

Estandarización de la técnica Real Time PCR para la detección molecular de la mutación V617F en el gen de JAK-2 en neoplasias mieloproliferativas crónicas

Claudio Pérez N.⁽¹⁾, Liliam León V.⁽²⁾, Araceli Pinto L.⁽³⁾, Gabriela Muñoz G.⁽²⁾, Jorge Alfaro L.⁽¹⁾, Milton Larrondo L.⁽⁴⁾

⁽¹⁾Unidad de Terapia Celular, Banco de Sangre, HCUCH

⁽²⁾Servicio de Laboratorio Clínico, HCUCH

⁽³⁾Estudiante de Química y Farmacia, Universidad de Chile

⁽⁴⁾Banco de Sangre, HCUCH

SUMMARY

V617F mutation in exon 14 of Janus Kinase 2 gene (*jak-2*) is used as a molecular marker for the diagnosis of Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (Phi-) such as Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (MFP). To detect this mutation, we used conventional polymerase chain reaction technique (PCR), a simple and inexpensive technique, however, has some drawbacks that current technology allows to solve. During the last years, more sensitive molecular techniques have been incorporated in clinical practice to support the diagnosis, prognosis and follow-up of hematological patients. For its implementation in the clinical routine should be considered technical and economic aspects, so in this work, we evaluate the Real Time PCR technique as a diagnostic method for the detection of the *Jak-2-V617F* mutation, using in house primers design. Our result show that the technique implemented has a concordance index of 0.87 with the conventional PCR used in the molecular diagnosis of myeloproliferative neoplasms. In addition, it has the same specificity, greater sensitivity and, shorter execution time in relation to conventional PCR. The implementation of this diagnostic method in our Hospital is technically possible and commercially convenient.

Fecha recepción: marzo 2019 | Fecha aceptación: agosto 2019

INTRODUCCIÓN

La Janus quinasa-2 (Jak-2) es parte de la familia de proteínas de transmembrana con actividad

tirosina quinasa que se encuentran asociadas a receptores de citoquinas⁽¹⁾. Normalmente, al unirse a su ligando se produce la homo o heterodimerización del receptor y la subsecuente activación

de Jak-2 mediante fosforilación. Esta activación permite el reclutamiento y la fosforilación de la proteína STAT, la que se dirige al núcleo para estimular la expresión de los genes asociados a la proliferación celular⁽²⁾. En el año 2005 se reportó la mutación V617F que sustituye una guanina por una timidina en la posición 1849 en el exón 14 del gen Jak-2, traducándose en el reemplazo del aminoácido fenilalanina por una valina⁽³⁾. La consecuencia funcional de esta mutación es una activación constitutiva de la vía de señalización Jak/STAT, generando una proliferación anormal de células hematopoyéticas y su transformación hacia neoplasias mieloproliferativas (NMP) como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP)⁽⁴⁾. Estos trastornos clonales se encuentran estrechamente relacionados y su diagnóstico se basa en criterios aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽⁵⁾. Aunque el mecanismo no es completamente comprendido, el fenotipo final de la alteración se encuentra también modulado por la alteración de otros genes, tales como MPL y CALR⁽⁶⁾.

A partir del año 2008, la OMS incorporó la presencia de la mutación V617F en el gen de Jak-2 como criterio diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas, detectándose en el 95% de los pacientes con PV en 50 a 60% de los casos con TE y, en 50% de los pacientes con MFP. Adicionalmente, la mutación ha sido detectada en algunos casos raros de leucemia mielomonocítica crónica, síndrome mielodisplásico, mastocitosis sistémica y leucemia neutrofilica crónica⁽⁷⁾, aunque no se ha establecido su valor clínico en estas patologías. Actualmente, se evalúa la cuantificación de Jak-2 V617F como una herramienta para monitorear la respuesta al tratamiento de las patologías que portan la mutación^(8,9).

La determinación de la mutación Jak-2 puede realizarse mediante PCR cualitativa, según la técnica

descrita por Baxter en 2005⁽³⁾; sin embargo, esta técnica no detecta bajas cargas mutacionales, disminuyendo su sensibilidad, y requiere del uso de bromuro de etidio, compuesto que cada vez se usa menos, considerando su potencial mutagénico y dificultades en su manipulación. En la actualidad, la mayoría de los métodos se basan en kits comerciales de qPCR⁽¹⁰⁾ por su sensibilidad y especificidad, pero son de alto costo. Por lo anterior, desarrollamos y validamos un método de PCR en tiempo real (qPCR) *in house* de alta sensibilidad y especificidad analítica, sustentable para nuestra institución y que valida un modelo de crecimiento en el área de la biología molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de DNA para estudio de mutación V617F

Para la determinación de la mutación V617F en Jak-2 mediante RT-PCR se utilizaron 46 muestras: 32 muestras de DNA almacenadas a -80°C provenían de sangre periférica de pacientes con sospecha diagnóstica o diagnosticados como NMP y 14 muestras de DNA congelado a -80°C, provenientes de individuos sanos, donantes de Banco de Sangre.

2. PCR convencional para detección de mutación V617F

Se reanalizaron todas las muestras mediante el protocolo usado por el Laboratorio de Terapia Celular para detección cualitativa de la mutación. En el Esquema I se detallan la concentración de reactivos de amplificación (A), la secuencia de los partidores utilizados (B) y las condiciones de termociclado (C). Mediante electroforesis en gel de agarosa, se identificó la presencia de una banda de 364 pb que corresponde a la amplificación del gen Jak-2 completo y una banda de 202 pb que determina la presencia de la mutación V617F en el gen de jak-2 (Figura 1).

Esquema I. Condiciones para la reacción de PCR convencional

Reactivo	Volumen
Tampón 5X	5
MgCl ₂ 50mM	2.5
dNTPs 10mM	1
Partido forward 10 μM	2.5
Partido reverse 10 μM	2.5
Taq DNA pol 5U/μL	0.5
H ₂ O	hasta 25 μL
DNA	100 ng

Partidores	Secuencia 5' ...3'
JAK-2 Reverse	GTCCTACAGTGTTCCTCAAGTTTCA
Jak-2 V617F Forward	TTGGTTTTAAATTATGGAGTAATT
JAK-2 Normal Forward	AGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAAG

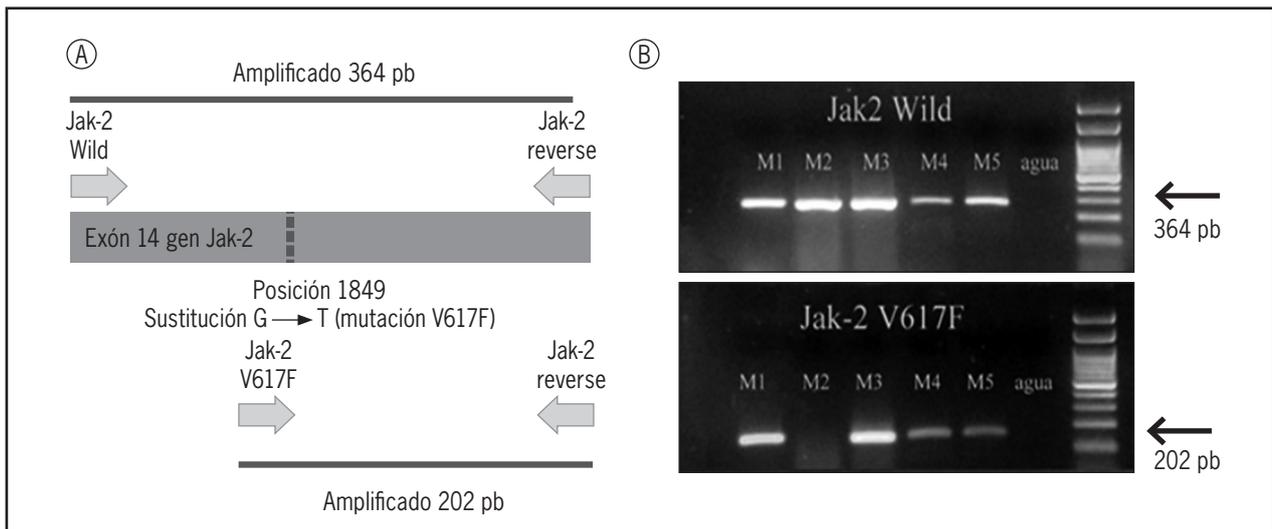
Paso	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	94°C	5 minutos
35 ciclos	94°C	60 segundos
	58°C	60 segundos
	72°C	60 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos

A. Mezcla de reacción para amplificación de gen *Jak-2 wild* y *Jak-2V617F*

B. Secuencia de partidores utilizados en reacción de PCR

C. Condiciones de termociclado

Figura 1. Amplificación de mutación en exón 14 del gen de *Jak-2* mediante PCR convencional



A. Estrategia de amplificación para detección de mutación V617F. Se realizan dos reacciones. En la primera se utilizan con partidores *Jak-2 wild* y *Jak-2 reverse* para verificar la presencia del gen *Jak-2*. En la segunda, se usan los partidores *Jak-2 V617F* y *Jak-2 reverse* que detecta específicamente el nucleótido T (y no G) en la posición 1849 del gen de *Jak-2*, indicando la presencia de la mutación.

B. Análisis del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Se observa un producto de amplificación de 364 pb en todas las muestras utilizadas (M1 a M5), mientras que sólo las muestras M1, M2, M3, M4 y M5 muestran una banda de 202 pb, indicando la presencia de la mutación en el gen de *Jak-2* (*Jak-2 V617F* +). La muestra sin DNA (agua) se utiliza como control en la reacción de PCR para descartar una contaminación de los reactivos.

Esquema II. Condiciones para la reacción de PCR en tiempo real

(A)

Reactivo	Volumen (µL)	Conc. final
2x sensimix™II Probe	12.5	1x
10 µM Partidor Forward Jak-2	0.75	0.3 µM
10 µM Partidor Reverse Jak-2 Wild (o V617F)	0.75	0.3 µM
10 µM sonda Jak-2	0.5	0.2 µM
Templado	100 ng	-
Agua	Hasta 25 µL	-
Volumen final	25 µL	-

A. Mezcla de reacción para amplificación de gen Jak-2 wild y Jak-2V617F.

B. Secuencia de partidores utilizados en reacción de PCR.

C. Condiciones de termociclado.

(B)

Secuencia (5' to 3')	Partidores
CTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA	Forward Jak-2Q-PCR
GTAGTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAC	Reverse Jak-2 wild Q-PCR
GTAGTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAA	Reverse Jak-2 V617F Q-PCR
FAM-TGAGCAAGCTTTCTCACAAAGCATTGGTT-BHQ1	Sonda Jak-2 Q-PCR

(C)

Ciclos	T°	Tiempo	Observación
1	95°C	10 m	Activación polimerasa
40	95°C	10 s	Lectura de fluorescencia al final del paso
	60°C	40 s	

3. PCR en tiempo real (qPCR) para detección de mutación V617F

La técnica de qPCR para detección y la carga mutacional V617F fue desarrollada a partir del método descrito por Larson⁽¹¹⁾ con leves modificaciones. Se utilizó el reactivo SensiMix™ II Probe kit, el que contiene todos los insumos para la reacción del qPCR, excepto los partidores y sonda. Estos últimos fueron sintetizados de acuerdo a la secuencia descrita⁽¹¹⁾ y agregados exógenamente a la mezcla de reacción de qPCR. En el esquema II se detallan la concentración de reactivos de amplificación (A), la secuencia de los partidores utilizados (B) y las condiciones de termociclado (C). La reacción de PCR se realizó en un termociclador Light Cycler™ 480II y las curvas de amplificación típicas para la mutación V617F y el alelo normal se muestran en la Figura 2. Para la cuantificación relativa de la mutación V617F, se utilizó el método de $2^{-\Delta Ct}$ descrito por Livak⁽²⁴⁾. La fórmula $\Delta Ct_{jak2} = Ct_{mut} - Ct_{wild}$ se utilizó para definir la carga mutacional V617F en relación al alelo *Wild* (no mutado). Se consideró una muestra V617F positiva o

negativa cuando el Ct_{mut} fue menor o mayor al ciclo 40 del programa de amplificación, respectivamente, asignándoles un Ct_{mut} arbitrario de 41 a las muestras V617F negativas.

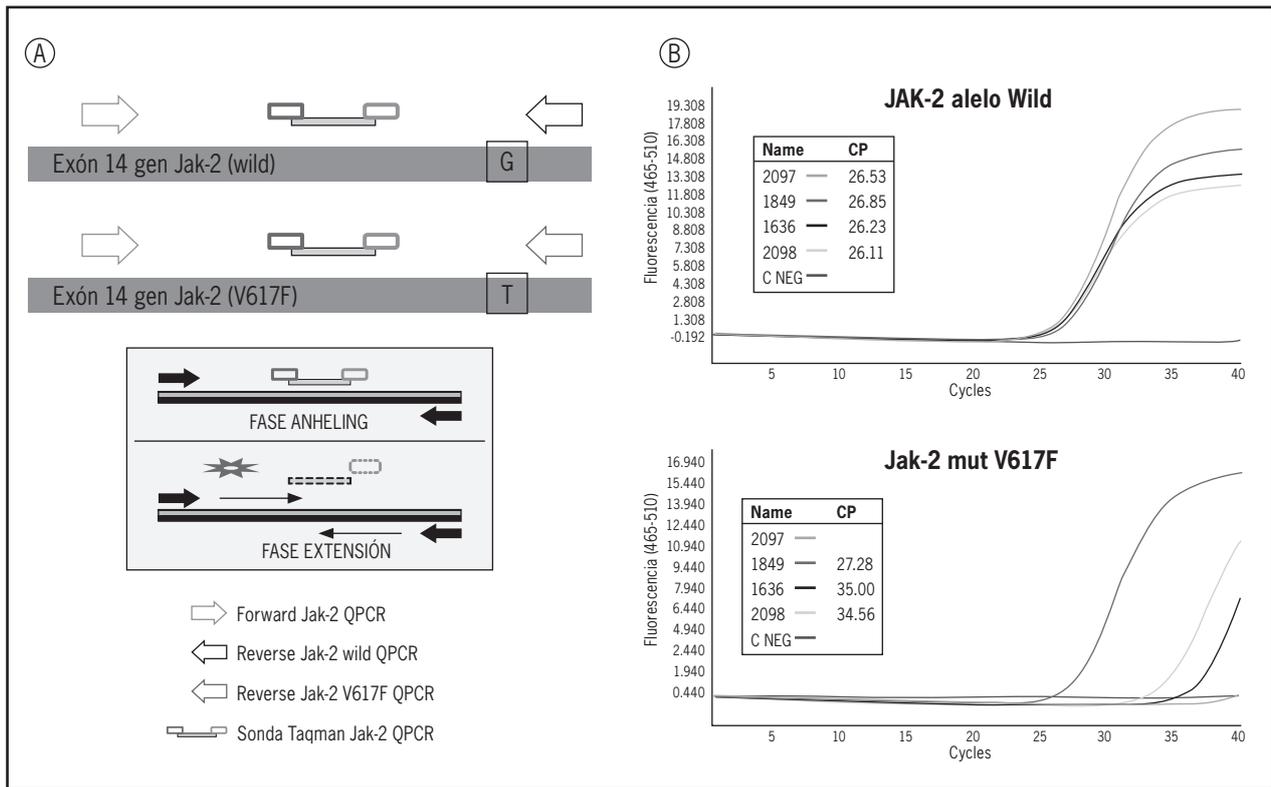
4. Test de concordancia entre los dos métodos

Para evaluar la concordancia entre el PCR convencional y qPCR se calculó el índice Kappa (K) descrito por Cohen⁽¹²⁾. Para la interpretación del resultado, se siguió la tabla definida por Altman⁽¹³⁾ mostrada a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Valoración del índice Kappa

Valoración índice Kappa	
Valor de K	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Figura 2. Amplificación de Jak-2V617F mediante Real Time PCR



A. Estrategia de amplificación para detección de la mutación V617F. Se realizan dos reacciones: en la primera se utilizan los partidores reverse Jak-2 wild Q-PCR y forward Jak-2 Q-PCR para amplificar el alelo wild (nucleótido G en posición 1849 del gen de Jak-2) y en la segunda, se usan los partidores reverse V617F Q-PCR y forward Jak-2 Q-PCR para amplificar la mutación V617F. Ambas reacciones de PCR utilizan la sonda Taqman Jak-2 Q-PCR conjugada a fluorocromo reportero FAM que permite la detección del producto amplificado mediante emisión de fluorescencia. En el recuadro, se esquematiza la hidrólisis de la sonda en la fase de extensión por acción de la DNA polimerasa que permite la detección del producto de PCR.

B. Gráfica de las curvas de amplificación de los alelos wild y V617F mostrada por el equipo Light Cycler. Las muestras 2097, 1849, 1636 y 2096 amplifican el alelo wild del gen Jak-2, mientras que sólo las muestras 1849, 1636 y 2096 amplifican el alelo V617F (muestras positivas). Además, el CP (equivalente a Ct) mostrado en recuadro, permite determinar la carga de la mutación en cada muestra mediante el método de $2^{-\Delta C_t}$.

Para ver esta imagen en color, visitar: <https://bit.ly/2He5fbv>

RESULTADOS

1. Comparación de método de PCR convencional versus qPCR

Para validar el método de qPCR se evaluó la concordancia con el PCR convencional utilizado como método referencia. De las 46 muestras ana-

lizadas, 23 fueron positivas para ambos métodos, 20 fueron negativas y en tres hubo discrepancias, siendo 3 positivas por qPCR y negativas para PCR convencional. De acuerdo a estos valores se calculó el índice Kappa (\cdot) que resultó en 0,87 lo que se traduce en que ambos métodos poseen un nivel o fuerza de concordancia “muy buena”. (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de concordancia entre PCR convencional y Real Time PCR - Cálculo de índice Kappa

PCR convencional	Real time PCR		
	V617F+	V617F-	Marginal
V617F+	23	0	23
V617F-	3	20	23
Marginal	26	20	46

ACUERDO OBSERVADO	0,93
ACUERDO ESPERADO	0,5

ÍNDICE KAPPA	ERROR ESTÁNDAR	I.C 95%	Fuerza de la concordancia
0,870	0,073	(0,727 1,012)	Muy buena

2. Análisis de la especificidad y sensibilidad del método de qPCR

La mutación V617F en el gen de Jak-2 es una alteración adquirida que se asocia a NMP y está ausente en individuos sanos⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. En nuestro estudio, todos los individuos donantes sanos (n= 14) fueron negativos para la mutación V617F con ambos métodos, mientras que pacientes con diagnóstico confirmado de PV, MFI o TE (n=10) fueron positivos, obteniendo un 100 % de especificidad para el método. En las otras muestras Jak-2 V617

+ (n=13) no se obtuvo información del diagnóstico clínico, por lo que fueron excluidas de este análisis.

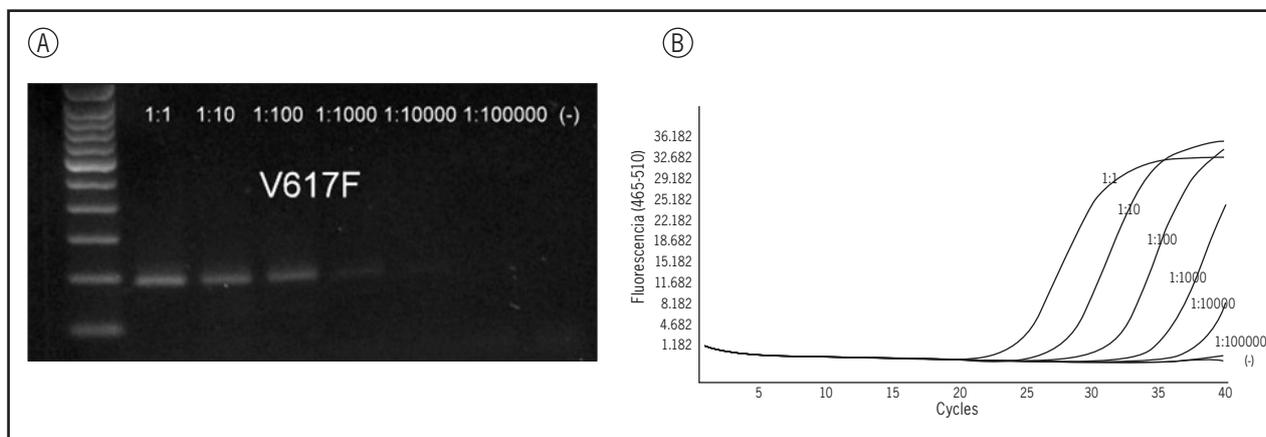
En relación a la sensibilidad, se obtuvo un límite de 1/10000 (0.01%) para la detección de V617FJak-2, mediante el método de qPCR, mientras que la técnica convencional presentó un nivel de detección de 0,1% (Figura 3).

3. Cuantificación relativa de carga mutacional V617F mediante método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La carga molecular de la mutación V617F en el gen JAK2 varía considerablemente dentro de las NMP. Esta variabilidad contribuye a la determinación del fenotipo, así como al curso clínico de la patología⁽¹⁶⁾. La cantidad de DNA adecuada para cuantificar la carga relativa de Jak-2V617F / Jak-2 *wild* por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, estuvo en el rango de 0,1 a 100 ng. En este rango, la relación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se mantiene constante y no varía de acuerdo a la cantidad de DNA utilizado (Figura 4). Con estos resultados, se utilizó una cantidad de 100 ng de DNA como templado.

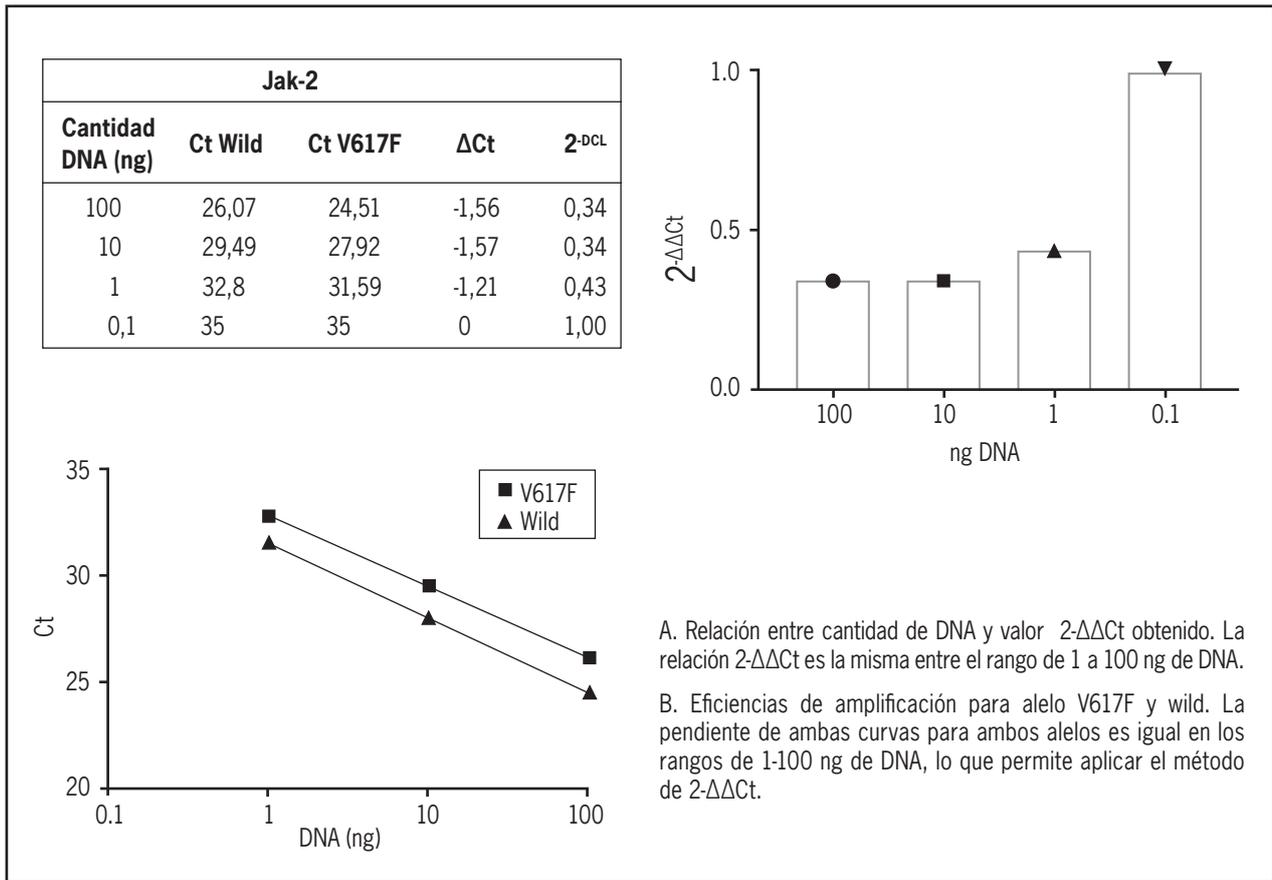
Los resultados de la cuantificación mostraron que las muestras positivas V617F (+) tienen un $2^{-\Delta\Delta Ct}$ medio de 0.42 con un rango de 0.0003 a 11.47, mien-

Figura 3. Sensibilidad de las técnicas moleculares utilizadas en la detección de la mutación V617F



Mediante dilución limitante, se evaluó la sensibilidad mediante PCR convencional (A) y PCR en tiempo real (B) en una muestra Jak-2V617F+.

Figura 4. Validación de la cuantificación relativa de la mutación V617F mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$

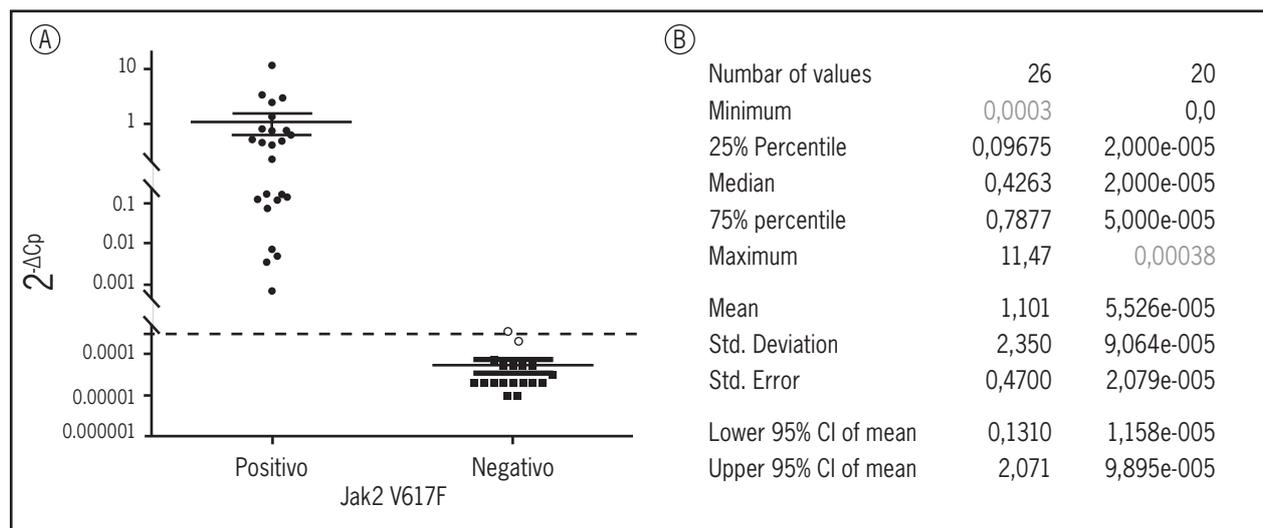


tras que las muestras negativas tienen una media de 0.00002 con un rango de 0 a 0.00038 (Figura 5). Los puntos en gris, que en el gráfico representan las muestras discrepantes con el PCR convencional, poseen un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ menor a 0.01, indicando una baja carga del alelo mutante (Figura 5). Dos muestras consideradas negativas que superaron el umbral, tuvieron una menor amplificación para el alelo *wild* ($C_{t_{wild}}$ fueron de 28.8 y 29.8), lo que incidió en el cálculo de la carga de la mutación. De acuerdo a lo anterior, la carga mutacional en una muestra debe considerar: 1) La amplificación para el alelo mutado V617F con un $C_t < 40$, y 2). La amplificación del alelo *wild* con un $C_t < 28$. Esto evita la confusión de valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sobre el límite considerado como Jak-2 V617F positivos.

4. Análisis de las muestras discordantes entre los métodos

En relación a las tres muestras discordantes que fueron positivas para V617F con la técnica de PCR en tiempo real y negativas por la técnica de PCR convencional: una procedía de un paciente con diagnóstico de mielofibrosis idiopática (MFP); la segunda, de un paciente con diagnóstico de trombocitemia esencial (TE) y la tercera muestra provenía de un paciente con un hematocrito sobre 52% y hemoglobina de 18 gr/dl con criterios clínicos diagnóstico de NMP. Las discrepancias entre los resultados reflejan más bien una diferencia en la sensibilidad de ambos métodos. La amplificación de la mutación V617F (C_t) mediante qPCR en las tres muestras se detectó sobre el ciclo 34 de un

Figura 5. Cuantificación relativa de mutación Jak-2 V617F mediante método $2^{-\Delta\Delta C_t}$



A. Gráfico muestra los valores de $2^{-\Delta C_p}$ en muestras consideradas positivas o negativas de acuerdo a la técnica de real time PCR. El umbral de detección se marcó en 0.0003 y se muestra en línea punteada. Los puntos grises representan las tres muestras discrepantes entre el PCR convencional y el real time PCR, y los puntos blancos, las muestras negativas con un valor igual o mayor al umbral.

B. Cuadro estadístico que muestra la media, el promedio, los rangos de $2^{-\Delta C_t}$ en muestras positivas y negativas para la mutación V617F.

máximo de 40 ciclos, una detección “tardía” que indica una baja carga mutacional y que podría explicar la negatividad en el PCR convencional.

DISCUSIÓN

Implementamos el método de qPCR *in house* para la detección de la mutación de V617F en el gen de Jak-2 y la comparamos con el PCR convencional utilizado en el diagnóstico molecular de NMP. Nuestros resultados muestran que existe un grado de concordancia muy bueno entre los métodos confirmando lo publicado por Larsen⁽¹¹⁾, entregando una alta sensibilidad y especificidad de la técnica de qPCR, por lo que esta metodología puede ser aplicada en el diagnóstico molecular de NMP.

Para un test molecular de uso clínico, se puede usar un *kit* comercial o una técnica desarrollada en el mismo laboratorio, llamado PCR “*in house*”, el cual es necesario estandarizar antes de su uso para otorgar un resultado confiable, reproducible y

útil en la toma de decisiones⁽¹⁸⁾. A diferencia de la forma comercial cuyo diseño generalmente permite la detección de un solo gen, los insumos utilizados en un qPCR *in house* pueden adaptarse para la detección de diferentes genes cambiando sólo las sondas y partidores utilizados. Además es posible utilizarlos en diferentes plataformas o instrumentos de PCR y una vez estandarizado, el método *in house* termina siendo más económico que un *kit* comercial. Una de las desventajas para el desarrollo de este tipo de procedimiento es el tiempo empleado para la estandarización y la validación del desempeño de la prueba. Existen una serie de recomendaciones para laboratorios que desarrollan técnicas moleculares y que abarcan desde las áreas y flujo de trabajo, la capacitación del personal y el equipamiento disponible hasta el uso de insumos y reactivos⁽¹⁹⁾. En ese sentido, la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Laboratorio Clínico cumple con todos los estándares para la realización de la técnica de qPCR.

Al igual que otras metodologías, la técnica de qPCR requiere de controles técnicos que garanticen la entrega de resultados confiables para el diagnóstico clínico. Como parte del procedimiento de amplificación por PCR se incluye un control positivo (DNA portador mutación V617F en el gen de Jak-2), un control negativo (DNA sin presencia de mutación V617F en el gen de Jak-2) y un control sin DNA para descartar contaminación de los reactivos. Además, como control interno se realiza un PCR para el alelo *wild* del gen de Jak-2, el cual debe mostrar una curva de amplificación en todas las muestras, permitiendo la validación de la calidad del DNA en la muestra problema. La ausencia de amplificación para este alelo invalida la detección de la mutación V617F y es necesario repetir la determinación o realizar una nueva extracción de DNA desde una nueva muestra de sangre periférica del paciente. Adicionalmente es recomendable que la técnica molecular implementada esté suscrita a un programa de control de la calidad externa que monitoree el desempeño del método para detección de Jak-2V617F, especialmente cuando se trabaja con técnicas *in house*. En comparación a la técnica de PCR convencional, el formato en tiempo real implementado presentó una mayor sensibilidad, disminuyó el tiempo de ejecución, no utilizó residuos tóxicos como el bromuro de etidio, ni generó contaminaciones post-PCR que pudiesen interferir con el resultado.

Recientemente, un panel de expertos internacionales ha propuesto la cuantificación JAK2V617F como una herramienta potencialmente útil para monitorear la respuesta al tratamiento de los nuevos fármacos dirigidos contra JAK2 en el desarrollo clínico de la NMP^(6,7,18). Por otro lado, en varios estudios^(16,21-23), se ha medido el impacto clínico de la cuantificación de la carga mutacional de JAK2V617F en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph nega-

tivas clásicas, relacionando la carga alélica de la mutación con el desarrollo de eventos trombóticos. Dada la relevancia clínica de cuantificar la carga de la mutación V617F, empleamos el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak⁽²⁴⁾ para medir la carga relativa de la mutación V617F. Este método es el más apropiado para la normalización de datos y calcula la proporción de la mutación con respecto a su alelo normal sin requerir una curva de calibración con estándares de concentración conocida. Su aplicación requiere definir el rango de DNA donde la eficiencia de amplificación es la misma para ambos alelos y su relación $2^{-\Delta\Delta C_t}$ permanece constante. En nuestra técnica definimos que para la aplicación del método descrito por Livak, la cantidad ideal de DNA a utilizar se encuentra en el rango 10-100 ng. Utilizando esta estrategia de cuantificación pudimos observar que existe una gran variabilidad en la carga relativa de la mutación V617F, probablemente reflejando la heterogeneidad en las muestras estudiadas. Nuestro análisis se limita a los aspectos metodológicos; sin embargo, en trabajos futuros podría asociarse la cantidad de la mutación V617F a otros parámetros clínicos, como por ejemplo, el tipo de NMP asociada o el estado clínico del paciente. Cabe señalar que el umbral de detección fijado (0.03%) permite distinguir entre las muestras V617F positivas de las muestras negativas, pudiendo ser utilizado para evaluar la respuesta molecular al tratamiento con inhibidores de Jak-2.

Finalmente, nuestro Hospital cuenta con el equipamiento y la estructura adecuada para la aplicación rutinaria de la técnica implementada, contando con personal entrenado para el análisis e interpretación de los datos obtenidos, lo que garantiza un mejor manejo clínico, situación que puede influir positivamente en la calidad de la atención brindada a los pacientes. Además, la implementación de métodos moleculares *in house*

CONCLUSIÓN

crea un modelo de acción, alternativo a un *kit* comercial que permite incorporar nuevas técnicas para el diagnóstico de patologías con genes conocidos o la detección de alteraciones genicas descritas recientemente o de baja frecuencia para uso clínico o de investigación.

Se implementó la técnica de qPCR para la detección de la mutación V617F en el gen de Jak-2, la cual puede ser empleada de forma rutinaria y confiable para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas.

REFERENCIAS

1. Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 2007;26:6724.
2. Valle Mendiola A, Soto Cruz I. Vía Jak-stat: una visión general. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud* 8(1-2).
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-61.
4. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017;129:667-79.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasm and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391.
6. Wong WJ, Hasserjian RP, Pinkus GS, Breyfogle LJ, Mullally A, Pozdnyakova O. JAK2, CALR, MPL and ASXL1 mutational status correlates with distinct histological features in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2018;103:e63-e68.
7. Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:627.
8. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC *et al.* Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* 2009;113:4829.
9. Pardanani A, Gotlib JR, Jamieson C, Cortes JE, Talpaz M, Stone RM *et al.* Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2011;29:789.
10. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim *et al.* Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Molecular Diagnostics* 2013;15:733-44.
11. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B-and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *British J Haematology* 2007;136:745-51.

12. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and psychological measurement* 1960;20:37-46.
13. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. CRC press: 1990.
14. Hopkins CK, Riley C, Pepkowitz S, Lopategui J R (2007). Absence of the V617F JAK2 Mutation in 181 Healthy Donors. *Blood* 2007;110:4664.
15. Sidon P, El Housni H, Dessars B, Heimann P. The JAK2V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia* 2006;20:1622.
16. Fuentes AEK, Hernández-Maraver D, Lombardia L, Albendea MAC, de la Rúa AR. Impacto clínico de la cuantificación de la carga mutacional de JAK2V617F en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph negativas clásicas. *Medicina Clínica* 2012;139:373-8.
17. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L *et al*. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2162-8.
18. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E *et al*. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Human Genet* 2010;18:1276.
19. Logan J, Logan JM, Edwards KJ, Saunders NA. (Eds.). *Real-time PCR: current technology and applications*. Horizon Scientific Press:2009.
20. Deininger M, Radich J, Burn TC, Huber R, Paranagama D, Verstovsek S. The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood* 2015;126:1551-4.
21. Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, Gil L, Lewandowska M, Lehmann-Kopydłowska A *et al*. The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Thrombosis Research* 2015;135:272-80.
22. Takata Y, Seki R, Kanajii T, Nohara M, Koteda S, Kawaguchi K *et al*. Association between thromboembolic events and the JAK2 V617F mutation in myeloproliferative neoplasms. *The Kurume Medical Journal* 2011;60:89-97.
23. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Dellacasa *et al*. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Experimental Hematology* 2009;37:1016-21.
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25:402-8.

CORRESPONDENCIA

Dr. Claudio Pérez Núñez
 Banco de Sangre
 Hospital Clínico Universidad de Chile
 Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
 E-mail: claperez@hcuuch.cl
 Fono: 562 2978 8067

