3. La repetibilidad se puede expresar en forma cuantitativa, en función de las características de dispersión de los resultados. (Llamosa, 2007)

#### 6.10.2.2 Reproducibilidad de los resultados de mediciones:

Cercanía entre los resultados de las mediciones de la misma magnitud por medir, efectuada bajo condiciones de medición diferentes.

1. Para que una expresión de la reproducibilidad sea válida, es necesario especificar las condiciones que cambian.
2. Las condiciones que cambian pueden ser entre otras: El principio de medición, el método de medición, el observador, el instrumento de medición, el patrón de referencia, el lugar, las condiciones de uso y el tiempo.
3. La reproducibilidad se puede expresar en forma cuantitativa, en función de las características de dispersión de los resultados.
4. Los resultados considerados aquí son generalmente los resultados corregidos. (Llamosa, 2007)

### 6.10.3 Sensibilidad y Especificidad analítica

La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo (Pita Fernández, 2003).. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. Compara el número de negativos verdaderos con todas las muestras de pacientes cuyos resultados debieron de ser negativos, esta se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Donde VP es verdaderos positivos y FN falsos negativos.

El valor que puede asumir la sensibilidad varía del 0 al 1 (100%), es decir, cuanto más alto es el valor, hay una mejor capacidad en la detección de enfermos por medio de la prueba. Una sensibilidad baja produce pérdida de casos que pudieran ser tratados, siendo más seria la situación de que a mayor gravedad de padecimiento dejar a pacientes enfermos como fuente de infección en la comunidad representaría un costo alto. No existe un nivel estándar de sensibilidad que determine que una prueba sea aceptable.

Por otra parte la especificidad o “fracción de verdaderos negativos (FVN)”, es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo (Pita Fernández, 2003).. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos, la especificidad se calcularía de la siguiente manera:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Donde VN, serían los verdaderos negativos; y FP, los falsos positivos

Al igual que la sensibilidad, el valor de la especificidad varía del 0 al 1 (100%), lo que significa que cuanto mayor sea el valor mayor capacidad de detección de sujetos sanos por la prueba.

## VII. DISEÑO METODOLÓGICO

### **Tipo de estudio:**

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con el propósito de estandarizar la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendido en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional: Hospital Escuela “Roberto Calderón” y servicios de flebotomía terapéutica en “Banco Sangre” Cruz Roja nicaragüense, en el período febrero-octubre 2015.

### **Universo y muestra:**

El universo lo conformaron las muestras de los pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, la muestra fueron 6 pacientes.

Se empleó muestreo no probabilístico por conveniencia y se aplicaran los siguientes criterios de selección.

### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos (Policitemia vera, mielofibrosis idiopática, Trombocitemia esencial), que asisten a los servicios hematología en el periodo febrero–octubre 2015.
- Pacientes que se realicen flebotomías terapéuticas.
- Paciente acepte participar en el estudio.

### **Criterios de exclusión:**

- Pacientes con otros síndromes hematológicos.
- Pacientes que no acepten participar en el estudio.
- Pacientes que asistan a la consulta fuera del periodo que abarca el estudio.

Para la realización de este estudio se solicitó a los hospitales el acceso a expedientes de pacientes, luego de seleccionados los pacientes se les entrego carta de consentimiento informado y se procederá al llenado de “ficha de solicitud de análisis molecular”. A ambas partes se les garantizó determinaciones de calidad y la mayor confidencialidad.

Para el desarrollo de la técnica, se realizó en el laboratorio de biología molecular del Instituto Politécnico de la Salud, POLISAL-UNAN, Mangua; para la validación de los resultados se utilizó control positivo (mutado) de JAK2 V617F proporcionado por el Dr. Carlos Santamaría, Hospital Nacional del Niño "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica.

### **Procedimientos de referencia.**

Se utilizó como referencia para la estandarización de la técnica, la detección de la mutación V617F descrita en la publicación: D. Lens (2007) *Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso, Uruguay.*(Lens, 2007)

Una vez realizadas las PCR fueron analizadas mediante el uso de un retro iluminador ultravioleta, cámara con campana para retro iluminador y sistema digital de documentación de geles y se procedió al diseño de graficas en Microsoft Office Excel y la edición del documento haciendo uso del software Microsoft Office Word.

### **Muestras y condiciones de transporte.**

Para el procedimiento se utilizaron muestras de sangre total con anticoagulante EDTA, las muestras fueron almacenadas hasta 3 días a 4°C antes de su transporte, el cual se realizó bajo refrigeración con la utilización de termo, refrigerante, gradilla y termómetro para verificar la temperatura.

Como control positivo (mutado) se utilizó una muestra positiva a la mutación diagnosticada en el laboratorio molecular del Hospital Nacional del Niño "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica.

Como control negativo (no mutado) se utilizó muestra de persona sana sin ningún signo o síntoma de síndrome mieloproliferativo y que se encuentre fuera del rango de edades que comprenden los mismos.

## **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl de sangre total con EDTA, mediante la utilización del QIAamp *DNA Mini Kit*, siguiendo el protocolo DNA Purification from Blood or Body Fluit (Spin Protocol) indicados en el manual QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (QIAEN, 2012).

### **Procedimiento técnico de referencia QIAEN, 2012 para la extracción de ADN.**

1. En un Eppi de 1.5mL colocar 20 µl Proteasa K.
2. 200 µl de Mx sangre total.
3. 200 µl buffer AL mezclar 15" Vortex.
4. Incubar a 56°C 10 minutos.
5. Centrifugar breve.
6. 200 µl etanol mezclar 15" Vortex, centrifugar breve.
7. Pasar del eppi a una columna.
8. Centrifugar 6,000-8,000 RPM por 1 min.
9. Descartar el tubo colector y pasar a otro colector
10. 500 µl Buffer AW1 centrifugar 6,000-8,000 RPM/ 1min.
11. Descartar el tubo colector y pasar a otro colector.
12. 500 µl AW2 centrifugar 14,000 RPM/ 3 min.
13. Descartar el contenido del filtro, reutilizar el tubo colector y centrifugar 14,000 RPM/ 1 min.
14. Descartar tubo colector, trasvasar contenido de columna en un eppi nuevo.
15. 200 µl Buffer AE (Elución) o agua destilada.
16. Dejar en reposo 1 min.
17. Centrifugar a 8,000 RPM 1 min.
18. Cuantificar ADN (Nanodrop).
19. Guardar ADN a -20°C.



## **Cuantificación de ADN**

El ADN obtenido se resuspendió en el Buffer AE y se cuantificó mediante el uso del Espectrofotómetro NanoDrop. Para posteriores análisis, el material genético se almacenó a -20°C, la concentración mínima para el procesamiento será de 18.5 ng/ul.

## **Estandarización de Protocolo PCR punto final.**

### **Amplificación mediante PCR punto final.**

Para la amplificación del ADN se utilizaron los primers y metodología descritas en el documento de base Lens (2007), utilizando lo siguiente:

#### **Primers:**

**JAK2 Forward** AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT

**JAK2 F I/C** ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG GAG AGG

**JAK2 R** CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA

El primer 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. Se obtendrá un producto de 364 pb con los primers JAK2F/IC y JAK2R, en los pacientes sanos. En los pacientes que presentan la mutación en estudio se obtendrá un producto de 203 pb utilizando los primers JAK2F y JAK2R.

#### **Concentraciones de reactivos y programa de PCR:**

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 50 µl utilizando 500 ng de ADN, 200 µM/L de cada dNTPs, 1 µM de Taq polimerasa y 5 µl de buffer Y 10x conteniendo 2mM de MgCl, 0,5 µM de los Primers JAK2 F y JAK2 F/IC y 1 µM del Primers JAK2 R. El programa de PCR utilizado consta de 35 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.

## **Verificación de producto de PCR**

La verificación del producto de PCR esperado se realizó en un gel de agarosa a 1.5 % teñido con gel red, corrido a voltaje constante de 120V por 1 hora.

### **Parámetros de funcionamiento de la técnica:**

#### **Sensibilidad y Especificidad analítica**

Se realizó por quintuplicados de los controles mutados y no mutados, para verificar la probabilidad de clasificar a un individuo sano (Especificidad) o clasificar a un individuo portador de la mutación (Sensibilidad).

Se utilizaran las siguientes fórmulas para calcularlas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}, \quad \text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

#### **Repetibilidad del ensayo**

Para evaluar la repetibilidad se analizaron 3 muestras (una positiva y 2 negativas) a las cuales se le extrajo ADN y se les realizó la amplificación en 3 alícuotas por separado, completando así el triplicado de las mismas. Dicho análisis se llevó a cabo por tres operarios distintos empleando un solo kit de extracción de ADN, mismo lote de primers, mismo programa de PCR y condiciones de electroforesis.

#### **Límite de detección.**

El límite de detección se estimó empleado un estudio de dilución seriadas a punto final hasta que el ensayo ya no detecto el ADN blanco.

### **Detección de mutación en pacientes:**

Una vez estandarizada la técnica y evaluado la precisión del ensayo se procesó con esos protocolos las muestras de pacientes con diagnóstico clínico de síndromes mieloproliferativos crónicos.

### VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

<b>Variable</b>	<b>Subvariables</b>	<b>Criterios</b>	<b>Indicador</b>	<b>Valor</b>
Extracción de ADN	Temperatura de incubación	Pueden afectar las concentraciones, estabilidad y calidad del ADN	15-25 °C	Si-No
	Buffer Elución		56°C	
	Tiempos de incubación	Puede afectar la purificación del ADN	1min 5min	Si-No
	Buffer Elución			
	Volumen de Buffer Elución	Al disminuir el volumen de Buffer de elución se puede aumentar la concentración de ADN	30ul 50ul 100ul 500ul	Si-No
<b>Variable</b>	<b>Subvariables</b>	<b>Criterios</b>	<b>Indicador</b>	<b>Valor</b>
PCR y Electroforesis	Concentración de primers	El aumento de la concentración puede aumentar la probabilidad de formación de dímeros de primers	0.5 uM 0.3 uM	Si-No
	Concentración de agarosa	En función de la concentración de agarosa o tampón, se pueden separar segmentos de ADN que contengan de 20 a 50 000 pb.	1.0 % 1.5 % 2.0%	Si-No
	Voltaje de	El incremento	80 V	Si-No

	corrida de electroforesis	del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel pero puede causar fraccionamiento del mismo	90 V 100V 120 V	
	Tiempo de corrida de electroforesis	Es inversamente proporcional al voltaje de corrida.	50 min 60 min 100 min 110 min	Si-No
<b>VARIABLE: REPETIBILIDAD DEL ENSAYO</b>				
<b>Variable</b>	<b>Subvariables</b>	<b>Criterios</b>	<b>Indicador</b>	<b>Valor</b>
Parámetros de funcionamiento de la técnica.	Repetibilidad del ensayo	Cercanía entre los resultados de las, efectuados por distintos operarios	Porcentaje de repetibilidad	Si-No
	Límite de detección	Cantidad de copias de ADN que pueden detectarse a partir de diluciones de ADN	Amplificación de ADN Blanco	Si-No
	Especificidad	Probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano	Porcentaje de Sensibilidad	Si-No

	Sensibilidad	Probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo	Porcentaje de Especificidad	Si-No
	<b>Subvariables</b>	<b>Criterios</b>	<b>Indicador</b>	<b>Valor</b>
Detección de mutación a partir de PCR estandarizada	Diagnóstico clínico del paciente	La mutación JAK2 V617F está presente en 95% pacientes con PV 50% de los pacientes con TE, 49-54% MI	Policitemia vera  Mielofibrosis idiopática  Trombocitemia esencial	Si-No
	Presencia de la mutación	Detección a partir del ADN genómico previamente obtenido, mediante PCR	Banda 203 pb Banda 364 pb	Mutado No mutado

## IX. RESULTADOS.

### 9.1 Estandarización de la extracción de ADN

**Ensayo A:** Previo a estos ensayos el protocolo QIAEN, (2012) se modificó reduciendo el volumen del buffer de elución (AE) de 200  $\mu$ l a 50 $\mu$ l y tomando en cuenta esta modificación se realizó la primera extracción de ADN de las muestras.

Resultado: **15-009:** 29.6 ng/ $\mu$ l, **15-010:** 42.9 ng/ $\mu$ l, **15-013:** 14.6 ng/ $\mu$ l.

**Ensayo B:** Se disminuyó el volumen del buffer de elución de 50  $\mu$ l a 30  $\mu$ l y no se modificaron más parámetros.

Resultado: **15-009:** 75.5 ng/ $\mu$ l, **15-010:** 106.8 ng/ $\mu$ l, **15-013:** 32.5 ng/ $\mu$ l.

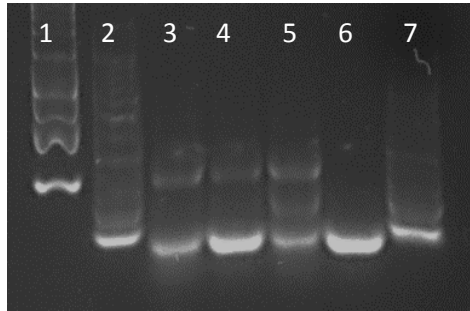
**Ensayo C:** Buffer de Elución precalentarlo a 37°C.

Resultado: **15-009:** 139.6 ng/ $\mu$ l, **15-010:** 118.5 ng/ $\mu$ l, **15-013:** 21.8 ng/ $\mu$ l

**Ensayo D:** Aumentó de tiempo con el buffer de elución de 1 min a 5 min. Resultado: **15-009:** 143 ng/ $\mu$ l, **15-010:** 153.7 ng/ $\mu$ l, **15-013:** 39.9 ng/ $\mu$ l.

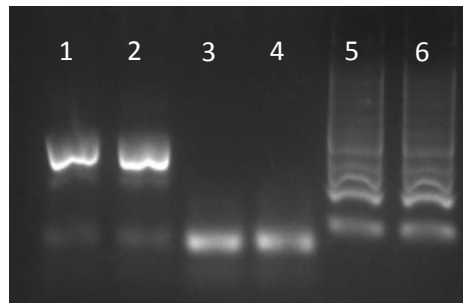
### 9.2 Estandarización de la PCR:

**Ensayo 1:** Se realizó la PCR con las siguientes condiciones; volumen final de 50  $\mu$ l utilizando 500 ng de ADN, 200  $\mu$ M/L de cada dNTPs, 1  $\mu$ M de Taq polimerasa y 5  $\mu$ l de buffer Y 10x conteniendo 2mM de MgCl, 0,5  $\mu$ M de los Primers JAK2 F y JAK2 F/IC y 1  $\mu$ M del Primers JAK2 R. El programa de PCR utilizado fue de 35 ciclos, y se inició 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, no se realizó variación en los ciclos de acuerdo al documento de referencia. (Figura 6).



**Figura 6: Ensayo 1 para la estandarización de PCR y Electroforesis.** Se observa una migración inadecuada de Marcador molecular, formación excesiva de dímeros de primers, baja resolución de electroforesis. 1. Marcador molecular (MM), 2.MM, 3.Control no mutado (CNM), 4.CNM, 5. Control mutado (CM), 6. Control negativo (CN), 7.MM. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

**Ensayo 2:** Se realizó la PCR con las siguientes condiciones; volumen final de 50  $\mu$ l utilizando 500 ng de ADN, 200  $\mu$ M/L de cada dNTPs, 1  $\mu$ M de Taq polimerasa y 5  $\mu$ l de buffer Y 10x conteniendo 2mM de MgCl, 0,3  $\mu$ M de los Primers JAK2 F y JAK2 F/IC y 0.6  $\mu$ M del Primers JAK2 R. El programa de PCR no se modificó (Figura 7).



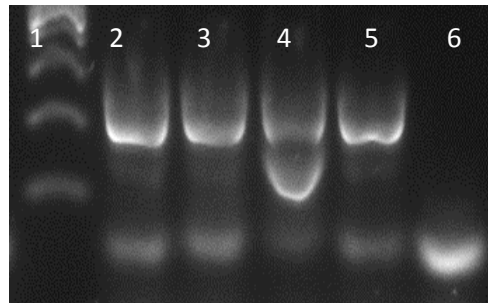
**Figura 7: Ensayo 2 para la estandarización de PCR y electroforesis.** Disminuyó considerablemente la formación de dímeros de primers. 1. CNM, 2.CNM, 3.CN, 4.CN, 5. MM, 6. MM. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

### **9.3 Estandarización de electroforesis en gel de agarosa:**

**Ensayo 1:** Se utilizó Agarosa a concentración de 2%, teñido con 3  $\mu$ l de Gel Red. Se cargó en los pozos 5  $\mu$ l de marcador molecular, 2  $\mu$ l Loading buffer y 5  $\mu$ l de Productos de PCR y se aplicó un potencial eléctrico de 120 V durante 1 hora (Figura 6).

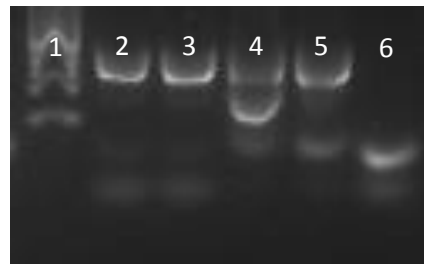
**Ensayo 2:** Se utilizó Agarosa a concentración de 1.5%, teñido con 3  $\mu$ l de Gel Red. No se modificaron volúmenes de Buffer de carga, Productos PCR y se aplicó un potencial eléctrico de 100 V durante 10 min y 120 V durante 1 hora (Figura 7).

**Ensayo 3:** En este ensayo no se realizaron modificaciones en las condiciones de electroforesis pero si en los volúmenes de Buffer de carga 1  $\mu$ l, Productos PCR, 3  $\mu$ l y marcador molecular 2.5  $\mu$ l (Figura 8).



**Figura 8: Ensayo 3 correspondiente a la primera corrida de pacientes.** Se observa un alargamiento en las bandas. **Interpretación resultados de pacientes:** 15-004: JAK2 V617F NO MUTADO, 15-005: JAK2 V617F NO MUTADO. 1. MM, 2.15-004, 3.15-005, 4.CM, 5. CNM, 6. CN. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

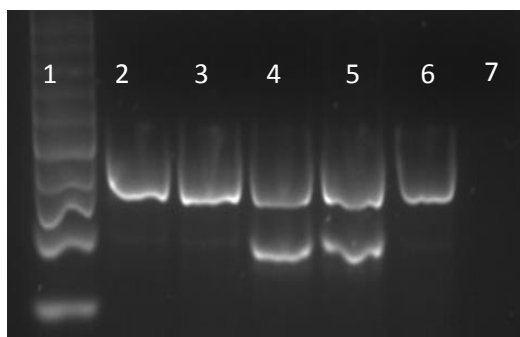
**Ensayo 4:** Se utilizó Agarosa a concentración de 2 %, teñido con 3  $\mu$ l de Gel Red. Se modificaron volúmenes de Buffer de carga 1.5  $\mu$ l, Productos PCR 3.5  $\mu$ l, Marcador molecular 2.5  $\mu$ l y se modificó el voltaje y tiempos de corrida, aplicando eléctrico de 80 V durante 20 min y 90 V durante 1 hora (Figura 9).



**Figura 9: Ensayo 4 Disminución de alargamiento de bandas.** Resultado: Mayor estabilidad de las bandas evitando su alargamiento, MM con migración inadecuada. 1. MM, 2.15-004, 3.15-005, 4.CM, 5. CNM, 6. CN. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

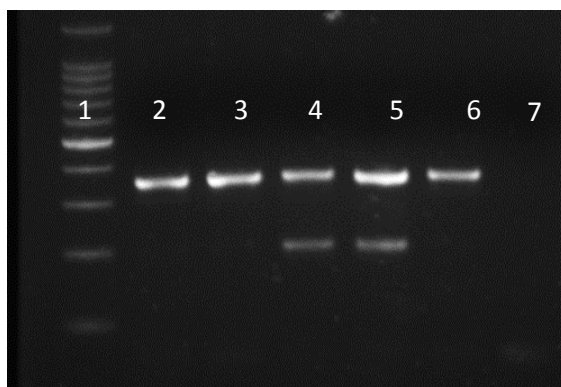


**Ensayo 5:** Se utilizó Agarosa a concentración de 2 %, teñido con 3  $\mu$ l de Gel Red. No se modificaron volúmenes de Buffer de carga 1.5  $\mu$ l, Productos PCR 3.5  $\mu$ l, pero si el volumen del Marcador molecular a 5  $\mu$ l y se aplicando eléctrico de 80 V durante 20 min y 90 V durante 1 hora (Figura 10).



**Figura 10: Ensayo 5 correspondiente a la segunda corrida de pacientes.** Se observa un mejor funcionamiento de MM. **Interpretación resultados de pacientes:** 15-009: JAK2 V617F NO MUTADO, 15-010: JAK2 V617F NO MUTADO, 15-013: JAK2 V617F MUTADO. 1. MM, 2.15-009, 3.15-010, 4.15-013, 5. CM, 6. CNM, 7.CN. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

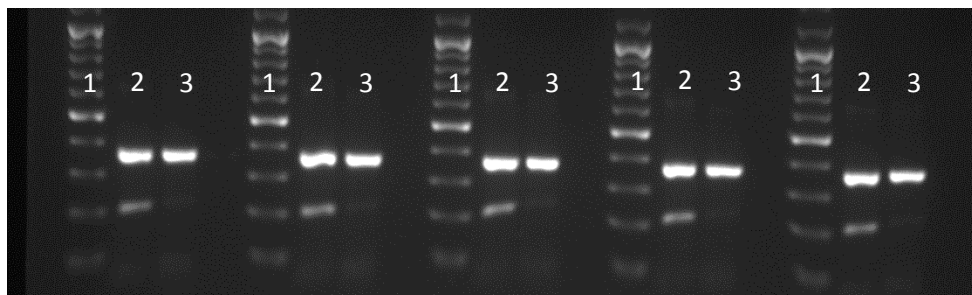
**Ensayo 6:** Las condiciones fueron las mismas que en el ensayo número 5 y la modificación radica en la sustitución de los 3  $\mu$ l de Gel Red con 3  $\mu$ l de bromuro de etidio (Figura 11).



**Figura 11: Ensayo 6 Introducción de bromuro de etidio.** Se observa una mayor resolución de las bandas. 1. MM, 2.15-009, 3.15-010, 4.15-013, 5. CM, 6. CNM, 7.CN. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

#### 9.4 Determinación de la sensibilidad y especificidad analítica:

**Ensayo de sensibilidad y especificidad:** Se utilizaron las condiciones estándares del ensayo 2 para la PCR y ensayo 6 para condiciones de electroforesis. Resultado: 100% de sensibilidad y especificidad (Figura 12).



**Figura 12: Ensayo de sensibilidad y especificidad.** El ensayo demuestra ser 100% sensible y específico, no hay variación en la amplificación, ya que el control mutado fue siempre positivo en todos los ensayos, al igual el control no mutado fue negativo. 1. MM, 2.CM, 3.CNM, 4.CN. Fuente: Bitácora (Anexo 3).

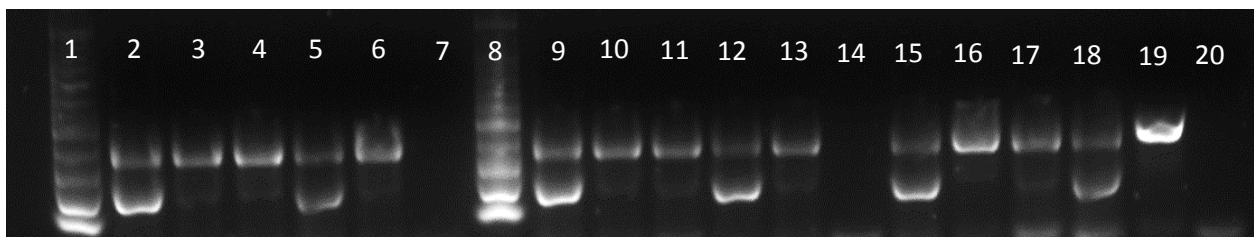
#### 9.5 Repetibilidad de la detección:

Para evaluar la repetibilidad se analizaron 3 muestras (una positiva y 2 negativas) con resultados en el ensayo 5, a las cuales se le extrajo ADN y se les realizó la amplificación en 3 alícuotas por separado (Figura 13).

**15009:** Policitemia vera (No mutado)

**15010:** Policitemia vera (No mutado)

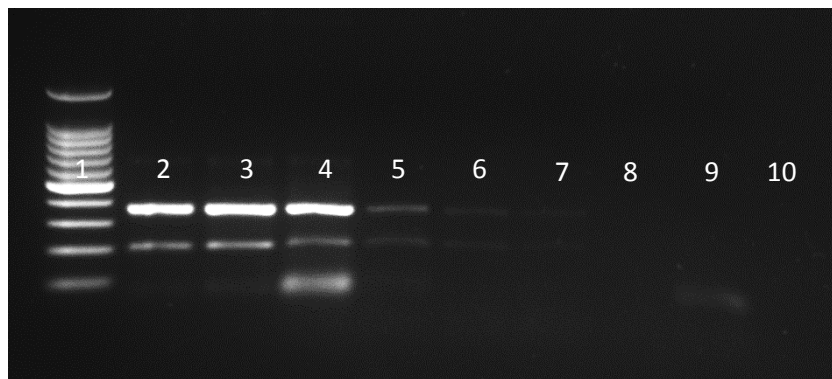
**15013:** Policitemia vera (Mutado)



**Figura 13: Ensayo de Repetibilidad de la detección.** La detección de la mutación es 100% repetible, ya que en ninguna de las repeticiones realizadas por los tres investigadores se evidenció alguna discrepancia. 1. MM, 2.15-013, 3.15-010, 4.15-009, 5. CM, 6. CNM, 7.CN, 8. MM, 9.15-013, 10.15-010, 11.15-009, 12. CM, 13. CNM, 14.CN, 15.15-013, 16.15-010, 17.15-009, 18. CM, 19. CNM, 20.CN. Fuente: Bitácora (Anexo 3).

## 9.6 Límite de detección:

El límite de detección se estimó empleado un estudio de dilución seriadas a punto final hasta que el ensayo ya no detecto el ADN blanco (Figura 14).



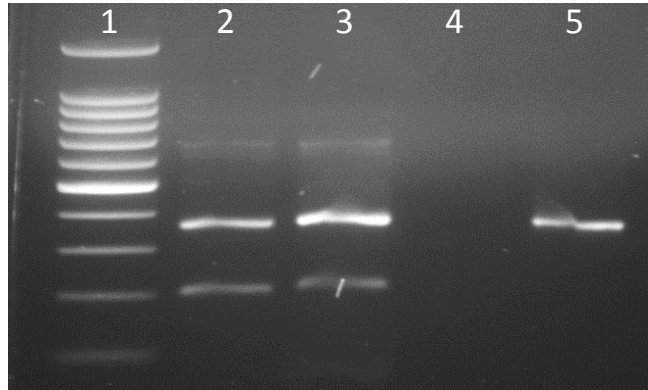
**Figura 14: Ensayo límite de detección:** La concentración mínima de ADN en la cual la amplificación mediante PCR es óptimo y permite la visualización de las bandas en la agarosa de forma clara es de 125 ng (Banda 4). 1. MM, 2.CM (500 ng ADN), 3.CM (250 ng ADN), 4.CM (125 ng ADN), 5.CM (62.5 ng ADN), 6.CM (31.25 ng ADN), 7.CM (15.62 ng ADN), 8.CM (7.81 ng ADN), 9.CM (3.96 ng ADN), 10.CN. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

## 9.7 Detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes:

Durante el proceso de estandarización y detección de la mutación en pacientes se analizaron 6 muestras correspondientes a pacientes con diagnóstico clínico de síndromes mieloproliferativos crónicos (Policitemia vera, Trombocitemia esencial).

### Resultados:

<b>Código:</b>	<b>Sospecha clínica:</b>	<b>Detección de mutación:</b>
15-004 Ensayo 3(Figura 8)	Policitemia vera.	No mutado
15-005 Ensayo 3(Figura 8)	Trombocitosis esencial.	No mutado
15-009 Ensayo 5(Figura 10)	Policitemia vera	No mutado
15-010 Ensayo 5(Figura 10)	Policitemia vera	No mutado
15-013 Ensayo 5(Figura 10)	Policitemia vera	Mutado
15-015 (Figura 15)	Policitemia vera	Mutado

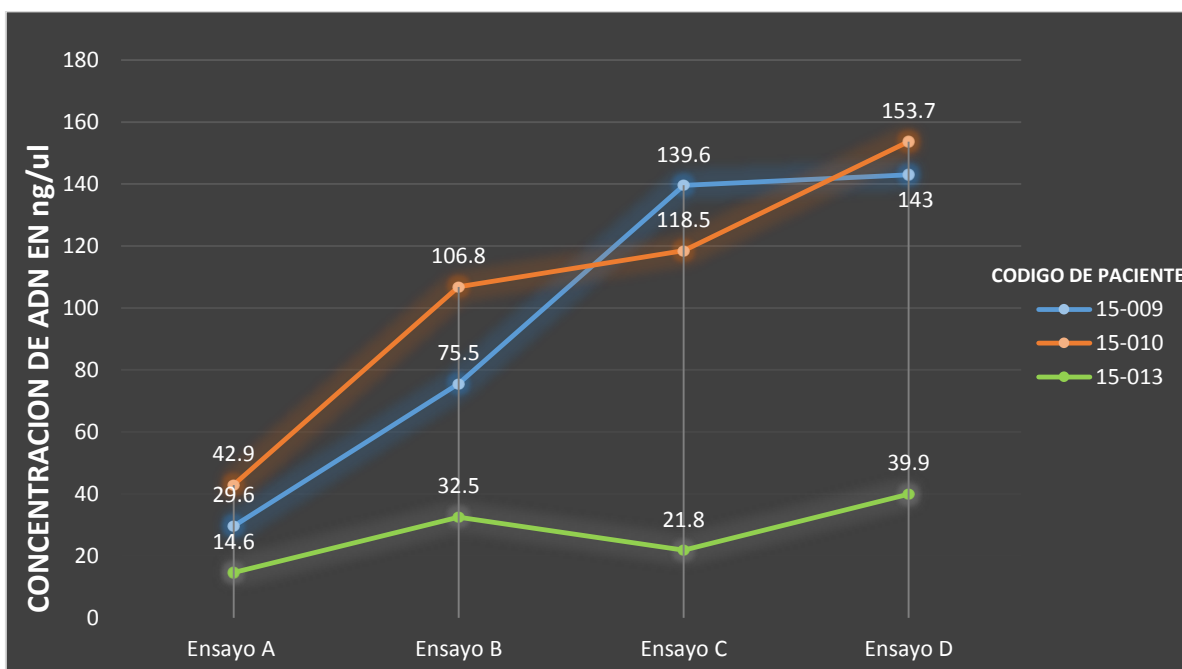


**Figura 15: Detección de JAK2 V617F en pacientes con SMPC:** Se realizó la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de SMPC. 15-015: JAK2 V617F MUTADO. 1. MM, 2.15-015, 3.15-CM, 4.CN, 5. CNM. **Fuente: Bitácora (Anexo 3).**

## X. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 10.1 Estandarización de la extracción de ADN

La estandarización de la extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud UNAN-Managua. Se realizaron 4 ensayos para extraer y aumentar la concentración del material genético extraído de la muestra del paciente (Gráfico 1), en especial los que reciben tratamientos que disminuyen la cantidad de células sanguíneas, en cada ensayo se realizaron modificaciones al protocolo QIAEN, (2012).



**Gráfico 1: Estandarización de la extracción de ADN.** Muestra los ensayos realizados para el aumento de extracción de material genético en muestras sanguíneas, en el eje X se presentan los ensayos realizados y en el eje Y las concentraciones de ADN medidas en el espectrofotómetro NanoDrop, los distintos colores representan los códigos de pacientes utilizados para proteger la identidad de los mismos. **Fuente: Anexos Tabla 1.**

**Ensayo A:** Los resultados de este ensayo reflejan una baja concentración de ADN posterior a la extracción, en pacientes como el 15-013 que reciben terapias con Hidroxiurea es un gran problema ya esto no permitirá almacenar una alícuota de ADN para estudios posteriores o reclamos de resultados.

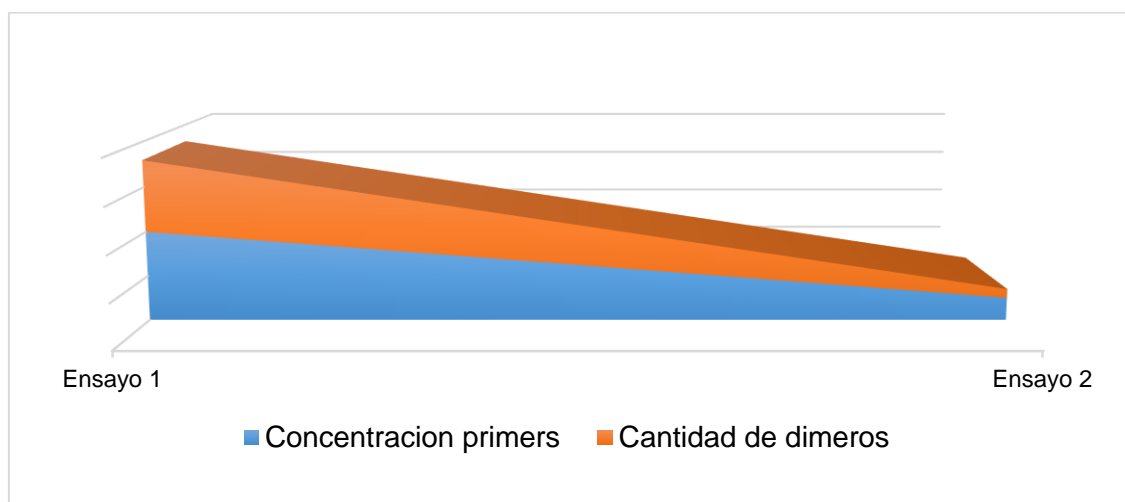
**Ensayo B:** Se disminuyó nuevamente el volumen del buffer de elución de 50 ul a 30 ul y no se modificaron más parámetros. Los resultados obtenidos fue un aumento en más del 100% en la concentración de ADN extraído, resultado más que satisfactorio en pacientes que no reciben tratamientos, mientras que en pacientes como el 15-013 es necesario aumentar aún más la concentración de ADN.

**Ensayo C:** Buffer de Elución se decidió precalentarlo a 37°C antes de su utilización y se incubo como lo describe el protocolo QIAEN, (2012) por 1 minuto. En este ensayo destacamos un punto crítico de control, cerrar adecuadamente la tapa de los viales al momento de mezclar en vortex ya que la muestra 15-013 se derramo a lo cual se atribuye el descenso en la concentración de ADN, al contrario en las muestras 15-009 y 15-010 se obtuvo un aumento significativo en la extracción.

**Ensayo D:** Partiendo de las modificación del ensayo C, se aumentó el tiempo con el buffer de elución de 1 min a 5 min para permitir una mayor elución de la muestra previo a la centrifugación. Esta modificación permitió aumentar la extracción de material genético en todas las muestras destacando la 15-010, los resultados de este ensayo fueron satisfactorios en comparación al ensayo inicial por lo cual se considera el protocolo a seguir para las extracciones posteriores.

## 10.2 Estandarización de la PCR:

La estandarización de la PCR para la detección de la mutación JAK2 V617F se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud UNAN-Managua. Se logró disminuir la formación de dímeros de primers, mejorando en un 100% el rendimiento de la reacción (Gráfico 2). Se realizaron 2 ensayos, en los cuales solamente el segundo se realizó variantes en la metodología descritas en el documento de base Lens (2007).



**Gráfico 2: Estandarización de la PCR.** Muestra de manera cualitativa la relación entre la concentración de primer y la cantidad de dímeros en la reacción, es una relación de proporción directa, la solución a la formación de los dímeros fue la reducción en la cantidad de primers.  
**Fuente: Anexos Tabla 2.**

**Ensayo 1:** En este ensayo se obtuvo una excesiva producción de dímeros de primers, los cuales interfieren con la interpretación de los resultados haciendo casi imposible diferenciar entre los controles mutados y los no mutados (Figura 6).

**Ensayo 2:** Al tener una concentración aumentada de los primers se ocasiona una disminución en la especificidad y se manifiesta con la formación de dímeros de primers descritos en el ensayo 1. Para la reducción de estos productos inespecíficos se disminuyó la concentración de los Primers JAK2 F y JAK2 F/IC de 0,5  $\mu$ M a 0,3  $\mu$ M y la concentración

del Primers JAK2 R de 1  $\mu$ M a 0,6  $\mu$ M. Con esta modificación se mejoró enormemente la especificidad y el rendimiento de la reacción eliminando casi en su totalidad los dímeros de primers, facilitando así la interpretación de los resultados (Figura 7).

### 10.3 Estandarización de electroforesis en gel de agarosa:

La estandarización de la electroforesis en gel de agarosa consistió en realizar modificaciones en condiciones como la concentración de agarosa, el voltaje, tiempo de corrida, volúmenes de buffer de carga, volúmenes de productos de PCR y la tinción del gel con Gel red y bromuro de etidio.



**Gráfico 3: Estandarización de electroforesis en gel de agarosa.** El número de ensayos realizados para esta estandarización fueron 6, con las modificaciones de los distintos parámetros se obtuvo la mejor resolución de las bandas en la agarosa, con el ensayo 6 el cual se repitió un total de 4 veces.  
**Fuente: Anexos Tabla 3.**

**Ensayo 1:** En estas condiciones se obtuvo una baja resolución de electroforesis, las bandas no eran diferenciadas y no existía suficiente separación entre las mismas, debido a que el potencial eléctrico era muy elevado desde el inicio de la corrida y no permitía la alineación de las bandas (Figura 6).



**Ensayo 2:** Al iniciar la corrida con un bajo voltaje propiciamos el alineamiento del producto asegurando una mayor estabilidad al migrar por la agarosa. En estas condiciones se mejoró la resolución de las bandas en comparación con el ensayo inicial (Figura 7).

**Ensayo 3:** Al disminuir los volúmenes de marcadores y buffer de cargas, se obtuvo una mayor separación de las bandas sin modificar las condiciones de corrida pero las bandas toman un aspecto alargado, dificultando la verificación de su peso respecto al marcador molecular (Figura 8).

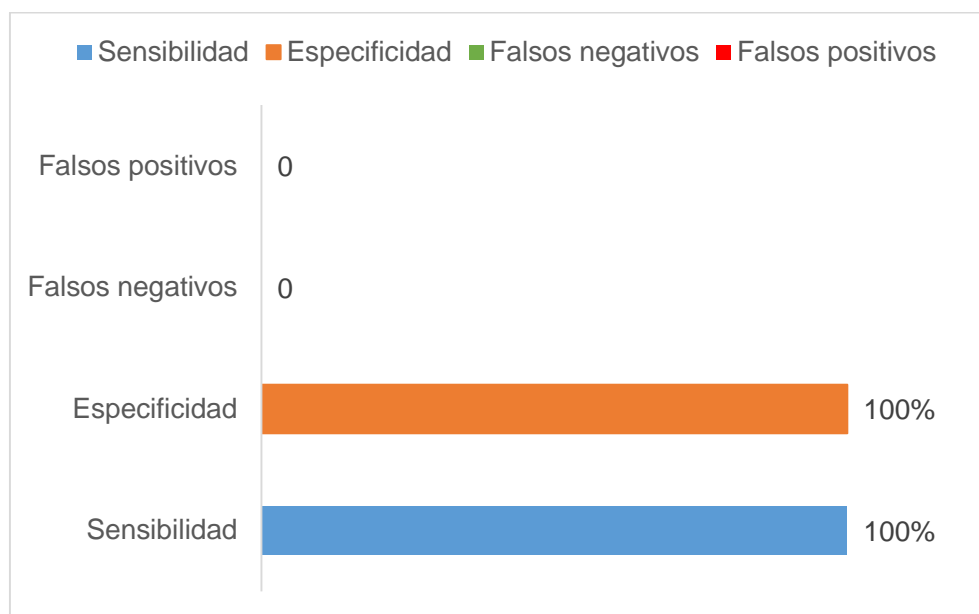
**Ensayo 4:** Al disminuir los voltajes y aumentar los volúmenes de productos y buffer de carga, obtenemos una mayor estabilidad de las bandas evitando su alargamiento, se observó una adecuada separación de las mismas, el marcador molecular no migro adecuadamente la migración fue reducida y la resolución del mismo disminuyo (Figura 9).

**Ensayo 5:** Aumentando el volumen del Marcador molecular sin modificar ningún otro aspecto de la corrida se obtuvo un mejor funcionamiento del mismo, una mayor estabilidad y separación de las bandas, mejorar notoriamente su resolución (Figura 10).

**Ensayo 6:** En este ensayo se introdujo la utilización de bromuro de etidio como tinción para el gel, procurando así un aumento en la resolución de las corridas (Figura 11). Utilizando el bromuro de etidio se obtuvo una excelente resolución de la electroforesis, el marcador molecular y productos de PCR se observan de forma clara facilitando la interpretación de resultados, con la introducción de esta tinción logramos una mejor resolución que la presentada en el procedimiento de referencia Lens (2007) (Ver Anexo 4).

#### 10.4 Determinación la sensibilidad y especificidad analítica:

Se realizó por quintuplicado la detección de la mutación en controles mutados y no mutados, los datos reflejan que la técnica, es 100% sensible y específica catalogando de gran valor diagnóstico la detección de la mutación JAK2 V617F.



**Gráfico 4: Determinación de sensibilidad y especificidad analítica.** En todos los ensayos realizados para la estandarización y la detección de la mutación se incluyó el uso de controles positivos (mutados) proporcionados por el laboratorio molecular del Hospital Nacional del Niño "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica. **Fuente: Anexos Tabla 4.**

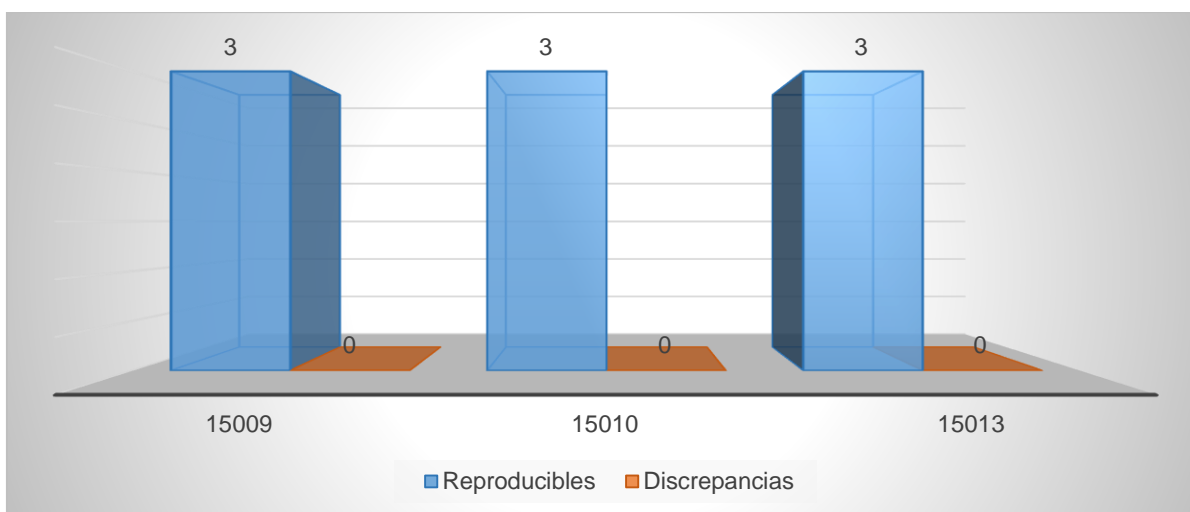
La detección de la mutación JAK2 V617F es actualmente la prueba inicial recomendado para la evaluación de un paciente con sospecha de PV y otros síndromes mieloproliferativos crónicos. Esta detección debe de ser capaz de discernir entre un paciente que porta la mutación a uno que no, no sería aceptable falsos positivos o negativos que retrasen la administración de medicamentos o el uso innecesario de los mismos (Figura 12).

Siguiendo el protocolo estandarizado producto de esta investigación), la detección de la mutación descrita en el documento de base Lens (2007), fue correctamente adecuada a las

condiciones del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud UNAN-Managua y su aplicación para la clasificación de síndromes mieloproliferativos en Nicaragua facilitara el trabajo al personal médico de los centros de referencia en Hematología.

### 10.5 Repetibilidad de la detección:

La repetibilidad es considerada uno de los fundamentos de todo el método científico, un punto de referencia a partir del cual se puede probar la fiabilidad de un ensayo, en este caso la detección de la mutación JAK2 V617F (Gráfico 5). En ensayos cualitativos esta se limita a la capacidad de reproducir los mismos resultados al introducir variable como el tiempo y operario.



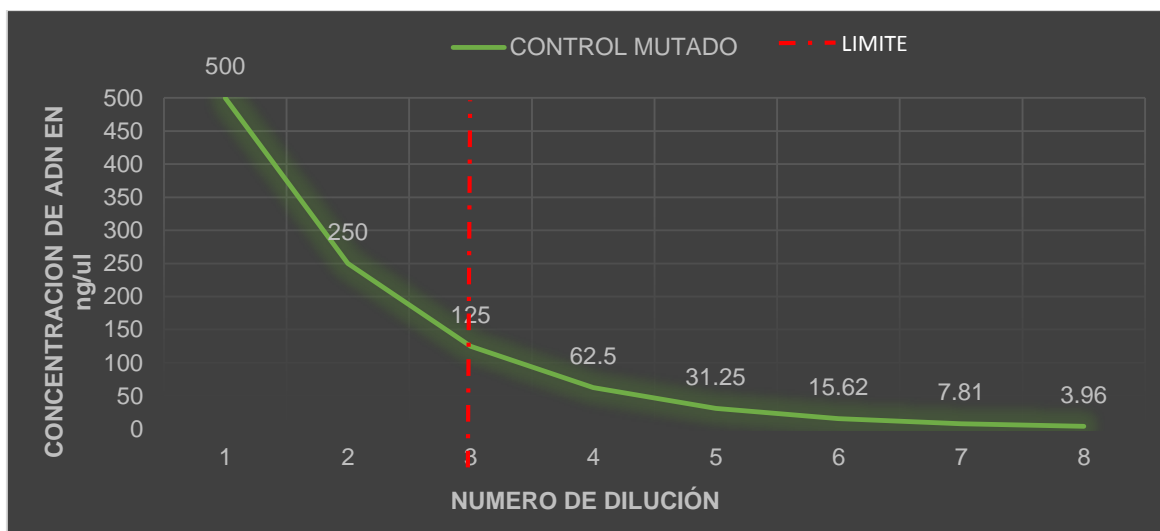
**Gráfico 5: Repetibilidad de la detección.** Muestra la repetibilidad de la detección de la mutación JAK2 V617F. En res muestras por triplicado, las barras celestes corresponden a las detecciones repetibles y las barras anaranjadas a las discrepancias en el método. **Fuente: Anexos Tabla 5.**

Lo descrito en el gráfico, se refiere al resultado de 3 muestras (43%), escogidas por conveniencia, evaluadas por triplicado dicho análisis se llevó a cabo por tres operarios distintos empleando un solo kit de extracción de ADN, mismo lote de primers, mismo programa de PCR y condiciones de electroforesis.

La detección de la mutación es 100% repetible, ya que en ninguna de las repeticiones realizadas por distintos operarios se evidencio alguna discrepancia, el producto obtenidas por los pacientes 15-009 y 15-010 en 3 de los 3 ensayos corresponden a un JAK2 no mutado y el paciente 15-013 en 3 de los 3 ensayos corresponde a la mutación JAK2 V617F (Figura 13).

### 10.6 Límite de detección:

El límite de detección es la cantidad o concentración mínima de ADN que puede detectarse o amplificarse a partir de un resultado cero. Para la realización del ensayo se emplearon diluciones seriadas del control positivo que van desde los 500 ng hasta 3.96 ng (Ver Gráfico 6).

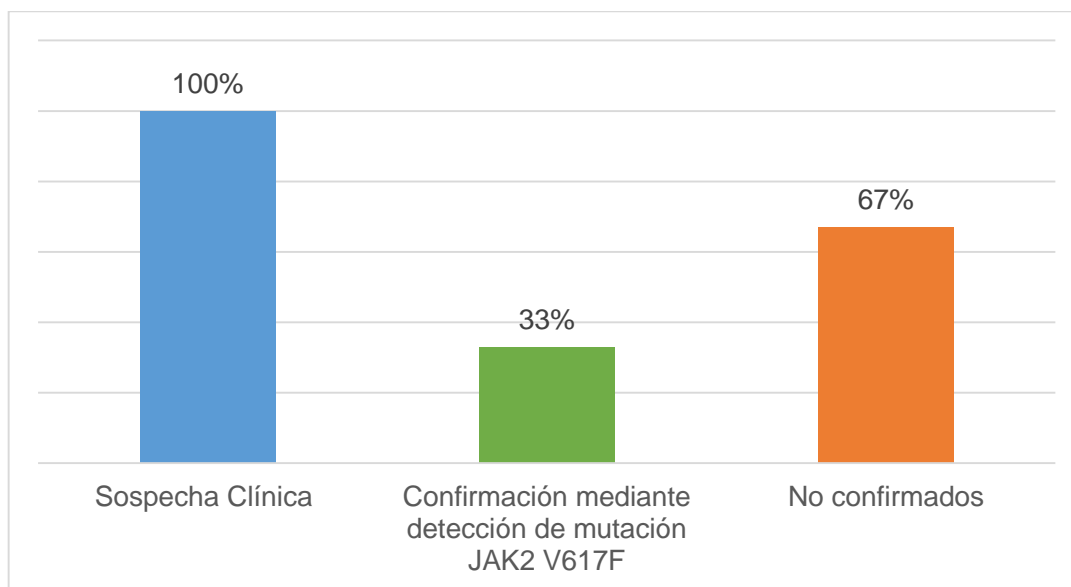


**Gráfico 6: Límite de detección.** Se realizaron diluciones seriadas del control positivo, partiendo de una concentración de 500 ng/μl, en un volumen final de 2 μ, en el eje X se muestra el número de dilución y el eje Y las concentraciones de ADN correspondientes, la tiene punteada roja corresponde al límite de detección del ensayo **Fuente: Anexos Tabla 6.**

El límite de detección del ensayo es de 125 ng, en concentraciones menores de esta se obtienen productos de ADN que son poco apreciables en la electroforesis de agarosa dificultando así la interpretación de los resultados. Consideramos así esta concentración como la mínima ideal para realizar la detección de la mutación sin mayores problemas (Figura 14).

## 10.7 Detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes:

Durante el proceso de estandarización y detección de la mutación en pacientes se analizaron 6 muestras correspondientes a pacientes con diagnóstico clínico de síndromes mieloproliferativos crónicos (Policitemia vera, Trombocitemia esencial).



**Gráfico 7: Detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes.** Muestra la confirmación diagnóstica de síndromes mieloproliferativos crónicos, barra verde corresponde a los pacientes confirmados mediante la detección de la mutación, barra naranja: corresponde a los no confirmados. **Fuente: Anexos Tabla 7.**

La sospecha clínica solo pudo ser confirmada en el 33 % de los pacientes, a pesar de que presentaban rasgos clínicos e incluso datos de laboratorio correspondientes a los síndromes mieloproliferativos crónico mutación JAK2 V617F positivo. El 67 % restante no se excluye de padecer un síndrome relacionado, en los casos donde no se detecta la mutación V617F, especialmente en sospecha de policitemia vera, podría estar indicado clínicamente un mayor estudio de JAK2. Se han detectado mutaciones que afectan al exón 12 de JAK2, que pueden ser de tipo puntual o pequeñas inserciones o deleciones. La mayoría de estas alteraciones se asocian con policitemia vera (aproximadamente un 5% de los casos de policitemia vera. (Scott, 2007). No cabe descartar una policitemia secundaria que comparte toda la clínica de la policitemia primaria, pero presenta un aumento en la eritropoyetina y

es negativo a la mutación, sería necesario revisar la historia clínica de los pacientes para constatar que sus manifestaciones clínicas no se deban a policitemias de altura, policitemias de las enfermedades cardiopulmonares, estado de hipoxia generalizada o eritrocitosis idiopáticas. (Besses, 2014)

La importancia de discriminar entre estos dos síndromes (policitemia primaria y secundaria), es que las policitemias secundarias no necesitan tratamientos antineoplásicos como la hidroxiurea la cual conlleva un sin número de efectos secundarios desagradables y en algunos casos ponen en riesgo la calidad de vida del paciente. La detección de la PV JAK2 V617F positivo, es relevante ya que se pueden introducir terapias dirigidas a la inhibición de la activación del JAK, como el uso de ruxolitinib la cual produce un efecto inhibidor del JAK con mínima mielosupresión y toxicidad secundaria. (Geyer, 2013)

La confirmación de la sospecha de la mutación JAK2 exón 12 y niveles de eritropoyetina no pudo realizarse en este estudio debido a que no se contó con los primers y reactivos necesarios, además no era parte de los objetivos de esta investigación.

Se realizó un control externo para validar los resultados se enviaron 4 de las 7 muestras (tres negativas y una positiva) al Hospital Nacional del Niño "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica, donde se obtuvo un 100% de concordancia con los resultados aquí presentados (Dr. Carlos Santamaría, comunicación personal), confirmando la veracidad de las detecciones y del sistema de control de calidad y protocolos estandarizados, asegurando que el sistema de análisis del Laboratorio de Biología Molecular "MA. Elmer Cisneros Moreira" In Memoriam, funciona adecuadamente.

La detección de la mutación JAK2 V617F en este trabajo, en pacientes con diagnóstico clínico de SMPC, representa los primeros reportes de esta mutación en Nicaragua, por tanto la incorporación de esta como una prueba diagnóstica de primera línea frente a la sospecha de un SMP, como lo expresa la OMS en la publicación "Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms". Para nuestra unidad formadora "Instituto Politecnico de la Salud" UNAN-Managua, constituye un avance sin precedentes y de alto valor científico la introducción de técnicas moleculares que viene a facilitar la labor medico en el área de hematología y a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

## **XI. CONCLUSIONES**

1. Fue posible la estandarización de la extracción de ADN en el ensayo D, con el cual se obtuvo la mayor concentración de material extraído respecto al ensayo inicial.
2. Se realizó la estandarización de la PCR en el ensayo 2, con el cual se mejoró el rendimiento de la reacción disminuyendo la formación de dímeros, el factor clave para esto fue la disminución en las concentraciones de primers.
3. Se estandarizó la electroforesis en gel de agarosa en el ensayo 6, obteniendo mejor resolución que el documento base, gracias a la introducción del bromuro de etidio como tinción del gel de agarosa.
4. La PCR para la detección de JAK2 V617F cuenta con una sensibilidad y especificidad del 100% indicando que la misma puede ser utilizada para la detección de la mutación JAK2 V617F.
5. Se estableció el límite de detección de la PCR para la detección de JAK2 V617F en una concentración de ADN mínima de 125 ng.
6. La técnica es 100% reproducible, al aplicar el procedimiento estandarizado por triplicado no se detectaron vulnerabilidades.
7. Se detectó la mutación JAK2 V617F en 33% de los pacientes con diagnóstico clínico de síndromes mieloproliferativos crónicos.

## XII. RECOMENDACIONES.

- Al **Departamento de Bioanálisis Clínico**, promover investigaciones científicas dentro del análisis molecular y el diagnóstico hematológico.
- A los **estudiantes**, realizar estudios sobre la frecuencia de esta mutación a fin de colaborar a la clasificación de los síndromes mieloproliferativos crónicos en el país.
- Al **MINSA**, incluir dentro de los protocolos diagnósticos, la detección de la mutación para la clasificación de síndromes mieloproliferativos crónicos.
- A los **hospitales de referencia nacional en hematología**, solicitar la realización de la detección de la mutación JAK2 V617F a pacientes con rasgos clínicos y de laboratorios de síndromes mieloproliferativos crónicos en especial la policitemia vera.



### XIII. REFERENCIAS

- Baxter, E., Scott, L., Campbell, P., East, C., Fourouclas, N., & Swanton, S. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*, 1054-1061.
- Bellanné, C., Chaumarel, I., Labopin, M., Bellanger, F., Barbu, V., De Toma, C., . . . Najman, A. (2006). Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*, 108(1), 346-352. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537803>
- Besses, C. (2014). *Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas*. Obtenido de Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia: [http://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/documentos/guias/GUIA\\_GEMFI N.pdf](http://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/documentos/guias/GUIA_GEMFI_N.pdf)
- Burkhardt, H. (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med*, 87-91. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834394>
- Campbell, P; Green, A. (7 de Diciembre de 2006). *The New England Journal of Medicine*, 2452-2466.
- Carranza, C., Tinti, D., Herrera, M., Rosales, L., Villegas, M., & Silva, G. (2014). Detection of Jak2 V617f Mutation, Secondary to the Presence of Bcr-Abl1 Translocation in a Patient with Chronic Myeloid Leukemia: Report of a Case and Review of the Literature. *International Journal of Genomic Medicine*, 2(1). Obtenido de <http://www.invegem.org/wp-content/uploads/2014/09/2332-0672-2-116-1.pdf>
- Espinoza, L. (2001). *Guia Practica Sobre la Tecnica de PCR*. Obtenido de INEEC: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
- Garcia, H. (2000). Electroforesis en geles: fundamentos, actualidad e importancia. *LABORATORIOS BETERÁ*, 2(1), 31-41. doi:[http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1\\_2\\_00/uni07200.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf)
- Geyer, H., Tibes, R., & Mesa, R. (2013). JAK2 Inhibition: Current Roles in Myelofibrosis and Initial Lessons Learned from Mexico. *Hematologia*, 14(1), 26-36. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2013/re131f.pdf>
- Heller, P., Komblitt, L. L., Narbaitz, M., Moiragui, E., Molinas, F., Riera, L., . . . Viudez, M. (2012). *Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas BCR-ABL negativas*. Obtenido de Sociedad Argentina De Hematología: [http://www.sah.org.ar/docs/317-362.7.SAH\\_GUIA2012\\_MielofibrosisPrimaria\\_rearmado.pdf](http://www.sah.org.ar/docs/317-362.7.SAH_GUIA2012_MielofibrosisPrimaria_rearmado.pdf)
- Hospital Universitario Central de Asturias. (s.f.). *Biblioteca de Pruebas Oncología Molecular*. Recuperado el 25 de Agosto de 2015, de HCA:

[http://www.hca.es/huca/web/contenidos/websdepartam/Cartera%20Laboratorios/CS\\_Oncologia\\_Molecular\\_201305.pdf](http://www.hca.es/huca/web/contenidos/websdepartam/Cartera%20Laboratorios/CS_Oncologia_Molecular_201305.pdf)

Instituto de investigación y desarrollo Químico-Biológico. (25 de Enero de 2010). *IQB*. Recuperado el 25 de Enero de 2015, de IQB: <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha095.htm>

Instituto Valenciano de Microbiología. (s.f.). *Neoplasias mieloproliferativas (Policitemia vera, Trombocitosis esencial, Mielofibrosis idiopática) - Gen JAK2*. Recuperado el 25 de Enero de 2015, de IVAMI: [http://www.ivami.com/noticia\\_indiv.php?id\\_noticia=2656&opc=5&id=2067&lang=es](http://www.ivami.com/noticia_indiv.php?id_noticia=2656&opc=5&id=2067&lang=es)

Jiménez, G. (2000). *Técnicas Moleculares Básicas*. Obtenido de Universidad de Costa Rica.

Jones, A., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, c., Zhang, L., . . . Cross, N. (Septiembre de 2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106(6), 2162-2168. Obtenido de US National Library of Medicine: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15920007>

Lens, D., Muxi, P., Brugnini, A., Trías, N., & Pierri, S. (2007). Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. *Revista Médica del Uruguay*, 23(2), 122-125. Obtenido de <http://www.rmu.org.uy/revista/2007v2/art8.pdf>

Llamosa, L., Meza, L., & Botero, M. (2007). Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración. *Red de Revistas Científicas de América Latina*(35), 455-460.

Martínez, C., & Canot, J. (2006). *SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS*. Obtenido de Red de Salud de Cuba: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/hematologia/smpcarreglado.pdf>

Navarro, V. (2010). Marcadores moleculares de los síndromes mieloproliferativos. *Revista de Hematología*, 152-155.

Pardanani, A. (2008). JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia*, 22(1), 23-30. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882282>

QIAGEN. (2012). *QIAamp, DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Obtenido de QIAGEN: <https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>

- Quintana, S., Shoenfeld, E., Di Gerenimo, V., & Pagani, F. (2014). Detección de la mutación V617F del gen JAK2 mediante análisis de disociación de alta resolución. *SCIELO*, 48(4). Obtenido de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572014000400007](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572014000400007)
- Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H., Cortes, J., & Verstovsek, S. (Febrero de 2011). *Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond*. Recuperado el 31 de Enero de 2015, de Nature Reviews: <http://www.nature.com/nrd/journal/v10/n2/full/nrd3264.html#top>
- Ramacha, A., Pugetb, G., Nomdedéua, J., Estivilla, C., & Canalsa, C. (Octubre de 2006). *Valoración de la mutación V617F del gen JAK2 en síndromes mieloproliferativos crónicos con cromosoma Filadelfia negativo*. Recuperado el 25 de Enero de 2015, de [Sciencedirect: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775306726847](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775306726847)
- Scott, L., Tong, W., Levine, R., Beer, P., Stratton, M., Futreal, A., . . . McMullin, M. (2007). JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *The New England Journal of Medicine*, 459-468.
- Somma, M., & Querci, M. (2000). *Electroforesis en gel de agarosa*. Obtenido de Laboratorio de referencia de la Union Europea: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n5.pdf>
- Soto, G. (2014). *Prevalencia de mutación Quinasa 2 (JAK 2) en pacientes con diagnóstico de síndrome mieloproliferativo en un Hospital de segundo nivel*. Obtenido de Universidad Veracruzana: <http://www.uv.mx/blogs/favem2014/files/2014/06/Proto-Giselle.pdf>
- Tamay, L., Ibarra, C., & Valesquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Mediagraphic*, 70-78. Obtenido de Mediagraphic.
- Tefferi, A., & Vardiman, J. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Nature*, 14-22.
- Vallat, B. (2006). *VALIDACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA*. Obtenido de Manual de pruebas de diagnóstico.
- Valle, A., & Soto, I. (Noviembre de 2005). VÍA JAK-STAT: UNA VISIÓN GENERAL. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 8, 14-25. Obtenido de <http://www.revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/download/32945/30195>

Verstovsek, S. (20 de Agosto de 2012). *Información sobre la policitemia vera*. Recuperado el 26 de Enero de 2015, de LLS: [https://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/spanish/pdf/sp\\_polycythemiavera.pdf](https://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/spanish/pdf/sp_polycythemiavera.pdf)

Xu, X., Zhang, Q., Luo, J., Xing, S., Li, Q., Krantz, S., . . . Zhao, Z. (2007). JAK2(V617F): Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood*, *109*(1), 339-342. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946305>

## XIV. ANEXOS

### Anexo 1. Tablas

**Tabla 1: Estandarización de la extracción de ADN**

CONCENTRACIÓN DE ADN EN NG/μL				
CÓDIGO	ENSAYO A	ENSAYO B	ENSAYO C	ENSAYO D
<b>15-009</b>	29.6	75.5	139.6	143
<b>15-010</b>	42.9	106.8	118.5	153.7
<b>15-013</b>	14.6	32.5	21.8	39.9

**Fuente:** Anexo 3. Bitácora PCR y Electroforesis

**Tabla 2: Estandarización de la PCR**

PARÁMETROS	ENSAYO 1	ENSAYO 2
<b>Concentración primers</b>	Alta	Baja
<b>Cantidad de dímeros</b>	Alta	Baja

**Fuente:** Anexo 3. Bitácora PCR y Electroforesis

**Tabla 3: Estandarización de electroforesis en gel de agarosa**

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6
<b>Repeticiones</b>	1	1	1	1	2	4

**Fuente:** Anexo 3. Bitácora PCR y Electroforesis

**Tabla 4: Determinación la sensibilidad, especificidad**

	MUTADO	NO MUTADO	FALSOS POSITIVOS	FALSOS NEGATIVOS
<b>Control Mutado</b>	5	0	0	0
<b>Control No Mutado</b>	0	5	0	0

**Fuente:** Anexo 3. Bitácora PCR y Electroforesis

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} = \frac{5}{5+0} = 1 \times 100 = 100\%$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} = \frac{5}{5+0} = 1 \times 100 = 100\%$$

**Tabla 5: reproducibilidad de la detección**

CÓDIGO	REPRODUCIBLES	DISCREPANCIAS
15009	3	0
15010	3	0
15013	3	0

**Fuente:** Anexo 3. Bitácora PCR y Electroforesis

**Tabla 6: Limite de detección**

NUMERO DE DILUCIÓN	CONTROL MUTADO	CALIDAD DE BANDA EN ELECTROFORESIS
1	500	Optima
2	250	Optima
3	125	Buena
4	62.5	Baja
5	31.25	Baja
6	15.62	Baja
7	7.81	No se observa
8	3.96	No se observa

**Fuente:** Anexo 2. Bitácora Extracción de ADN

**Tabla 7: Detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes.**

CÓDIGO PACIENTE	RESULTADO
15-004	No mutado
15-005	No mutado
15-009	No mutado
15-010	No mutado
15-013	Mutado
15-015	Mutado
	Total de mutado 2
	Total de no mutado 4

**Fuente:** Anexo 3. Bitácora PCR y Electroforesis

## Anexo 2. Bitácora Extracción de ADN

Código	Concentración de ADN	Volumen final	Modificación de protocolo
CNM (15-001)A	97 ng/μl	200 μl	
CNM (15-001)B	132 ng/μl	50 μl	
15-004	58.9 ng/μl	50 μl	-----
15-005	134.9 ng/μl	50 μl	
15-009A	29.6 ng/μl	50 μl	Reducción volumen buffer elución
15-010A	42.9 ng/μl	50 μl	
15-013A	14.6 ng/μl	50 μl	
15-009B	75.5 ng/μl	30 μl	Reducción volumen buffer elución
15-010B	106.8 ng/μl	30 μl	
15-013B	32.5 ng/μl	30 μl	
15-009C	139.6 ng/μl	30 μl	Precalentamiento Buffer de elución a 5 °C
15-010C	108.5 ng/μl	30 μl	
15-013C*	21.8 ng/μl	30 μl	
15-009D	143.0 ng/μl	30 μl	Aumento de tiempo de incubación buffer de elución a 5´.
15-010D	153.7 ng/μl	30 μl	
15-013D	39.9 ng/μl	30 μl	
15-015	269.5 ng/μl	30 μl	No se realizaron más modificaciones.

\* Derrame al momento de mezclar en vortex.

■ Paciente en tratamiento con hidroxiurea.

### Anexo 3. Bitácora PCR y Electroforesis.

22/05/15

#### ENSAYO 1 PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE PCR Y ELECTROFORESIS.

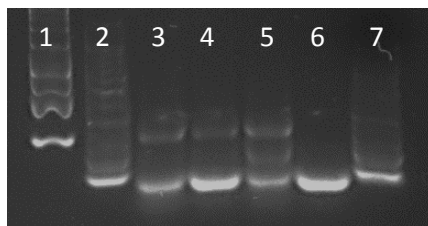
Verificación de funcionamiento de reactivos.

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl	Mastermix	4
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	20	
Enhancer		10	40	
dNTPs	200 µM	1	4	
Primer F1	2.5 µM	2.5	10	
Primer F2	2.5 µM	2.5	10	
Primer R	1 µM	5	20	
Tag	1 µM	1	4	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		27	108	

#### Programa PRC

	94°C	5´
x35	94°C	30´´
	58°C	30´´
	72°C	30´´
	72°C	5´
	4°C	Pausa

Condiciones del gel: agarosa 2%, Electroforesis 1h a 120 V. Marcador molecular: 5 µl, Loading buffer: 2 µl, PCR product: 5 µl



1. MM, 2.MM, 3.CNM, 4.CNM, 5. CM, 6. CN, 7.MM

Los reactivos de la PCR funcionan, marcadores moleculares no funcionan adecuadamente, Formación excesiva de dímeros de primers, baja resolución de electroforesis



**ENSAYO 2 PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE PCR Y ELECTROFORESIS.**

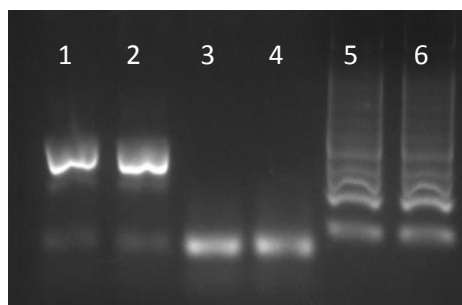
Posible solución: Modificación en concentración de primers.

	<b>Concentración final</b>	<b>Volúmenes para 50 µl</b>	<b>Mastermix</b>	#Mxs: 4
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	20	
Enhancer		10	40	
dNTPs	200 µM	1	4	
Primer F1	0.3 µM	1.5	6	
Primer F2	0.3 µM	1.5	6	
Primer R	0.6 µM	3	12	
Tag	1 µM	1	4	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	92	

No se modificó programa de PCR

Modificación condiciones del gel: Agarosa 1.5%, Electroforesis 10 min a 100 V, 1 h a 120 V

No se modificaron volúmenes de Buffer de carga, Productos PCR.



1. CNM, 2.CNM, 3.CN, 4.CN, 5. MM, 6. MM

Disminuyo considerablemente la formación de primers dimers con la nueva concentración de primers y aumento la resolución de las bandas en la agarosa con la nueva concentración y variación de voltajes.

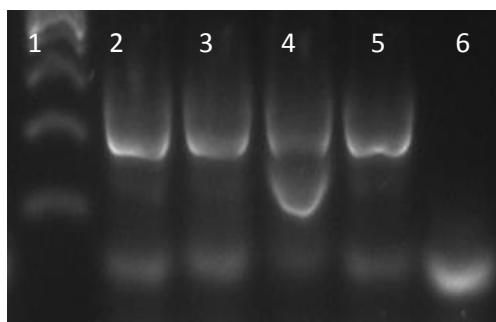
**ENSAYO 3 CORRESPONDIENTE A LA PRIMERA CORRIDA DE PACIENTES****15004:** Policitemia vera.**15005:** Trombocitosis esencial.

Protocolo PCR modificado (25/05/15).

	Concentración final	Volúmenes para 50 $\mu$ l	Mastermix	5
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	25	
Enhancer		10	50	
dNTPs	200 $\mu$ M	1	5	
Primer F1	0.3 $\mu$ M	1.5	7.5	
Primer F2	0.3 $\mu$ M	1.5	7.5	
Primer R	0.6 $\mu$ M	3	15	
Tag	1 $\mu$ M	1	5	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	115	

**No se modificó programa de PCR****Modificación electroforesis (25/05/15)**

**Volúmenes modificados:** Marcador molecular: 2.5  $\mu$ l  
 Loading buffer: 1  $\mu$ l  
 PCR product: 3  $\mu$ l



1. MM, 2.15-004, 3.15-005, 4.CM, 5. CNM, 6. CN

Al disminuir los volúmenes de marcadores y buffer de cargas, se obtuvo una mayor separación de las bandas si variar los voltajes y tiempos en la electroforesis pero las bandas toman un aspecto alargado.

**Interpretación resultados de pacientes: 15-004: JAK2 V617F NO MUTADO. 15-005: JAK2 V617F NO MUTADO.**

**ENSAYO 4 DISMINUCIÓN DE ALARGAMIENTO DE BANDAS.****15-004:** Policitemia vera.**15-005:** Trombocitosis esencial.

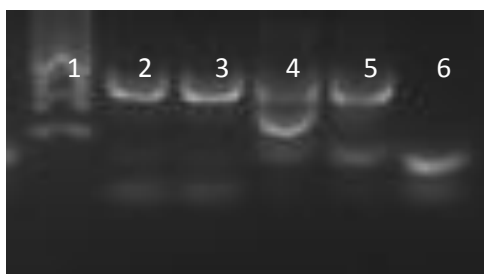
Protocolo PCR modificado (25/05/15).

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl	Mastermix	5
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	25	
Enhancer		10	50	
dNTPs	200 µM	1	5	
Primer F1	0.3 µM	1.5	7.5	
Primer F2	0.3 µM	1.5	7.5	
Primer R	0.6 µM	3	15	
Tag	1 µM	1	5	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	115	

**No se modificó programa de PCR****Modificación Electroforesis**

Condiciones del gel: Agarosa 2 %, Electroforesis 20 min a 80 V, 1 h a 90 V

**Volúmenes modificados:** Marcador molecular: 2.5 µl  
 Loading buffer: 1.5 µl  
 PCR product: 3.5 µl



1. MM, 2.15-004, 3.15-005, 4.CM, 5. CNM, 6. CN

Al disminuir los voltajes y aumentar los volúmenes de productos y buffer de carga, obtenemos una mayor estabilidad de las bandas evitando su alargamiento.

**Interpretación resultados de pacientes: 15-004:** JAK2 V617F NO MUTADO. **15-005:** JAK2 V617F NO MUTADO

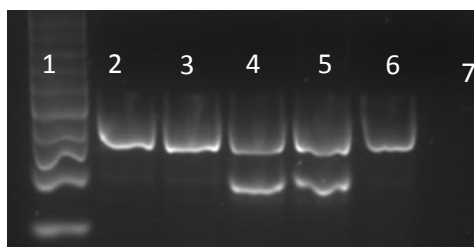
**ENSAYO 5 CORRESPONDIENTE A LA SEGUNDA CORRIDA DE PACIENTES****15009:** Policitemia vera**15010:** Policitemia vera**15013:** Policitemia vera

Protocolo PCR modificado (25/05/15).

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl	Mastermix	6
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	30	
Enhancer		10	60	
dNTPs	200 µM	1	6	
Primer F1	0.3 µM	1.5	9	
Primer F2	0.3 µM	1.5	9	
Primer R	0.6 µM	3	18	
Tag	1 µM	1	6	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	138	

**No se modificó programa de PCR****Modificación Electroforesis (07/07/15)**

**Volúmenes modificados:** Marcador molecular: 5 µl  
 Loading buffer: 1.5 µl  
 PCR product: 3.5 µl



1. MM, 2.15-009, 3.15-010, 4.15-013, 5. CM, 6. CNM, 7.CN

Aumentando el volumen del buffer de carga sin modificar las condiciones de electroforesis se obtuvo un mejor funcionamiento del mismo.

**Interpretación resultados de pacientes:**

**15-009:** JAK2 V617F NO MUTADO. **15-010:** JAK2 V617F NO MUTADO. **15-013:** JAK2 V617F MUTADO.

**CORRIDA POR TRIPLICADOS CONFIRMACIÓN DE DIAGNÓSTICO 15-013.  
CONDICIONES DE ENSAYO 5.**

**Evaluación de repetibilidad.**

**15009:** Policitemia vera

**15010:** Policitemia vera

**15013:** Policitemia vera

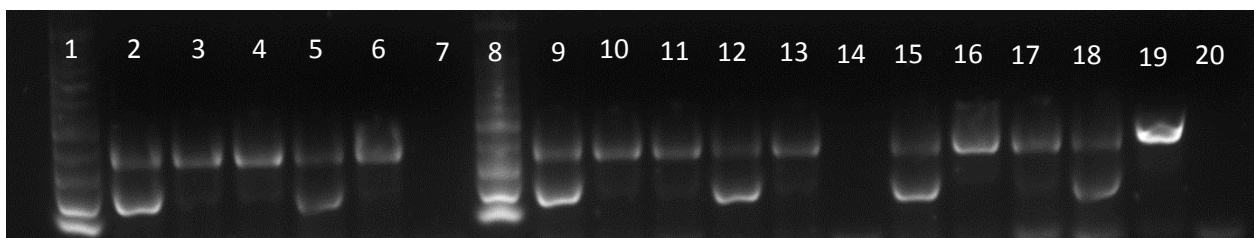
Protocolo PCR modificado (25/05/15)

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl	Mastermix	18
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	90	
Enhancer		10	180	
dNTPs	200 µM	1	18	
Primer F1	0.3 µM	1.5	27	
Primer F2	0.3 µM	1.5	27	
Primer R	0.6 µM	3	54	
Tag	1 µM	1	18	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	414	

**No se modificó programa de PCR**

**Modificación Electroforesis (07/07/15)**

**Volúmenes buffer de carga, PCR products y marcador molecular modificados (22/08/15)**



1. MM, 2.15-013, 3.15-010, 4.15-009, 5. CM, 6. CNM, 7.CN, 8. MM, 9.15-013, 10.15-010, 11.15-009, 12. CM, 13. CNM, 14.CN, 15.15-013, 16.15-010, 17.15-009, 18. CM, 19. CNM, 20.CN

Primer diagnóstico de mutación JAK2 V617F en Nicaragua paciente 15-013. Se realizó por triplicado y montando separado del control positivo al paciente 15-013 para confirmar que las bandas no fueran producto de contaminación.

## ENSAYO 6 INTRODUCCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO

**15009:** Policitemia vera

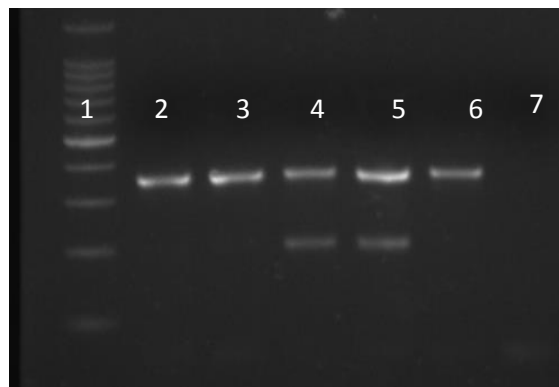
**15010:** Policitemia vera

**15013:** Policitemia vera

**No se realizó PCR, se tomaron los productos de la amplificación realizada el 23/08/15**

**Modificación de condiciones electroforesis:** Agarosa 1.5 %, 3ul bromuro de etidio,  
Electroforesis 20 minutos 80 V, 1 hora 90 V

**Volúmenes buffer de carga, PCR products y marcador molecular modificados  
(22/08/15)**



1. MM, 2.15-009, 3.15-010, 4.15-013, 5. CM, 6. CNM, 7.CN

Utilizando el bromuro de etidio se obtuvo una excelente resolución de la electroforesis, el marcador molecular y productos de PCR se observan de forma clara facilitando la interpretación de resultados.

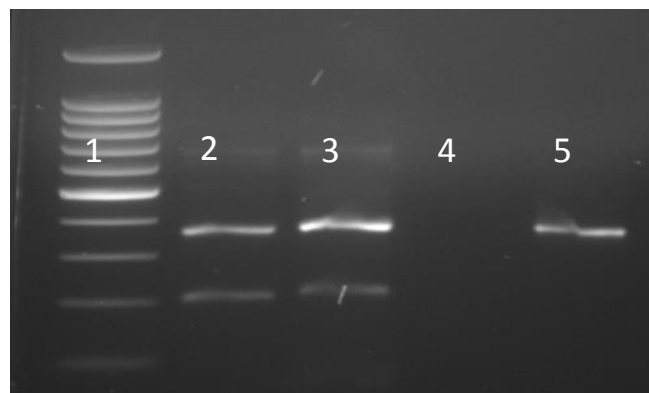
**TERCER CORRIDA DE PACIENTE****15-015:** Policitemia vera

Protocolo PCR modificado (25/05/15)

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl	Mastermix	6
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	30	
Enhancer		10	60	
dNTPs	200 µM	1	6	
Primer F1	0.3 µM	1.5	9	
Primer F2	0.3 µM	1.5	9	
Primer R	0.6 µM	3	18	
Tag	1 µM	1	6	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	138	

No se modificó programa de PCR**Modificación Electroforesis Bromuro de etidio (03/09/15)**

Volúmenes buffer de carga, PCR products y marcador molecular modificados (22/08/15)



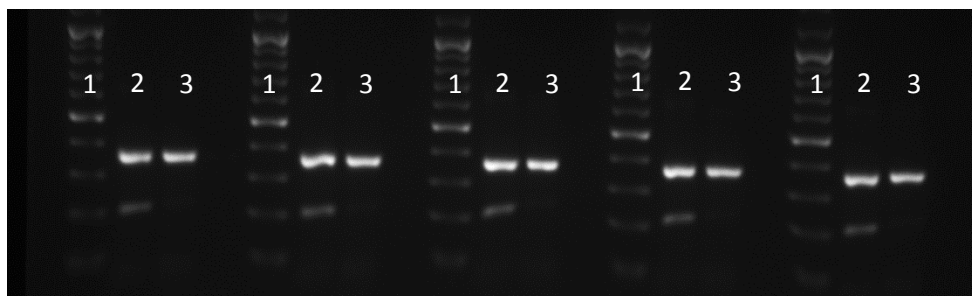
1. MM, 2.15-015, 3.15-CM, 4.CN, 5. CNM,

**Interpretación resultados de pacientes:****15-015:** JAK2 V617F MUTADO.

**ENSAYO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD****Control Mutado****Control No Mutado**

Protocolo PCR modificado.

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl	Mastermix	15
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	75	
Enhancer		10	150	
dNTPs	200 µM	1	15	
Primer F1	0.3 µM	1.5	22.5	
Primer F2	0.3 µM	1.5	22.5	
Primer R	0.6 µM	3	45	
Tag	1 µM	1	15	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	345	

**No se modificó programa de PCR****Modificación Electroforesis Bromuro de etidio (03/09/15)****Volúmenes buffer de carga, PCR products y marcador molecular modificados (22/08/15)**

1. MM, 2.CM, 3.CNM, 4.CN

El ensayo demuestra que el ensayo es 100% sensible y específico al no variar condiciones del ensayo, solamente el operador.



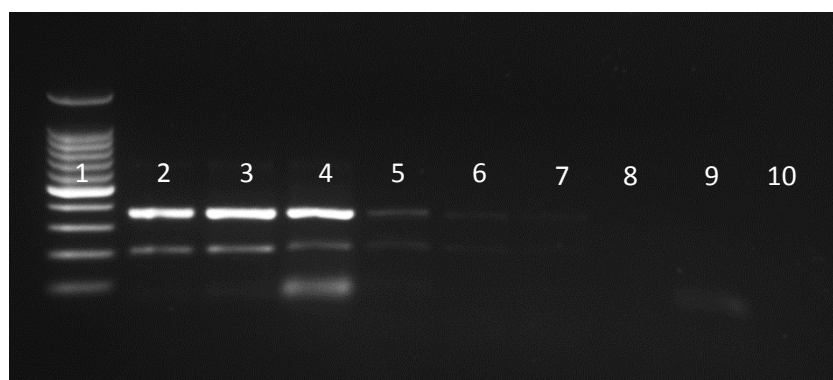
**ENSAYO LIMITE DE DETECCION.****Dilución control mutado.**

Protocolo PCR modificado.

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl	Mastermix	15
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5	75	
Enhancer		10	150	
dNTPs	200 µM	1	15	
Primer F1	0.3 µM	1.5	22.5	
Primer F2	0.3 µM	1.5	22.5	
Primer R	0.6 µM	3	45	
Tag	1 µM	1	15	
DNA	500 ng			
H <sub>2</sub> O				
Total		23	345	

**No se modificó programa de PCR****Modificación Electroforesis Bromuro de etidio (03/09/15)****Volúmenes buffer de carga, PCR products y marcador molecular modificados**

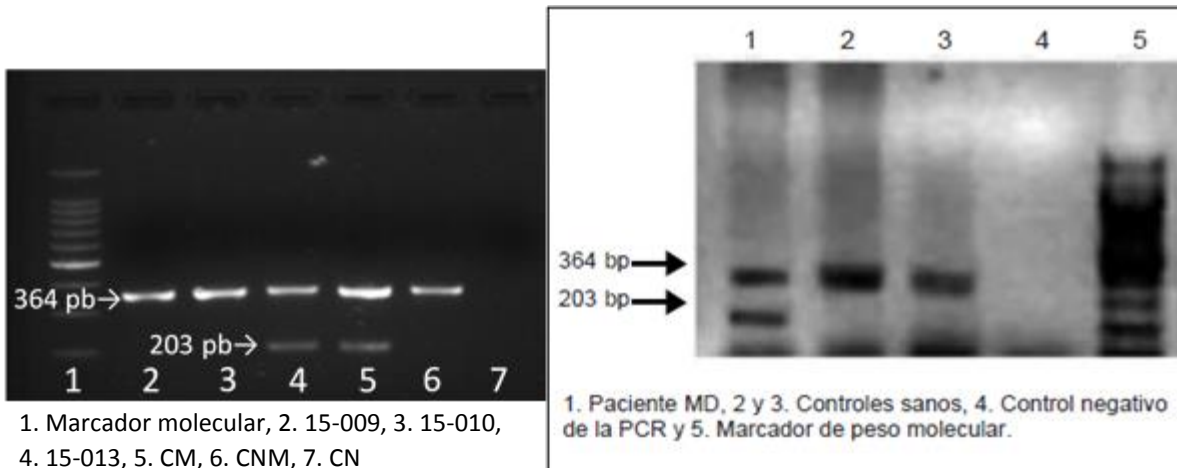
(22/08/15)



1. MM, 2.CM (500 ng ADN), 3.CM (250 ng ADN), 4.CM (125 ng ADN), 5.CM (62.5 ng ADN), 6.CM (31.25 ng ADN), 7.CM (15.62 ng ADN), 8.CM (7.81 ng ADN), 9.CM (3.96 ng ADN), 10.CN

La concentración mínima de ADN en la cual la amplificación mediante PCR es óptimo y permite la visualización de las bandas en la agarosa de forma clara es de 125 ng.

#### Anexo 4. Comparación con procedimiento de referencia



Utilizando nuestro procedimiento estandarizado para la detección de la mutación JAK2 V617F (Imagen de la izquierda), se obtuvo una excelente resolución de la electroforesis, reducción de dímeros de primers y mejoramiento de la eficiencia de la reacción en comparación con los resultados del documento de referencia Lens, (2007) (imagen de la derecha).

## Anexo 5. Procedimiento estandarizado



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA,  
MANAGUA.

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD  
"LUIS FELIPE MONCADA"



Laboratorio de Biología Molecular "MA. Elmer Cisneros Moreira" In Memoriam  
POLISAL/ UNAN–Managua

### **Procedimiento estandarizado: Detección de la mutación JAK2 V617F.**

- Elaborado por:** Br. Santos Alberto Cruz Alemán.  
Br. Adriana Belén Larios Roque.  
Br. Uxmal Javier Caldera Suazo
- Revisado por:** MsC. Martha Xiomara Guerrero Delgado.
- Aprobado por:** PhD. Allan Pernudi Ubau

---

#### **Objetivo:**

- Detectar la mutación JAK2 V617F en los pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos

#### **Alcance:**

- Personal que labora en el laboratorio de biología molecular.
- Estudiantes que reciben clases o realizan tesis en dicho laboratorio.

#### **Muestra:**

- Sangre periférica con anticoagulante EDTA.

#### **Responsables:**

- Bioanalista clínico capacitado.
- Especialistas en hematología o biología molecular.

#### **Definición:**

Es un método de biología molecular que emplea la extracción de material genético, amplificación de ADN y la electroforesis en gel de agarosa, para la detección de la mutación JAK2 V617F.

## Documentos de referencia:

- Baxter, E., Scott, L., Campbell, P., East, C., Fourouclas, N., & Swanton, S. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*, 1054-1061
- Lens, D., Muxi, P., Brugnini, A., Trías, N., & Pierri, S. (2007). Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. *Revista Médica del Uruguay*, 23(2), 122-125. Obtenido de <http://www.rmu.org.uy/revista/2007v2/art8.pdf>
- QIAGEN. (2012). *QIAamp, DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Obtenido de QIAGEN: <https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>
- Universidad de Granada. (s.f.). *Aplicacion de la PCR*. Obtenido de Facultad de Ciencias-Universidad de Granada: <http://fciencias.ugr.es/practicadocentes/wp-content/uploads/guiones/aplicacionDeLaPCR.pdf>
- Vallat, B. (2006). *Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa*. Obtenido de Manual de pruebas de diagnóstico.

### Materiales, equipos y reactivos:

<b>Equipos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Cristalería</b>	<b>Reactivos</b>
Campana de bioseguridad	Viales 1.5 ml	Probeta 1000ml	QIAamp <i>DNA Mini Kit</i>
Balanza analítica	Viales 2 ml	Probeta 100ml	Agua libre de ARNasas y ADNasas
Espectrofotómetro NanoDrop	Viales para PCR 0.5 ml	Beaker 250ml	dNTPs PeqLab
Termociclador Eppendorf	Puntas para pepita automática 0-5 $\mu$ l	Beaker 100ml	Buffer de reacción de PCR 10X PeqLab
Cámara electroforética	Puntas pepita automática 1-10 $\mu$ l	Pizeta con agua destilada	Primers Forward, Forward I/C y Reverse MetaBion.
Fuente de poder para electroforesis	Puntas pepita automática 10-100 $\mu$ l		ADN polimerasa PeqLab.
Sistema de documentación de geles	Puntas pepita automática 100-1000 $\mu$ l		Agarosa de baja electroendosmosis
Transiluminador UV	Guantes de latex		Tampón de TBE 10x (Concentracion de trabajo 1X)
Horno microondas	Guantes de nitrilo		Bromuro de etidio
Centrifuga viales con refrigeración	Papel absorbente		Lonza DNA Loading buffer
Pepita automática 0-5 $\mu$ l	Papel parafina		Marcador de peso molecular Promega 100 pb
Pepita automática 1-10 $\mu$ l			Control: ADN no mutado
Pepita automática 10-100 $\mu$ l			Control: ADN mutado
Pepita automática 100-1000 $\mu$ l			
Agitador vórtex			
Bloque térmico			

## **Procedimientos:**

### **A. Extracción de ADN:**

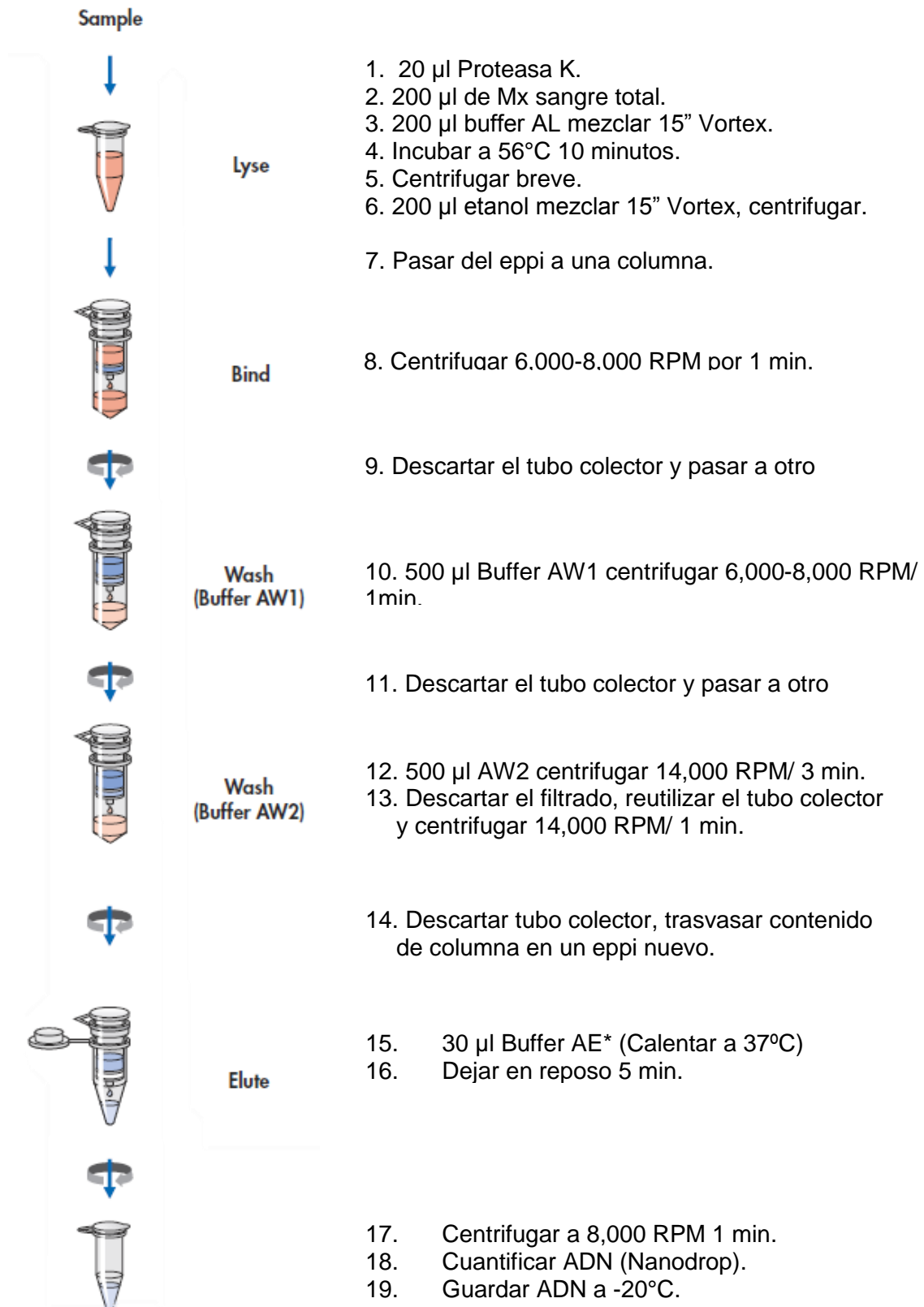
#### **Tipos de muestra:**

Sangre periférica con anticoagulante EDTA

#### **Cosas que hacer antes de empezar.**

- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (15-25°C).
- Bloque a térmico a 56°C.
- Buffer AE temperatura ambiente.
- Buffer AW1, AW2, pág. 16.
- AW1 + etanol (100%) 130 mL.
- AW2 + etanol (100%) 160 mL.
- Proteasa (Lista).
- Si se forman precipitados del Buffer AL, disolver mediante la incubación a 56°C.
- Todas las etapas de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15-25°C).

## Procedimientos:



## B. Amplificación mediante PCR

### Cosas que hacer antes de empezar.

- Equilibrar a temperatura ambiente Buffer de reacción de PCR 10X PeqLab, Primers Forward, Forward I/C y Reverse MetaBion, dNTPs PeqLab y agua destilada libre de ARNasas y ADNasas.
- De ser necesario prepara a la concentración de trabajo (1X) los reactivos a utilizar en alícuotas de 200 µl.

### Para preparación de master mix tomar en cuenta el siguiente protocolo:

	Concentración final	Volúmenes para 50 µl
10x Buffer Y	2 mM MgCl <sub>2</sub>	5
Enhancer		10
dNTPs	200 µM	1
Primer F1	0.3 µM	1.5
Primer F2	0.3 µM	1.5
Primer R	0.6 µM	3
Tag	1 µM	1
DNA	500 ng	
H <sub>2</sub> O		
Total		23

Para la concentración de ADN a utilizar se tomara en cuenta la cuantificación realizada en el paso 18 del protocolo de extracción de ADN y se calcularan el volumen a utilizar para completar una concentración de 500 ng, utilizando la formula  $V_1 C_1 = V_2 C_2$ , ejemplo:

Concentración de ADN en paso 18: 250 ng/ µl

$V_1 C_1 = V_2 C_2$ , despejando  $V_2$ :  $V_2 = V_1 C_1 / C_2$ .

Sustituyendo valores:  $V_2 = 1 \mu\text{l} \times 500 \text{ ng} / 250 \text{ ng} = 2 \mu\text{l}$



## **Programa de PCR:**

Termociclador Eppendorf, nombre de programa JAK2:

	94°C	5´
x35	94°C	30´´
	58°C	30´´
	72°C	30´´
	72°C	5´
	4°C	Pausa

### **C. Electroforesis en gel de agarosa.**

#### **Preparación de agarosa al 1.5%**

1. Preparar la cámara de electroforesis.
2. Colocar el peine de modo tal que se formen pocillos completos.
3. Realizar la dilución TBE 10x a la concentración de trabajo con un volumen final de 1000 ml.
4. Realizar el cálculo de la cantidad de agarosa a utilizar para una concentración al 1.5% con un volumen final de 150 ml.
5. Pesar la cantidad de agarosa en polvo según el cálculo del paso 4 y añadirle un volumen de 150 ml de TBE 1X en un Beaker de 250 ml.
6. Calentar en microondas hasta ebullición.
7. Dejar enfriar la agarosa hasta que no se observe emisión de vapor y agregar 3 µl de bromuro de etidio, mezclar vigorosamente.
8. Verter la agarosa en la plataforma de electroforesis y dejar solidificar por 30 min.
9. Una vez gelificado retirar cuidadosamente el peine.
10. Agregar solución TBE 1X hasta el máximo indicado en la cámara.
11. Agregar al pozo inicial 5 µl de marcador molecular y preparar las mezclas de buffer de cargar 1.5 µl, productos de PCR 3.5 µl para agregarlas a los pozos correspondientes según número de amplificaciones.
12. Programar el equipo a 80 V por 20 min y posteriormente a 90 V por 1 hora.
13. Transcurrido el tiempo colocar el gel sobre el transiluminador e interpretar las bandas en el sistema de documentación de geles.

## Anexo 6. Consentimiento informado



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
UNAN – MANAGUA  
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD  
I.P.S  
DEPARTAMENTO DE BIOANALISIS CLÍNICO



### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Estandarización de la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendidos en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo Febrero-October 2015.**

Nombres de los investigadores: Santos Alberto Cruz Alemán.  
Adriana Belén Larios Roque.  
Uxmal Javier Caldera Suazo.

#### A. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.

Le informamos del desarrollo de un estudio, con el propósito de estandarizar un protocolo para detección de la mutación *JAK2 V617F* en los Síndromes Mieloproliferativos Crónicos.

Actualmente el diagnóstico de estos síndromes en Nicaragua se realiza mediante el cuadro clínico del paciente y pruebas presuntivas (hematocrito, conteo de plaquetas, reticulina, etc.); hasta la fecha la detección de esta mutación no se ha realizado en nuestro país.

Por este motivo necesitamos su colaboración, para contribuir a un diagnóstico exacto, clasificación y tratamiento oportuno de los pacientes.

#### B. ¿QUÉ SE HARÁ?

Si usted acepta participar en este estudio se les realizara lo siguiente.

Se procederá a extraer una muestra sanguínea, la cual será almacenada en condiciones adecuadas, hasta su procesamiento, para la detección de la mutación *JAK2 V617F*, mediante PCR punto final.

#### C. BENEFICIOS.

Como resultado de su participación en este estudio, se le realizara la detección de la mutación *JAK2 V617F* gratuitamente contribuyendo así a la correcta clasificación del síndrome que padece.

#### D. RIESGOS

- Puede presentar cierto dolor al momento de la toma de muestra.
- Puede presentar hematomas en el sitio de la punción.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
UNAN – MANAGUA  
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD  
I.P.S  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



#### E. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Antes de dar su autorización para este estudio usted deberá haber hablado con alguno de los investigadores y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si desea saber más información puede obtenerla llamando al **Dr. Allan Pernudi Ubau** docente del POLISAL, UNAN- Managua y Tutor de la investigación, al número 89620874.

- Su participación en este estudio es totalmente voluntario. Usted tiene el derecho de negarse a participar o a retirarse del estudio en cualquier momento.
- La información brindada por usted y los resultados obtenidos en este estudio son confidenciales, los resultados podrán aparecer en una publicación científica o ser divulgados en reuniones científicas pero de manera anónima.
- Usted no perderá ningún derecho legal al firmar este documento.
- Usted se mantendrá informado de cualquier variación en este proyecto.
- Usted no recibirá dinero por su participación en el estudio.
- Las muestras pueden ser sometidas a otras pruebas o investigaciones en el futuro.

#### F. CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído toda la información descrita en este consentimiento por lo tanto, acepto participar en el estudio *"Estandarización de la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendidos en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo Febrero-October2015.*

Manifiesto haber aclarado todas mis dudas con el personal del equipo investigador y me considero adecuadamente informado/a.



Por lo tanto, doy mi consentimiento voluntario para la extracción de muestra sanguínea y realización de la detección de la mutación *JAK2 V617F*.

\_\_\_\_\_  
Nombre, cedula y firma del paciente.

\_\_\_\_\_  
Nombre, cedula y firma del testigo.

\_\_\_\_\_  
Nombre, cedula y firma de investigador que solicita el consentimiento.

**Anexo 7. Solicitud de análisis molecular**

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD "LUIS FELIPE MONCADA" IPS UNAN - Managua</b>		
<b>Laboratorio de Biología Molecular</b>			
<b>Solicitud de análisis moleculares</b>			
<b>DATOS DEL PACIENTE</b>			
<b>Nombre:</b>		<b>Código:</b>	
<b>Expediente:</b>	<b>Edad:</b>	<b>Fecha nacimiento:</b>	
<b>Hospital :</b>		<b>Tipo de muestra:</b> SP <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/>	
<b>Diagnóstico:</b>			
<b>Momento evolutivo/fase de enfermedad:</b>			
<b>Tratamiento previo:</b>			
<b>Fecha inicio tratamiento:</b>			
<b>RESULTADOS DE LABORATORIO AL DIAGNÓSTICO</b>			
<b><u>Hemograma:</u></b>			
Hemoglobina (g/dL): _____		Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L): _____	
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L) : _____		Blastos en SP (%): _____	
<b><u>Médula ósea:</u></b>			
Celularidad: _____		Blastos en MO (%): _____	
<b>SOLICITUD DE PRUEBAS MOLECULARES</b>			
t(9;22) <i>BCR-ABL</i> p210		Mutación <i>JAK2</i> V617F	
t(9;22) <i>BCR-ABL</i> p190		Mutación <i>FLT3-ITD</i>	
t(15;17) <i>PML-RARα</i>		t(8;14) <i>cMYC-IgH</i>	
t(8;21) <i>AML-ETO</i>		<i>T(1;19) E2A-PBX</i>	
inv16 <i>CBFβ-MYH11</i>		t(4;11) <i>AF4-MLL</i>	
del1p <i>SIL-TAL</i>		t(12;21) <i>TEL</i>	

## Anexo 8. Reporte de análisis molecular



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA,  
MANAGUA.

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD  
"LUIS FELIPE MONCADA"



### Reporte De Análisis Moleculares

Fecha:

Nombre:

Código:

Expediente:

Edad:

Hospital:

---

Prueba solicitada

Resultado

---

Observaciones:

---

Dr. Allan Pernudi M.Sc. Ph.D.  
Cód. MINSa 18541  
Laboratorio Biología Molecular  
POLISAL/ UNAN-Managua