



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



ONCOGÉN JAK2, BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024

Autores:

Marquines V. Freddy R. C.I.: V-26.195.924

Paredes T. Lania M. C.I.: V-24.643.993

Tutor: MSc. Amelia González

Co-Tutor: Lcda. Lucia Gutiérrez

Asesora metodológica: Santina Coccione

Naguanagua, Octubre 2024.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.



ACTA DE EVALUACIÓN

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación, para evaluar el proyecto titulado: **“ONCOGÉN JAK2, BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024”**, realizado por los estudiantes: **Freddy R. Marquines V.** y **Lania M. Paredes T.**, titulares de la Cédula de Identidad: C.I: 26.195.924 y C.I: 24.643.993, respectivamente y tutorado por la Profesora **Amelia González** titular de la Cédula de Identidad V-14.238.552 y la Lcda. **Lucia Gutiérrez**, titular de la Cédula de Identidad V-15.000.464. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado trabajo. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su **APROBACIÓN**.

En fe de lo cual se levanta esta Acta, en Valencia a los veintiún (21) días del mes de Octubre del año dos mil veinticuatro (2024).

Prof. Santina Coccione
C.I: V- 10.063.311
Jurado Principal

Prof. Indira Varela
C.I: V- 7.145.505
Jurado Principal

Prof. Maurelys Irigoyen
C.I: V- 19.107.694
Jurado Principal





UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DE LOS TUTORES

Por medio de la presente certificamos que hemos tenido conocimiento y asesoramos el Trabajo de Investigación titulado: **ONCOGÉN JAK2, BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024.**, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por: **Freddy R. Marquines V. C.I.: V-26.195.924** y **Lania M. Paredes T. C.I.: V-24.643.993**. Consideramos que el presente estudio, reúne todos los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.



MSc. Amelia González

C.I: V- 14.238.552

TUTOR



Lcda. Lucía Gutiérrez

C.I: V- 15.000.464

CO-TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotros, Freddy Rafael Marquines Valera y Lania María Paredes Trompiz autores de la tesis: “**ONCOGÉN JAK2, BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024.**” reconocemos y aceptamos el derecho de la Universidad de Carabobo en su reglamento de propiedad de publicar este trabajo por cualquier medio conocido y por conocer, al ser este requisito para la obtención de nuestro título de Licenciados en Bioanálisis. El uso que la Universidad de Carabobo hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de nuestros derechos morales y patrimoniales como autores.

Naguanagua, Octubre, 2024.



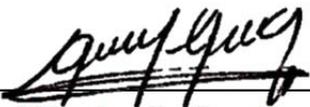
Freddy R. Marquines V.

C.I.: V-26.195.924



Lania M. Paredes T.

C.I.: V-24.643.993



MSc. Amelia González.

C.I.: V- 14.238.552



Lcda. Lucia Gutiérrez

C.I.: V- 15.000.464

DEDICATORIA

Principalmente a *Dios*, por ser mi guía, por darme sabiduría y fuerza a través de la Fe, de acompañarme a lo largo de esta aventura, permitiéndome estar aquí cumpliendo este tan anhelado sueño.

A mi padre, *Pedro Pablo Paredes*, por su paciencia y entrega, quien día a día me ha demostrado que no hay imposibles, que a través del amor, esfuerzo, constancia y dedicación se puede alcanzar todo lo propuesto, es mi más grande inspiración y motor de vida.

A mis suegros, *Lilia y Douglas Márquez*, por su inmenso amor, paciencia y sabiduría, quienes representan mis más grandes ejemplos de lucha y constancia, los pilares más fuertes de mi vida, gracias por creer siempre en mí.

A la hermana *María*, quien con su amor por Dios, por la palabra y la oración me ha llenado de sabiduría, fe, bendición y gracia. Le agradezco tanto, hermana. Esto es para usted.

A mi hermana *Bárbara*, quien desde lejos ha sido testigo de cada una de mis aventuras, agradecida por tu apoyo incondicional hermana.

A mis familiares que no se encuentran en este plano terrenal, pero sé que me acompañan en cada paso, en cada proyecto muy de cerca. A mis preciados tíos, *Erika, Vanessa, Karelia, Chucho, Marianella y Fernando*, quienes siempre están pendientes de mí en todos los sentidos, han sido mi impulso, fortaleza e inspiración.

A mi pareja, *Josue Márquez*, quien me ha brindado su apoyo desde que inició este largo camino, gracias por tu amor, paciencia y por acompañarme en cada momento, eres mi complemento, mi pilar, mi fuerza, y formas parte de cada uno de mis logros.

A mis tutoras, *MSc. Amelia González* y *Lcda. Lucia Gutiérrez*, por su cariño, sabiduría, tiempo, oportunidad, dedicación, apoyo incondicional. Agradecida por cada una de las enseñanzas tanto académicas como de vida, han sido pieza clave en mi formación.

A los miembros del laboratorio *GENMOLAB*, por permitirme realizar tanto las pasantías de las Prácticas Profesionales Especiales como la parte experimental del trabajo de grado. Gracias por la oportunidad y por sus enseñanzas.

A la profesora *Indira Varela*, quien me brindó las bases teóricas en cuarto año de la carrera para el entendimiento de temas más complejos, ha sido una gran amiga y profesora.

A la profesora *Yolima Fernández*, quien fue testigo de cada corrección de este trabajo de grado, gracias a usted fue posible la presentación metodológica correcta de este trabajo.

A mi compañero, *Freddy Marquines*, quien ha sido un hermano que me ha regalado nuestra maravillosa casa de estudios, gracias por tus enseñanzas, elocuencias, risas y por haber hecho este camino acogedor.

En última instancia, este trabajo va dedicado a cada profesor de mi querida casa de estudios, la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo Sede Bárbula, cada uno de ustedes fue pieza clave en mi formación como profesional y social, gracias a ustedes me convertí en Licenciada. Los llevaré siempre en mi corazón.

Lania M. Paredes T.

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado principalmente a *Dios*, por siempre guiar mi camino y bendecirme con sabiduría, fortaleza y salud, lo que me permite estar aquí cumpliendo este tan anhelado sueño.

A mis hermosos padres, *Fernanda Valera de Marquines* y *Freddy Marquines*, quienes han sido pilares fundamentales para alcanzar cada meta propuesta, cuyo amor, cariño e inmensa paciencia son el combustible que me mantiene firme para luchar por mis sueños inspirándome a ser mejor persona cada día.

A mis hermanos, quienes han sido testigo de todo el sacrificio atravesado en este largo camino, quienes nunca dudaron de mí, incluso en esos días en los cuales yo mismo dudaba de mis capacidades.

A mis abuelas *Maximiana Estrada de Marquines* y *Adilia Melian de Valera*, quienes a pesar que no se encuentran en este plano terrenal para observar hasta donde he llegado, las llevo presente en mi corazón, esto es para ustedes.

A mis queridas tutoras, *Lucia Gutiérrez* y *Amelia González*, quienes con amor, bondad, cariño y mucha sabiduría compartieron todos sus conocimientos y amor por las ciencias. ¡Gracias, por ser parte de una maravillosa aventura científica!

A mí querida amiga, *Lania Paredes*, una sincera amistad, quien con una personalidad tan diferente, se convirtió en el complemento perfecto para alcanzar el éxito.

Y por último, pero no menos importantes, se lo dedico a los profesores de la escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo Sede Bárbula, quien se ganaron mi corazón y fueron pieza fundamental en todo este camino, porque es en ustedes, la base, donde radica la fuerza para crecer.

Freddy R. Marquines V.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra ilustre Alma Máter, la Universidad de Carabobo la cual ha sido nuestro hogar durante estos años y nos ha permitido desarrollarnos como profesionales integrales, adquiriendo conocimientos y enseñanzas valiosas para nuestro desempeño profesional y social.

A los profesores que hacen vida en la escuela de Bioanálisis, quienes con su amor y entrega han participado en nuestra formación académica.

A *la* profesora Yolima Fernández, quien fue testigo de cada corrección de este trabajo de grado, gracias a usted fue posible la presentación metodológica correcta de este trabajo

Al Laboratorio GENMOLAB y al personal que allí labora, quienes nos abrieron sus espacios para el procesamiento de este trabajo y nos brindaron su apoyo.

De forma muy especial, agradecemos a la Lcda. Lucia Gutiérrez, piedra angular en el desarrollo de este proyecto quien con sabiduría, disposición y entrega nos apoyó de forma incondicional y guió en todo momento.

A los doctores de las diversas unidades de Hematología que nos apoyaron y facilitaron la captación de la población a estudiar, en especial a la Dra. Maurelys Irigoyen, Dra. Milena Perales y Dra. Rosmelvy Becerrit, de igual forma a todos los pacientes por su receptividad y colaboración para la elaboración de este proyecto.

Finalmente, agradecemos a Dios por darnos la sabiduría para poder desarrollar este proyecto y permitimos aportar un poco de nuestro conocimiento en beneficio de la comunidad.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Diseño y tipo de investigación.....	5
Población y muestra.....	5
Consideraciones Bioéticas.....	6
Procedimiento	7
Análisis de los datos	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Preparación de soluciones buffer para la extracción de ADN.	11
2	Preparación de solución buffer TBE para electroforesis en Gel de Agarosa 1.5x.	14
3	Primers obtenidos mediante Primer3Plus.	26
4	Distribución de frecuencia de los resultados obtenidos en la detección de la mutación JAK2V617F según el tipo de NMP	39

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1A	Protocolo de extracción de ADN por método salino.	12
1B	Protocolo de extracción de ADN por método salino.	13
2A	Protocolo de electroforesis en gel de agarosa.	15
2B	Protocolo de electroforesis en gel de agarosa.	16
2C	Protocolo de electroforesis en gel de agarosa.	17
3A	Protocolo para PCR con solución GoTag-G2 Promega.	18
3B	Protocolo para PCR con solución GoTag-G2 Promega.	19
4A	Protocolo de Purificación por Perlas Magnéticas con solución MagneSil-Green para producto amplificado.	20
4B	Protocolo de Purificación por Perlas Magnéticas con solución MagneSil-Green para producto marcado.	21
5A	Protocolo de Electroforesis capilar Sanger con solución BigDye Terminator v3.1.	22
5B	Protocolo de secuenciación capilar Sanger con solución BigDye Terminator v3.1.	23

6	Resultados del BLAST del Primer Fw/Rv 1.	27
7	Resultados del BLAST del Primer Fw/Rv 2.	27
8	Resultados del BLAST del Primer Fw/Rv 3.	28
9	Amplicón y características obtenidas para el juego de Primer 1, mediante una PCR <i>in silico</i> en el software Ugene.	29
10	Amplicón y características obtenidas para el juego de Primer 2, mediante una PCR <i>in silico</i> en el software Ugene.	30
11	Amplicón y características obtenidas para el juego de Primer 3, mediante una PCR <i>in silico</i> en el software Ugene.	31
12	Visualización de la zona de alineamiento obtenida para los tres juegos de Primers diseñados, mediante una PCR <i>in silico</i> en el software Ugene.	32
13	Categorización de los pacientes de acuerdo al diagnóstico clínico.	34
14	Corrida electroforética, de las muestras extraídas.	35
15	Corrida electroforética, del fragmento JAK2 amplificado.	36
16	Electroferograma del Control Negativo.	37
17	Electroferograma del Control Positivo.	38



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



**ONCOGÉN JAK2, BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024.**

Autores: Marquines Freddy, Paredes Lania

Tutor: MSc. Amelia González

Co-Tutor: Lcda. Lucia Gutiérrez

Asesor metodológico: Santina Coccione

Línea de investigación: Genética Humana

Financiamiento: Autofinanciado

Realizado en: Laboratorio de Genética Molecular (GENMOLAB), ubicado en carretera Panamericana, Carrizal. Edo. Miranda

RESUMEN

Se realizó un estudio no experimental, descriptivo-exploratorio, de campo y corte transversal, en 45 pacientes con sospecha o diagnóstico de NMP sin expresión leucémica (PV, TE, MFP). Para detectar la mutación JAK2V617F, se diseñaron primers específicos y se aplicaron técnicas moleculares como extracción de ADN por método salino, PCR punto final, electroforesis en gel de agarosa, purificación por perlas magnéticas y secuenciación capilar sanger. Se detectó la mutación JAK2V617F en el 60% de los pacientes, con mayor frecuencia en PV (84.6%), seguido de TE (33.3%) y MFP (20%). El análisis estadístico con la prueba de Chi cuadrado de Pearson mostró una asociación significativa (X^2 : 15.89, $p < 0.001$) entre las variables estudiadas, resaltando la importancia en la detección molecular de la mutación JAK2V617F en pacientes venezolanos con sospecha de NMP. Se concluyó que el análisis cualitativo de mutación puntual JAK2V617F se consideró válido y eficiente, especialmente para identificarla por primera vez en una población o en las etapas iniciales de las neoplasias mieloproliferativas.

Palabras clave: Neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis primaria, exón 14, mutación JAK2V617F, Diseño de primer.



UNIVERSITY OF CARABOBO
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
SCHOOL OF BIOANALYSIS
DEPARTMENT OF RESEARCH AND
PROFESSIONAL DEVELOPMENT
SUBJECT RESEARCH WORK



**JAK2 ONCOGENE, DIAGNOSTIC BIOMARKER IN PATIENTS WITH
MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS (MPN). VENEZUELA. 2024.**

Authors: Marquines Freddy, Paredes Lania.

Tutors: MSc. Amelia González.

Co-Tutor: Lcda. Lucia Gutiérrez.

Methodological assessor: Santina Coccione.

Research line: Human Genetics

Funding: Autofinanced

Carried out in: Molecular Genetics Laboratory (GENMOLAB), located on the Pan-American Highway, Carrizal. Miranda State.

ABSTRACT

A non-experimental, descriptive-exploratory, field, and cross-sectional study was conducted on 45 patients with suspected or diagnosed MPN without leukemic expression (PV, ET, and PMF). To detect the JAK2V617F mutation, specific primers were designed, and molecular techniques such as DNA extraction by saline method, endpoint PCR, agarose gel electrophoresis, magnetic bead purification, and Sanger capillary sequencing were applied. The JAK2V617F mutation was detected in 60% of the patients, with the highest frequency in PV (84.6%), followed by ET (33.3%) and PMF (20%). Statistical analysis using Pearson's Chi-square test showed a significant association ($X^2: 15.89, p < 0.001$) between the studied variables, highlighting the importance of molecular detection of the JAK2V617F mutation in Venezuelan patients with suspected MPN. It was concluded that the qualitative analysis of the JAK2V617F point mutation was considered valid and efficient, especially for identifying it for the first time in a population or in the early stages of myeloproliferative neoplasms.

Keywords: Myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis, exon 14, JAK2V617F mutation, Primer design.

INTRODUCCIÓN

Las Neoplasias Mieloproliferativas (NMP), se definen como un conjunto de padecimientos neoplásicos con proliferación de un clon hematopoyético produciendo alteraciones en la maduración del linaje celular afectado, dentro de las cuales se describen: la Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MFP) ⁽¹⁾.

El origen clonal y la gran diversidad fenotípica relacionada con este grupo de enfermedades le confiere una variedad de eventos oncogénicos como mutaciones y genes de fusión que al ser expresados inducen al desarrollo de las mismas. Para el 2005 se introdujo la primera mutación conocida como “JAK2V617F” seguida de otras mutaciones que se han ido añadiendo a lo largo de las últimas dos décadas, como “Exón 12 JAK2”, “Exón 10 MPL” y “Exón 9 CARL”, las cuales han permitido una mejor comprensión de la etiopatogenia de la enfermedad y la creación de nuevos algoritmos diagnósticos que facilitan la estandarización de los criterios histopatológicos para discernir entre las diferentes neoplasias mieloproliferativas ^(1,2).

La mutación V617F en el gen JAK2 es considerada la mutación más frecuente entre las NMP, presentando según la patología un porcentaje de variación del 95% en pacientes con PV, 55% con TE y 65% con MFP, por lo que la organización mundial de la salud (OMS) establece la detección de la mutación JAK2V617F, como criterio molecular principal para el diagnóstico de NMP ^(1,3).

Debido a la variabilidad epidemiológica que presentan las NMP, existe una escasez en la recolección de datos, sin embargo, estudios han evidenciado que afectan con mayor frecuencia a individuos con edades comprendidas de 30 a 70 años, con una mediana de incidencia entre los 50 y 55 años ⁽⁴⁾.

Para el año 2020, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC), de la OMS, estimó un incremento de 19,3 millones de casos nuevos de cáncer, con un aumento en la tasa de población adulta (>60 años), entre los cuales las NMP presentó una incidencia con una tasa de 0,5-2,5 por cada 100.000 habitantes al año. ^(5,6).

En América Latina, la falta de registros dificulta conocer con mayor exactitud la incidencia de estas enfermedades. Sin embargo, se han desarrollado diversos estudios enfocados en identificar la existencia de la mutación JAK2V617F en pacientes con neoplasias mieloproliferativas, evidenciando que la presencia de dicha mutación tiene una mayor prevalencia en PV, en comparación con otras NMP, resultados que son comparados y reproducibles en otras partes del mundo ⁽⁷⁾.

En relación al comportamiento de la mutación, para el año 2020, Aguilar y col, realizaron un estudio en Argentina, donde relacionaron las manifestaciones clínicas y evolución de los pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas, BCR-ABL negativas, haciendo uso de la detección molecular de la mutación V617F en el gen JAK2. La población fue de 264 pacientes con diagnóstico de NMP por biopsia de medula ósea y resultados de BCR-ABL negativo, incluyeron a 264 pacientes, de los cuales un 25.4% (n= 67) presentó PV, un 42,8% (n= 113) presentó TE y el restante 31,8% (n= 84) con MFP, de los cuales solo le realizaron el estudio mutacional JAK^vV617F al 73.5% de los pacientes (194 personas), donde la mutación JAK2V617F fue detectada en 68% de los casos analizados ⁽⁸⁾.

Obtuvieron en los resultados, que la mutación JAK2V617F tuvo una mayor frecuencia en pacientes con Policitemia Vera, ésta se detectó en un 88% de los casos, mientras que en Trombocitemia Esencial y Mielofibrosis Primaria se detectó en un 60%, quedando demostrado que el estudio molecular para el diagnóstico de las NMP es específico y está presente en casi todos los pacientes con PV, resultados que fueron similares en comparación con estudios que arrojaron resultados positivos para la

mutación JAK2V617F en pacientes con PV en un intervalo de 80 a 90%, sin embargo, resaltaron que los factores propios de cada población, pudiesen influir en las diferencia entre ambos estudios ⁽⁸⁾.

Por su parte, Samia y col, para el año 2021 publicaron los hallazgos obtenidos en una investigación cuyo objetivo era determinar la mutación JAK2V617F en pacientes con datos clínicos orientados a un diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas (PV, TE, MFP), en una población de 974 pacientes, obtuvieron como resultados positivos un 37% (PV), 44% (TE), 29% (MFP). Finalmente, los autores señalaron que existe una relación significativa entre la presencia de la mutación y el cuadro hematológico de los pacientes, y como el detectar dicha mutación podría contribuir al diagnóstico preciso y seguimiento de los pacientes con neoplasias mieloproliferativas ⁽⁹⁾.

Más reciente, en Colombia para el año 2023, Giraldo y col, realizaron un estudio con el fin de establecer la frecuencia en las mutaciones en los genes “JAK2, MPL y CALR” en pacientes con NMP, para ello contaron con una población de 52 pacientes, obtuvieron como resultado que el 51.9% de los pacientes portaban la mutación JAK2V617F, un 23.0% mutación en el gen CARL, 3.8% la mutación MPL, y un 23.0% restante eran triple negativos para las mutaciones que analizaron, esto demostró la importancia de la caracterización molecular de las mutaciones, para lograr un diagnóstico certero y aumento en la supervivencia global del paciente ⁽⁷⁾.

En Venezuela, existe un déficit de investigaciones que aborden esta temática, lo que dificulta el poder diagnosticar y clasificar molecularmente el origen de una neoplasia mieloproliferativa en el país, en este sentido el objetivo de esta investigación fue determinar a través de técnicas de biología molecular la mutación V617F (oncogén JAK2) para el diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) en Venezuela en el año 2024.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Determinar la mutación V617F (oncogén JAK2) para el diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) a través de técnicas de biología molecular en Venezuela en el año 2024.

Objetivos específicos

- Diseñar, a través del software bioinformático (Primer3Plus), los Oligonucleótidos específicos del exón 14 del gen JAK2 para la detección de la mutación JAK2V617F.
- Categorizar la población de estudio según el tipo de neoplasia mieloproliferativa que padecen.
- Detectar la mutación JAK2V617F en las muestras biológicas de los pacientes en estudio, aplicando técnicas de biología molecular.
- Determinar la frecuencia de la mutación JAK2V617F por patología mieloproliferativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y tipo de investigación

La investigación fue de tipo descriptivo exploratorio, con un diseño no experimental de campo y de corte transversal, centrado en la recopilación de los datos de cada uno de los pacientes sin manipular las variables, y en un momento único se determinó la presencia o ausencia de la mutación JAK2V617F, en pacientes referidos por su médico especialista de diferentes estados del territorio nacional venezolano (10,11).

Población y muestra

La población y muestra estuvo conformada por 45 pacientes diagnosticados o con sospecha de una Neoplasia Mieloproliferativa en cualquiera de sus variantes (PV, TE, MFP), los cuales asistieron a interconsulta en el área de Hematología de los siguientes centros médicos: Hospital Oncológico Miguel Pérez Carreño, Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera (CHET), Hospital Central de Maracay y Hospital Victorino Santaella, en Venezuela en el año 2024. La selección de la muestra fue no probabilística intencional: se incluyeron aquellos pacientes diagnosticados o con sospecha de una NMP sin discriminación de edades, atendidos en las consultas hematológicas de los centros médicos antes mencionados.

Se consideró como criterio de exclusión, aquellos pacientes con alguna NMP que hayan presentado un resultado “Positivo” para el gen BCR-ABL, así como aquellos que no aceptaron participar en el estudio por motivos personales y privados.

Consideraciones Bioéticas

El presente estudio cumplió con los requisitos establecidos en los **Art. 6, Art. 9 y Art. 47** del reglamento de la comisión permanente, las comisiones operativas y las sub-comisiones operativas de bioética y bioseguridad de la Universidad de Carabobo, regido por el Código de Ética para la Vida, y por las leyes Nacionales, como el **Art. 46** de la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela y el **Art. 15** del Código de Deontología Médica Venezolano y los principios establecidos en las declaraciones Universales para las investigaciones genéticas en humanos, por ende, la presente investigación se apegó a los valores y principios bioéticos de Responsabilidad, No Maleficencia, Justicia, Beneficencia, Autonomía, Precaución, Solidaridad, Equidad, Transparencia, Honestidad e Integridad, con el objetivo de haber salvaguardado la integridad humana, los derechos humanos de la población en estudio y el respeto a los seres vivos ⁽¹²⁻¹⁶⁾.

Los objetivos de la investigación fueron comunicados a los médicos que laboran en los centros hospitalarios mencionados anteriormente, lugares donde se llevó a cabo la captación de los pacientes; del mismo modo se informaron los procedimientos del estudio: aplicación de encuesta tipo historia médica y extracción de muestra sanguínea o aspirado medular (según el criterio del médico especialista tratante).

Seguidamente, la información fue extendida a los pacientes estudiados, quienes autorizaron su participación voluntaria en esta investigación, a través de la firma de un consentimiento informado ⁽¹⁷⁾, en el cual se detallaron los procedimientos a desarrollar con cada participante (Anexo A). Adicionalmente, a cada participante se le entregó una copia firmada del consentimiento informado, como soporte de participación en la investigación.

Procedimiento

Ficha Médica del Paciente.

Para conocer los datos de interés clínico de cada paciente, se utilizó un cuestionario tipo ficha médica siguiendo el Art. 171 del Código de Deontología Médica ⁽¹⁶⁾, el cual se aplicó a los participantes en el estudio, el instrumento consistió en una encuesta directa y personalizada adaptadas a las necesidades que se evaluaron en el estudio, éstas incluyen: Datos de pacientes (género, edad), datos de la muestra biológica, antecedentes de enfermedades infecciosas y consideraciones generales del paciente (Anexo B). Con el fin de tener un acercamiento a la realidad en que viven o vivían estas personas y conocer su estado clínico, se tenía justo la información relevante para llevar a cabo la investigación ^(18,19).

Diseño de Oligonucleótidos.

Con el fin de iniciar el diseño de los oligonucleótidos para el estudio, se extrajo la secuencia nucleotídica del gen JAK2, de la base de datos del GenBank del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), se siguieron los pasos explicados a continuación:

1. Obtención de la secuencia del gen JAK2:

Al ingresar a la web del GenBank, en la parte superior izquierda de su interfaz se encontraron los diferentes tipos de búsqueda, se seleccionó la exclusiva para genes. Se introdujo el nombre del gen (JAK2) en la barra de búsqueda, e inmediatamente la base de datos arrojó un listado de varias secuencias nucleotídicas específicas del gen de interés, de las cuales la únicamente relevante fue la especificada para el organismo Homo sapiens.

2. Localización del codón del aminoácido 617 en el Transcrito:

Gracias a una búsqueda bibliográfica previamente realizada, donde se describió que el cambio mutagénico JAK2V617F, ocurre en el aminoácido ubicado en la posición 617 de la proteína JAK2^(1,2), se extrajo la secuencia de ARNm (transcrito) correspondiente al gen, siendo esta secuencia la que se traduce en la proteína.

Se tuvo en consideración, que cada aminoácido es codificado por un triplete de nucleótidos (codón), por lo tanto, se procedió a multiplicar el número de la posición del aminoácido por tres, obteniendo la posición del último nucleótido del codón ($617 \times 3 = 1.851$) y de esta forma se dedujo que el aminoácido 617 está codificado por los nucleótidos en las posiciones 1.849 a 1.851 del ARNm.

Con el fin de confirmar que la región antes señalada es la zona específica de interés, se determinó en cual exón se encuentra la posición 1.849 del ARNm, en la secuencia de referencia del gen JAK2, evidenciando que el codón que traduce el aminoácido 617 se encuentra en el exón 14 del gen en estudio, identificando el sitio de interés para el diseño de los primers.

3. Diseño de los primers en el software bioinformático:

Una vez identificada la zona de interés para la amplificación, se procedió al diseño de los primers mediante el software bioinformático de código abierto “Primer3Plus”. Con el fin de haber obtenido variedad en los primers diseñados y definido el más adecuado para la amplificación de la secuencia de interés del gen JAK2, se investigaron los parámetros que influyen en el diseño de los primers⁽²⁰⁾, de los cuales se seleccionaron aquellos que cumplieron con todos los parámetros establecidos.

Una vez en la interfaz que presenta Primer3Plus en su ventana principal, se insertó la secuencia nucleotídica de interés del gen JAK2 en formato “.fasta”, se marcaron a su vez las casillas para obtener el primer forward (*Fw*) y primer reverse (*Rv*). En el segundo apartado de configuración general, se estableció el tamaño del primer que osciló entre 18 a 30 pb, con un óptimo de 20 pb, de igual forma se ajustó la temperatura de melting (*Tm*) a un rango entre 55 y 65°C con un óptimo de 62 °C y con una diferencia máxima de 5 °C entre pares de primers. El %GC se ordenó entre 40 y 60% y un amplicón de entre 150 a 350pb.

4. Análisis de especificidad y validez de los primers:

Para determinar la especificidad de los primers se utilizó la herramienta bioinformática BLAST (Búsqueda de alineación de secuencia local) del GenBank del NCBI, en la cual se verificaron que los primers diseñados, solo alinearan en la región de interés (gen JAK2), confirmando la especificidad de los mismos.

Una vez en la interfaz de la página, se seleccionó la opción “Nucleotide BLAST” y posteriormente se introdujo la secuencia del primer en la casilla de la parte superior izquierda, y se seleccionó como conjunto de búsqueda “RefSeq_Gene (Secuencias RefSeq Humanas)”. Tras haberse configurado los parámetros, se realizó el alineamiento y se obtuvo un listado de secuencias de genes de diferentes organismos, los cuales tuvieron especificidad de unión con dicho primer, quedando determinado finalmente la identidad del primer referente al gen JAK2 del organismo seleccionado, *Homo sapiens*.

Como parte final, se llevó a cabo una prueba *in silico* de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ayuda del programa Ugene, en el cual se compararon las secuencias de los primers con la secuencia de nucleótidos del gen de interés, lo cual permitió aceptar o rechazar el par de imprimaciones diseñadas ⁽²¹⁾. Una vez instalado y ejecutado el programa en la computadora, se cargó el archivo de la secuencia del

gen JAK2 en formato **.fasta**, y se visualizó toda la secuencia nucleotídica en la pantalla principal.

Con el fin de iniciar la PCR *in silico*, se seleccionó la opción “In Silico PCR” que se localiza en la barra de tarea ubicada en la zona superior derecha del programa, seguidamente se desplegó una ventana y se ingresó la secuencia de los primers Forwards y Reverses. Una vez cargados los primers, el programa inmediatamente calculó y presentó las dificultades que podrían tener los primers en la PCR, además indicó la región amplificada, la longitud del amplicón y la temperatura de alineamiento, quedando demostrado *in silico*, la eficacia de los primers y reveló el resultado que se obtendría al realizar una PCR *in vitro* con los primers verificados.

Técnicas de Biología Molecular

1- **Extracción de ADN:** Para la extracción de ADN se emplearon muestras de Sangre total o aspirado medular conservadas con el anticoagulante EDTA, se realizó a través del método salino propuesto por Lahiri y Numberger en el año 1991 y utilizado en la actualidad ^(22,23). Los procesos por los cuales se realizó la extracción de ADN por método salino, fueron descritos en las Figuras 1A y 1B.

Tabla 1. Preparación de soluciones buffer.

Buffer TKM1 (1L)		Buffer TKM2 (500 mL)	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Tris HCl	12,11 g	NaCl	11,70 g
KCl	7,44 g	TKM1	500 mL
MgCl ₂	20,22 g		
EDTA	7,44 g		
H ₂ O	1 L		

Fuente: Lahiri y Numberger. 1991 ⁽²²⁾.

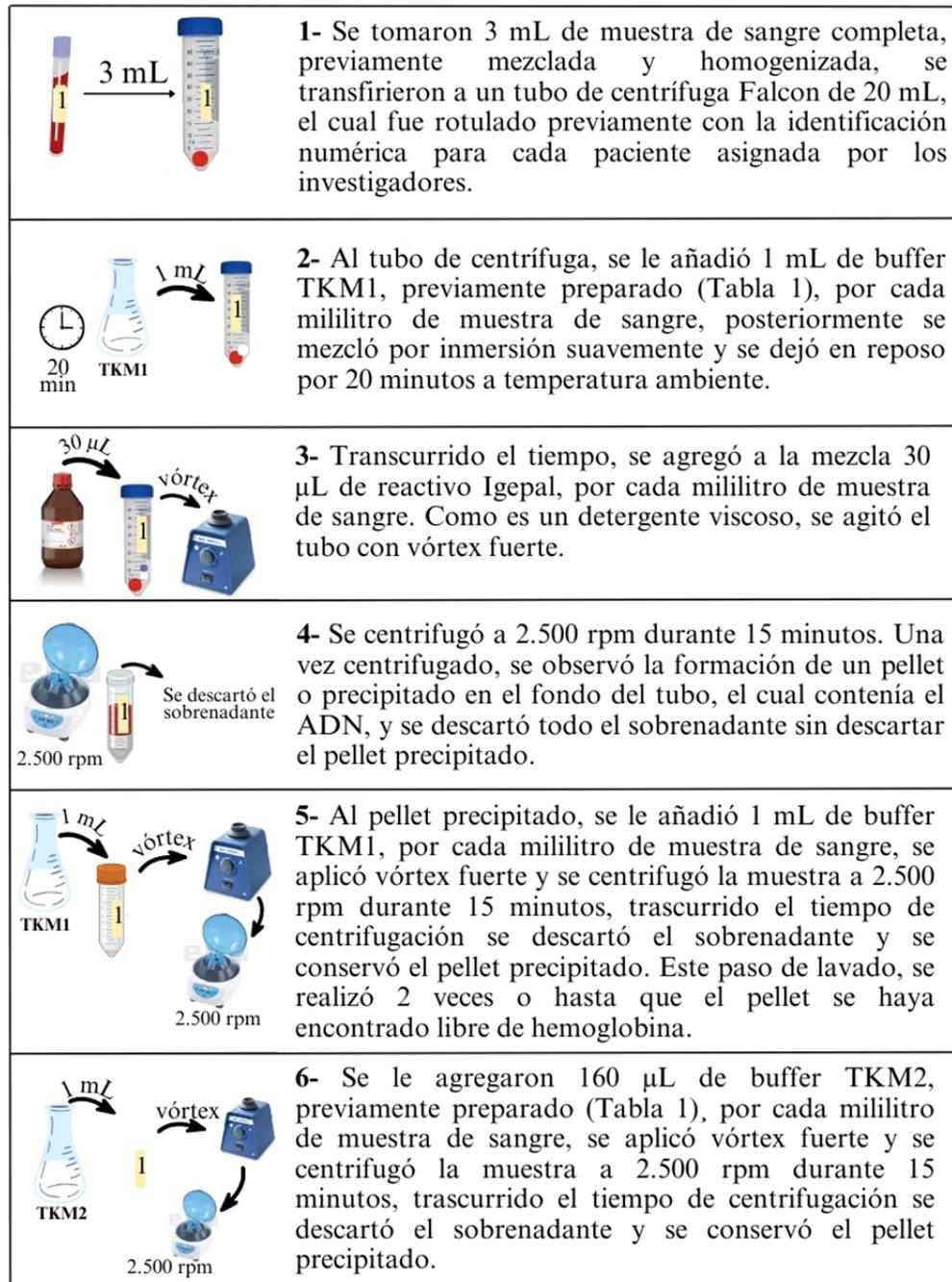


Figura 1A: Protocolo de Extracción de ADN por Método Salino. Extraído de Lahiri y Numberger 1991 ⁽²²⁾ y Modificado por Marquines, Paredes. 2024.

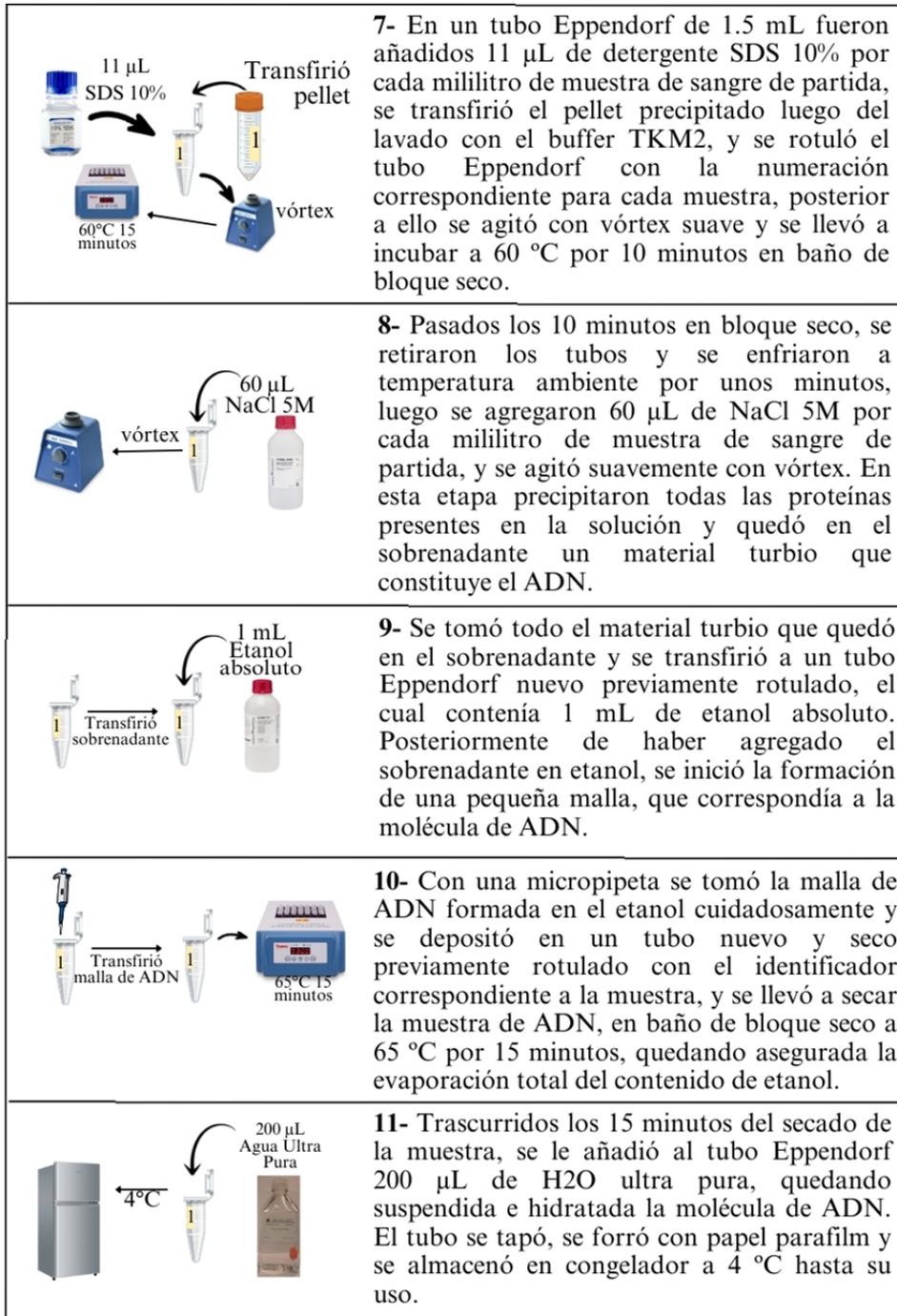


Figura 1B: Protocolo de Extracción de ADN por Método Salino. Extraído de Lahiri y Numberger 1991 ⁽²²⁾ y Modificado por Marquines, Paredes. 2024.

2- **Electroforesis en Gel de Agarosa 1.5x:** La electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5x, se utilizó para cuantificar cualitativamente la concentración de ADN extraído de las muestras analizadas y se determinó la longitud y pureza de los fragmentos amplificados ⁽²³⁾. El proceso por el cual se realizó la electroforesis de las muestras de ADN y de los productos amplificados en gel de agarosa, fueron descritos en las Figuras 2A, 2B y 2C.

Tabla 2. Preparación de solución buffer TBE.

Buffer TBE 10 x (500 mL)		Buffer TBE 1x (1 L)	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Tris Base	54,0 g	TBE 10 x	100 mL
Ácido Bórico	27,5 g	H2O dest	900 mL
EDTA	4,65 g o 20 mL		
H2O dest	500 mL		

Fuente: Hernández A.K. 2018 ⁽²³⁾.

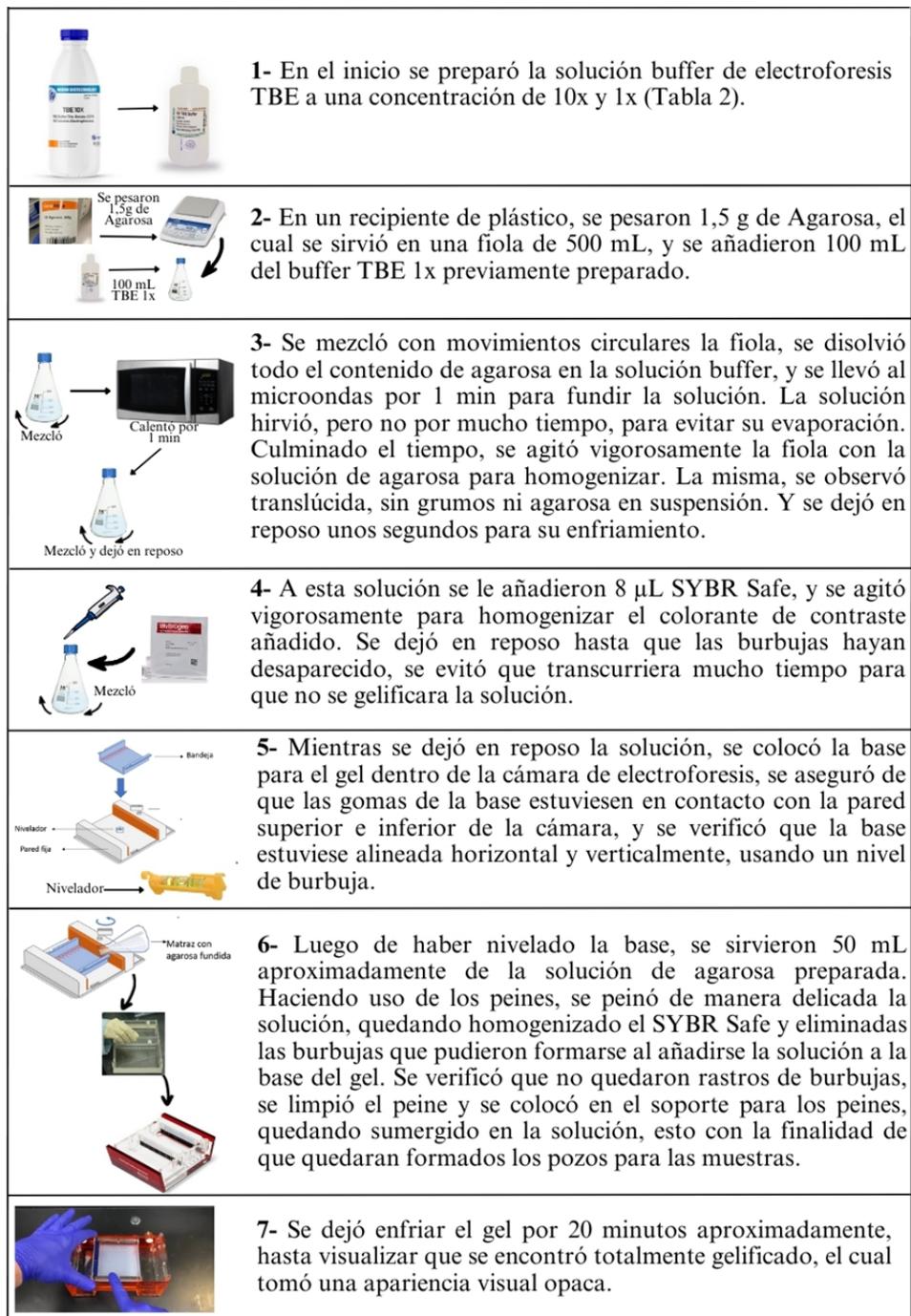


Figura 2A: Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa. Extraído de Hernández A.K 2018 ⁽²³⁾ y Modificado por Marquines, Paredes. 2024.

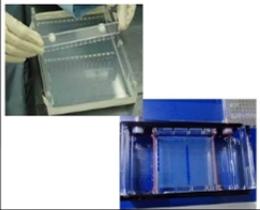
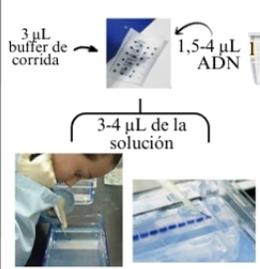
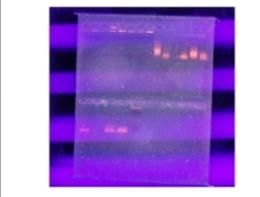
	<p>8- Una vez gelificado, se retiraron los peines cuidadosamente y se retiró la base, la cual se colocó de lado dentro de la cámara, con las gomas en dirección a las paredes derecha e izquierda de la cámara. Los pozos se posicionaron hacia el ánodo (carga negativa), de esta forma se aseguró que la corrida se haya realizado hacia el polo positivo (cátodo).</p>
	<p>9- Una vez que los geles se han posicionado, fueron añadidos en el interior de la cámara 500 mL de buffer de electroforesis (TBE 1x) aproximadamente, se sumergió completamente el gel y se procedió a servir las muestras en cada pozo del gel.</p>
	<p>10- Para la cuantificación cualitativa de ADN, se sirvieron aproximadamente 1,5 - 4 µL de ADN suspendidos en un buffer de corrida, para ello se tomó un papel parafilm y se colocaron 3 µL de buffer de corrida, luego se tomó la alícuota de muestra de ADN y se homogenizó con el buffer de corrida. Se tomó todo el volumen con la pipeta, y se sirvió en uno de los pozos del gel. (Este paso se repitió en cada muestra analizada).</p>
	<p>11- Una vez servidas todas las muestras, se cerró la cámara, se colocó la tapa y se encendió la fuente de poder de la cámara, presionando el botón "RUN" y se visualizó que llegase a un voltaje de 99v, y se dejó la corrida aproximadamente por 30 minutos.</p>
	<p>12- Se retiró la tapa de la cámara y se sacó el gel dejándolo escurrir por unos segundos. Se colocó el gel dentro de la cámara de luz UV, se cerró la puerta y se procedió a encender la luz en el interruptor, de esta forma, se visualizó el gel. SE EVITÓ EXPONERSE DIRECTAMENTE A LA LUZ UV.</p>
	<p>13- El gel, se visualizó a través de la pantalla del fotodocumentador de la cámara de luz UV, almacenando una fotografía de la corrida del gel.</p>
	<p>14- Luego de haber visualizado el gel, se apagó la luz UV, y se retiró el gel del interior de la cámara.</p>

Figura 2B: Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa. Extraído de Hernández A.K 2018 ⁽²³⁾ y Modificado por Marquines, Paredes. 2024.

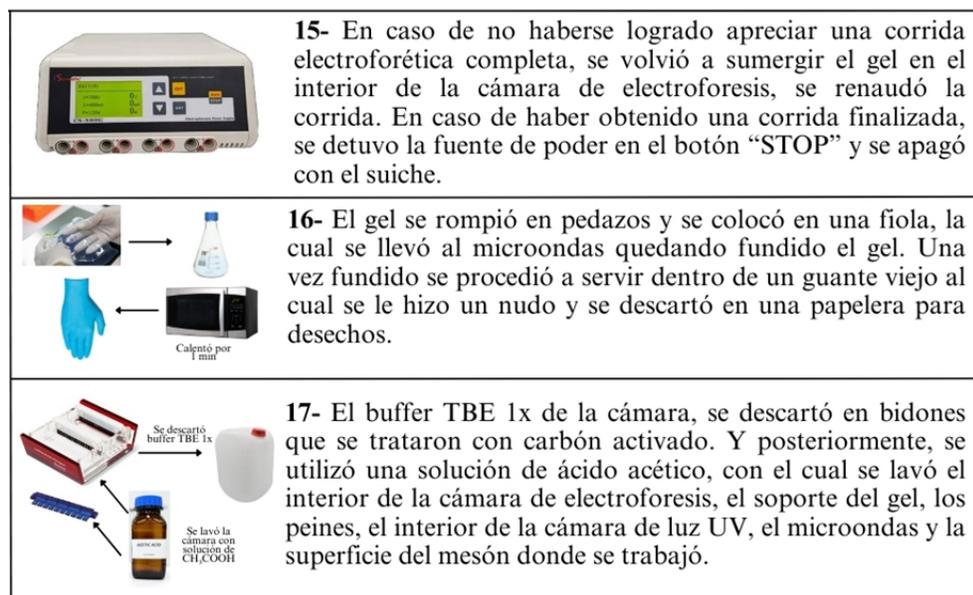


Figura 2C: Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa. Extraído de Hernández A.K 2018 ⁽²³⁾ y Modificado por Marquines, Paredes. 2024.

3- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Mediante la técnica de PCR, se amplificó la región de interés en el ADN extraído de las muestras, para ello se utilizó una solución para PCR “**GoTaq G2 - GreenMasterMix**” de la casa comercial PROMEGA, solución que contenía todos los componentes necesarios a concentraciones adecuadas para su uso, y se empleó un equipo termociclador GeneAmp PCR System 9700 de la casa comercial APPLIED BIOSYSTEMS, con el cual se llevó a cabo el proceso de amplificación por PCR ⁽²⁴⁾. Los procesos realizados para la amplificación del gen de interés fueron descritos en las Figuras 3A y 3B.

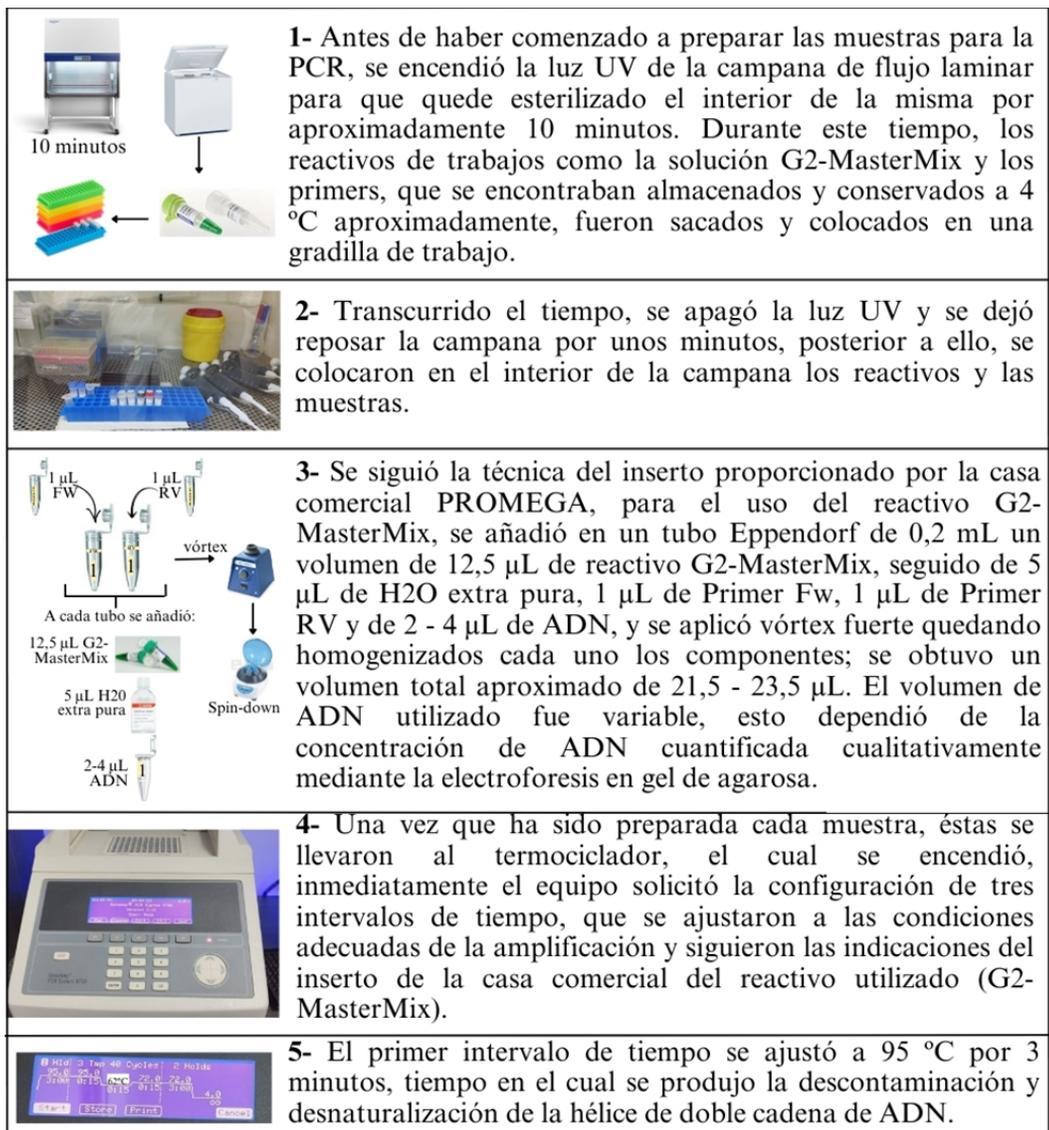


Figura 3A: Protocolo de PCR con solución GoTaq G2-Promega. Elaborado por Marquines, Paredes. 2024 ⁽²⁴⁾.

	<p>6- El segundo intervalo, fue dividido en tres variaciones de temperaturas por intervalo de tiempo, la primera temperatura se ajustó a 95° C por 15 segundos, de esta forma se aseguró la desnaturalización de la muestra, el segundo tiempo se ajustó a una temperatura óptima para el alineado de los primers, el cual fue indicado por el Tm del primer diseñado, éste osciló entre 55 – 65 °C por 15 segundos, por último, la tercera temperatura se ajustó a 72 °C por 15 segundos, siendo la temperatura óptima para que la enzima TaqPolimerasa realice el proceso de extensión. Este segundo intervalo se repitió 40 veces, para ello se le indicó al equipo al momento de configurar el número de ciclos necesarios.</p>
	<p>7- El tercer intervalo estuvo constituido de dos variaciones de temperatura por intervalos de tiempo, donde se ajustó la primera temperatura a 72 °C por 3 minutos, asegurando que la TaqPolimerasa termine el proceso de Extensión, y la segunda temperatura se llevó a 4 °C por tiempo indefinido. Esta última temperatura y final de la reacción de PCR, mantuvo refrigerada y almacenada la muestra, en condiciones óptimas, por ende, se evitó que el producto amplificado fuese degradado por exceso de calor.</p>

Figura 3B: Protocolo de PCR con solución GoTaq G2-Promega. Elaborado por Marquines, Paredes. 2024 ⁽²⁴⁾.

4- **Purificación por Perlas Magnéticas:** Es una técnica que se utilizó para la purificación del material genético, productos amplificados y productos marcados ⁽²⁵⁾. La purificación se llevó a cabo empleando perlas magnéticas de la casa comercial PROMEGA (MagneSil-Green). Los procesos por los cuales se realizó la purificación de las muestras por el método de MagneSil-Green, fueron descritos en las Figuras 4A y 4B.



Figura 4A: Protocolo de Purificación por Perlas Magnéticas con solución MagneSil-Green para producto amplificado. Tomado de Promega, MagneSil Sequencing Reaction Clean-Up System 2010 ⁽²⁵⁾. Elaborado por Marquines, Paredes. 2024.



Figura 4B: Protocolo de Purificación por Perlas Magnéticas con solución MagneSil-Green para producto marcado. Tomado de Promega, Magnesil Sequencing Reaction Clean-Up System 2010 ⁽²⁵⁾. Elaborado por Marquines, Paredes. 2024.

5- **Secuenciación por Electroforesis Capilar Sanger:** Se aplicó una técnica de separación basada en la diferencia de la velocidad de migración de moléculas o biomoléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico, por ende, se determinó la secuencia específica de ácidos nucleicos (orden de las bases) en el producto amplificado. La secuenciación electroforética de los productos de la PCR purificados, se realizó en un Secuenciador ABI modelo 310, para ello, las muestras fueron tratadas con un reactivo de marcaje como el **BigDye – Terminator v3.1** de la casa comercial APPLIED BIOSYSTEMS ⁽²⁶⁾. Los procesos por los cuales se realizó la secuenciación por electroforesis capilar Sanger, fueron descritos en las Figuras 5A y 5B.

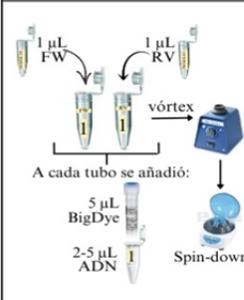
 <p>10 minutos</p>	<p>1- Antes de haber preparado las muestras para el marcaje, se encendió la luz UV de la campana de flujo laminar para la esterilización del interior de la misma por aproximadamente 10 minutos. Durante este tiempo, los reactivos de trabajo como la solución BigDye y los Primers que se encontraban almacenados y conservados a 4 °C aproximadamente, fueron sacados y colocados en una gradilla de trabajo.</p>
	<p>2- Transcurrido el tiempo, se apagó la luz UV y se dejó en reposo la campana por unos minutos, posterior a ello, se ingresaron los reactivos y las muestras en el interior de la campana de flujo laminar, posteriormente se preparó la solución de amplificación.</p>
 <p>A cada tubo se añadió:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1 µL FW 1 µL RV 5 µL BigDye 2-5 µL ADN <p>vórtex</p> <p>Spin-down</p>	<p>3- Se siguió la técnica del inserto proporcionado por la casa comercial APPLIED BIOSYSTEMS, para el uso del reactivo BigDye, se prepararon dos tubos Eppendorf de 0.2 mL por cada muestra marcada, donde fueron añadidos a cada tubo un volumen de 5 µL de reactivo BigDye, 2 - 5 µL de ADN, y por último a un tubo se le agregó 1 µL de Primer FW, y al otro tubo 1 µL del Primer RV, (los tubos se rotularon con las siglas FW y RV para la identificación correcta de la cadena marcada), posteriormente se aplicó vórtex fuerte y se centrifugó brevemente (Spin-down), quedaron homogenizados los componentes; y se obtuvo un volumen total aproximado de 10 µL.</p>
	<p>4- Una vez que se prepararon cada una de las muestras se llevaron al termociclador, éste se encendió y el equipo solicitó la configuración de tres intervalos de tiempo, que fueron ajustados a las condiciones adecuadas del marcaje siguiendo las indicaciones del inserto de la casa comercial del reactivo utilizado (BigDye).</p>
	<p>5- El primer intervalo se ajustó a 96 °C por tres minutos, tiempo en el cual se produjo la descontaminación y desnaturalización del producto purificado.</p>

Figura 5A: Protocolo de Secuenciación Capilar Sanger con solución BigDye Terminator v3.1. Elaborado por Marquines, Paredes. 2024.

	<p>6- El segundo intervalo, fue dividido en tres variaciones de temperatura por intervalo de tiempo, la primera temperatura se ajustó a 96 °C por 10 segundos, quedando asegurada la desnaturalización de la muestra, el segundo tiempo se ajustó a una temperatura óptima para el alineado de los primers, el cual fue indicado por el Tm del primer diseñado, éste osciló entre 55 – 65 °C por 5 segundos, por último, la tercera temperatura se ajustó a 60 °C por 2 minutos, ésta fue la temperatura necesaria para que la enzima TaqPolimerasa haya realizado el proceso de extensión. Este segundo intervalo se repitió 30 veces, para ello se le indicó al equipo al momento de configurar el número de ciclos necesarios.</p>
	<p>7- El tercer intervalo de tiempo estaba conformado de dos variaciones de temperatura, donde ambas variaciones se ajustaron a la misma temperatura 4 °C, la primera por 7 minutos, la segunda por tiempo indefinido. Esta última temperatura y final de la reacción de marcaje, se utilizó para que estuviese refrigerada la muestra, conservó de esta forma, la misma en condiciones óptimas para evitar que el producto marcado fuese degradado por exceso de calor.</p>
	<p>8- Una vez obtenido el producto marcado, se procedió a purificarlo a través del método de purificación por perlas magnéticas MagneSil-Green de PROMEGA (Protocolo explicado en el ítem “Purificación por Perlas Magnéticas”).</p>
	<p>9- Posteriormente, se cargó la placa de trabajo del secuenciador, se configuró el equipo utilizando el software asociado a su PC “DATA COLLECTION GENE ANALYZER V3.0”.</p>
	<p>10- Se introdujo la placa en el secuenciador, una vez reconocida la placa, se relacionó la ubicación de la placa con las indicaciones del plato de trabajo, se especificó el orden y la ubicación de las muestras a leer.</p>
	<p>11- Finalizada la secuenciación, el software, generó un electroferograma, el cual indicaba el orden de las bases en las cadenas leídas en cada muestra. Los electroferogramas se guardaron automáticamente en una carpeta preestablecida.</p>
	<p>12- Una vez obtenidos los Electroferogramas, los mismos fueron analizados a través del software “Sequencing Analysis”, en la cual se evidenció si la secuencia de las bases presentaba algún cambio o mutación en la región de interés.</p>

Figura 5B: Protocolo de Secuenciación Capilar Sanger con solución BigDye Terminator v3.1. Elaborado por Marquines, Paredes. 2024.

Análisis de los datos

Los resultados se expresaron y se analizaron en tablas descriptivas, para ello se emplearon frecuencias absolutas y relativas (%) en las variables que lo ameritaron. Se aplicó la prueba Chi cuadrado de Pearson para comparar o asociar las variables cualitativas estudiadas. Se utilizó para el análisis el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Science) versión 26.0 para Windows para el análisis de los resultados de las variables con un nivel de significancia igual a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

- **Diseño de los oligonucleótidos.**

El GenBank (NCBI) al ser una plataforma que realiza intercambio de datos con el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA) y el Banco de Datos de Japón (DDBJ), contiene secuencias de nucleótidos disponibles para 420.000 especies, teniendo una cobertura mundial sobre las secuencias genéticas descritas hasta la actualidad ⁽²⁷⁾. El resultado de la búsqueda de la secuencia genética del gen JAK2 para la especie Homo Sapiens fue única, por ende, se obtuvo una secuencia de referencia “Refseq-Gene” con el código de acceso NG_009904.1.

Con el software Primer3Plus, se obtuvieron primers con diferentes características, se mantuvieron los parámetros estándar del programa y se modificaron algunos parámetros a conveniencia con el fin de haber mejorado la especificidad y sensibilidad de los primers, como por ejemplo, la concentración de iones divalentes, se ajustó a una concentración estándar de 1.5 mM cloruro de magnesio ($MgCl_2$). La concentración de $MgCl_2$, influyó de forma proporcional en la reacción de PCR, aumentó la temperatura de hibridación del ADN y por ende la optimización de la reacción, permitiendo haber obtenido una mayor especificidad ⁽²⁸⁾. Como resultado, se obtuvieron un total de tres pares de primers, cuyas características son mostradas en la tabla 3.

Tabla 3. Primers obtenidos mediante Primer3Plus

1 ^{er} par de Primer						
Sentido	Longitud (pb)	Tm (°C)	% GC	Self	ΔG (kcal/mol)	Secuencia
Fw	24	50.0	20.83	2	-1.5	5'- CAATTCTTTGTACTTTTTTTTTTC -3'
Rv	22	54.0	31.8	3	-2.0	5'- TCTTGTGAAAAAGGAAAGCAAT -3'
Amplicon:		302 pb				
Diferencia de Tm:		4.0 °C				
Tm en conjunto:		52.0 °C				
Formación de Dímeros:		Media probabilidad				
2 ^{do} par de Primer						
Sentido	Longitud (pb)	Tm (°C)	% GC	Self	ΔG (kcal/mol)	Secuencia
Fw	20	58.0	40	4	-3.0	5'- TCTTTGAAGCAGCAAGTATG -3'
Rv	20	58.0	40	5	-3.5	5'- CTTTCTAATGCCTTCTCAG -3'
Amplicon:		121 pb				
Diferencia de Tm:		0 °C				
Tm en conjunto:		58 °C				
Formación de Dímeros:		Alta probabilidad				
3 ^{er} par de Primer						
Sentido	Longitud (pb)	Tm (°C)	% GC	Self	ΔG (kcal/mol)	Secuencia
Fw	21	60.0	50.0	1	-2.0	5'- GCTGAAAGTAGGAGAAAGTGC -3'
Rv	24	64.0	34.8	1	-3.0	5'- GGAGTTAAGTATTTTGAAACTGA-3'
Amplicon:		332 pb				
Diferencia de Tm:		4 °C				
Tm en conjunto:		62 °C				
Formación de Dímeros:		Baja probabilidad.				

Para confirmar que los primers diseñados, fueran altamente específicos para la amplificación el gen JAK2, se realizó una búsqueda con la herramienta Nucleotide BLAST en la plataforma GenBank NCBI. Se verificó que los primers estuvieran alineados un 100% con el gen de interés (Homo sapiens gene JAK2).

De este modo, se confirmó que los 6 primer diseñados, eran altamente específicos para la región del gen JAK2, teniendo un alineamiento del 100% con el gen de interés.

Enter Query Sequence
 Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#)

CAATTCTTTGTACTTTTTTTTTTC
Primer 1 Fw

Or, upload file [Seleccionar archivo](#) Ningún archivo seleccionado [?](#)

select all 1 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Homo sapiens insulin like 6 (INSL6), RefSeqGene on chromosome 9	Homo sapi...	48.1	222	100%	2e-05	100.00%	200762	NG_046909.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG_612) on chr...	Homo sapi...	48.1	122	100%	2e-05	100.00%	149939	NG_009904.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit 1 (MCCC1), Ref...	Homo sapi...	46.1	343	95%	7e-05	100.00%	107979	NG_008100.2

Enter Query Sequence
 Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#)

TCTTGTGAAAAAGGAAAGCAAT
Primer 1 Rv

select all 1 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Pan troglodytes BAC clone RP43-17L12 from chromosome 7, contig...	Pan trogl...	44.1	44.1	100%	0.082	100.00%	162877	AC145970.2
<input type="checkbox"/> Homo sapiens insulin like 6 (INSL6), RefSeqGene on chromosome 9	Homo sapi...	44.1	44.1	100%	0.082	100.00%	200762	NG_046909.1
<input type="checkbox"/> Human DNA sequence from clone RP11-39K24 on chromosome 9, ...	Homo sapi...	44.1	44.1	100%	0.082	100.00%	171146	AL161450.14
<input type="checkbox"/> Homo sapiens BCR/JAK2 breakpoint junction	Homo sapi...	44.1	44.1	100%	0.082	100.00%	1049	JN021382.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), gene, exon 12 and cartil ods	Homo sapi...	44.1	44.1	100%	0.082	100.00%	376	EF094945.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG_612) on...	Homo sapi...	44.1	44.1	100%	0.082	100.00%	149939	NG_009904.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Marmota marmota marmota uncharacterized LOC12...	Marmota...	40.1	40.1	90%	1.3	100.00%	22418	XR_007342392.1

Figura 6. Resultados del BLAST del Primer Fw/Rv 1.

Enter Query Sequence
 Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#)

TCTTTGAAGCAGCAAGTATG
Primer 2 Fw

select all 1 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Homo sapiens insulin like 6 (INSL6), RefSeqGene on chromosome 9	Homo sapi...	40.1	244	100%	0.002	100.00%	200762	NG_046909.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG_612) on chr...	Homo sapi...	40.1	222	100%	0.002	100.00%	149939	NG_009904.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens protein tyrosine phosphatase receptor type D (PTPRD)...	Homo sapi...	32.2	621	100%	0.53	100.00%	2305478	NG_033993.1

Enter Query Sequence
 Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#) [Query subrange](#) [?](#)

CTTTCTAATGCCTTCTCAG| **Primer 2 Rv** From

select all 1 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG_612) on chr...	Homo sapi...	40.1	40.1	100%	0.002	100.00%	149939	NG_009904.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens insulin like 6 (INSL6), RefSeqGene on chromosome 9	Homo sapi...	40.1	40.1	100%	0.002	100.00%	200762	NG_046909.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2 (...)	Homo sapi...	34.2	153	95%	0.13	100.00%	167132	NG_053155.2

Figura 7. Resultados del BLAST del Primer Fw/Rv 2.

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ? Clear

GCTGAAAGTAGGAGAAAGTGC

Primer 3 Fw

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Homo sapiens insulin like 6 (INSL6), RefSeqGene on chromosome 6	Homo sap...	42.1	42.1	100%	7e-04	100.00%	200762	NG_046989.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG_612) on chr...	Homo sap...	42.1	42.1	100%	7e-04	100.00%	149939	NG_009904.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens calcium dependent secretion activator 2 (CADPS2), RefSeqGene (LRG_612) on chr...	Homo sap...	34.2	149	80%	0.17	100.00%	575338	NG_016215.2

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ? Clear

GGAGTTAAGTATTTTTGAACTGA

Primer 3 Rv

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Homo sapiens insulin like 6 (INSL6), RefSeqGene on chromosome 6	Homo sapi...	48.1	48.1	100%	2e-05	100.00%	200762	NG_046989.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens Janus kinase 2 (JAK2), RefSeqGene (LRG_612) on chr...	Homo sapi...	48.1	48.1	100%	2e-05	100.00%	149939	NG_009904.1
<input type="checkbox"/> Homo sapiens roundabout guidance receptor 2 (ROBO2), RefSeqGene (LRG_612) on chr...	Homo sapi...	38.2	582	95%	0.068	100.00%	1750271	NG_027734.2

Figura 8. Resultados del BLAST del Primer Fw/Rv 3.

Por último, con el fin de que quedaran definidos los juegos de primers diseñados, se realizó una PCR *in silico*, mediante la herramienta bioinformática Ugene, con la cual se recreó de forma virtual el comportamiento de los primers según sus características, se visualizó la región específica de alineamiento y se validó que no generasen complicaciones en la PCR *in vitro* ⁽²¹⁾. Se ejecutó esta acción en cada juego de primers diseñados en Primer3Plus, se visualizó la región de alineamiento, y las características de los juegos de primers:

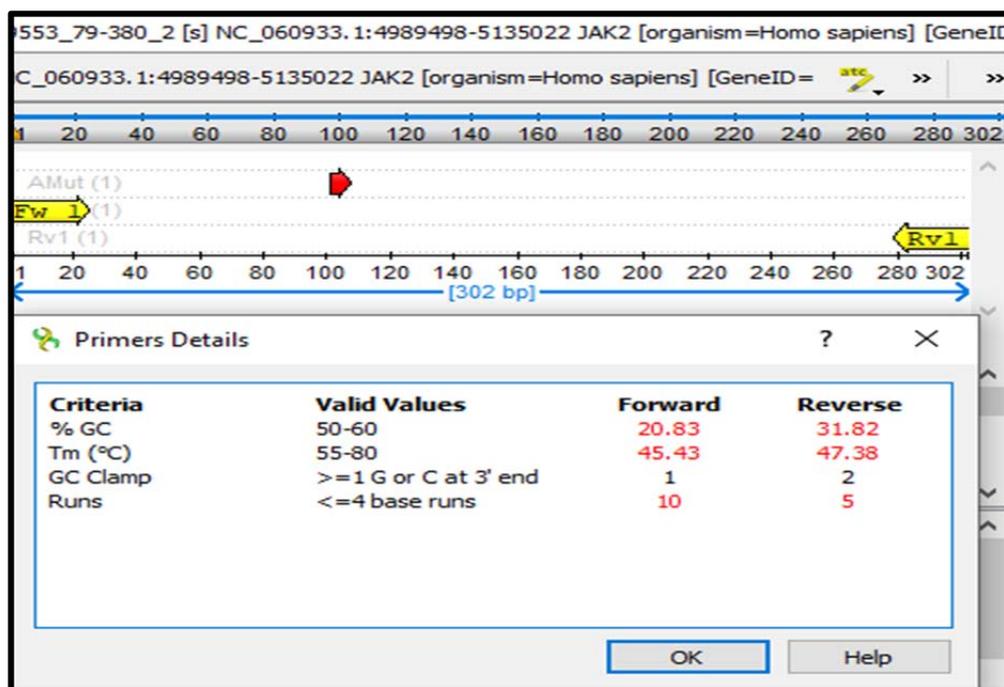


Figura 9. Amplicón y Características obtenidas para el juego de Primer 1, mediante una PCR *in silico* en el software Ugene.

Para el juego de primer número 1, se visualizó un amplicón de 302 pb, siendo un tamaño adecuado para una amplificación por PCR, de igual forma se obtuvo una probabilidad media en formación de dímeros o heterodímeros que pudiesen haber intervenido en la reacción. Por otro lado, ambos primers presentaron un contenido de GC bajo, lo que podría haber afectado la eficiencia de la amplificación, al igual que presentaron temperaturas de fusión menor a lo establecido en las bibliografías y a lo reportado por el software de diseño Primer3Plus, ya que Ugene utilizó la regla de Wallace para el cálculo de temperatura de fusión, éste reportó temperaturas diferentes en comparación a las calculadas en el software Primer3Plus, el cual utilizó la fórmula termodinámica ⁽²⁰⁾.

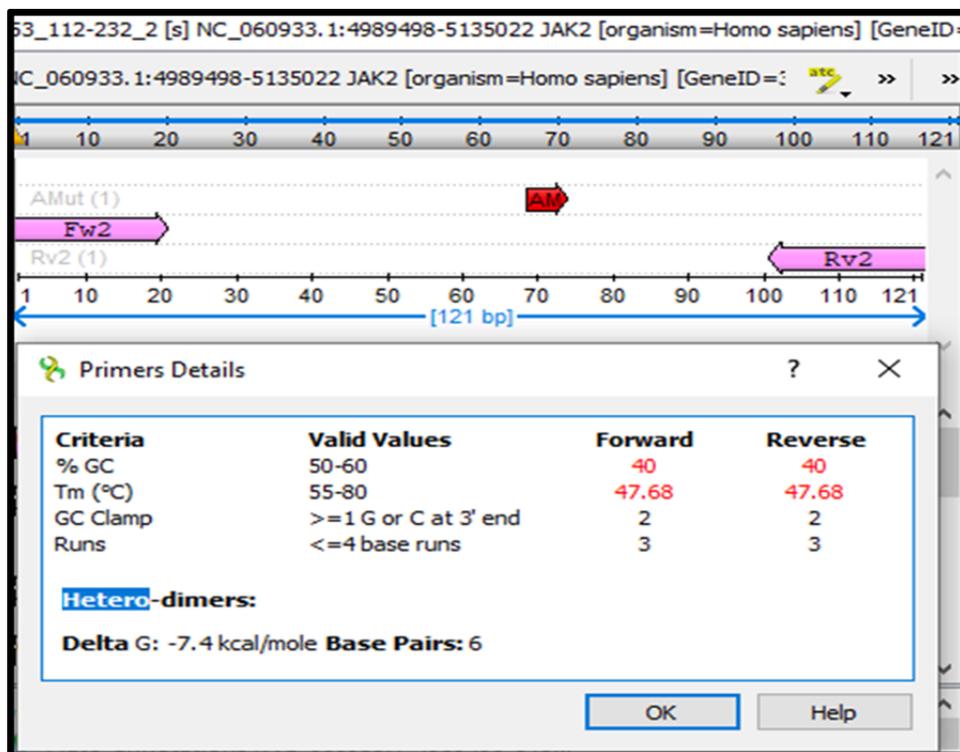


Figura 10. Amplicón y Características obtenidas para el juego de Primer 2, mediante una PCR *in silico* en el software Ugene.

Para el juego de primer 2, el amplicón fue de menor tamaño, amplificó una banda de 121 pb, en este caso, se presentó un valor de Tm igual en ambos primers, por otro lado, el programa reportó un contenido de GC disminuido para el primer Forward y Reverse, debido a que Ugene trabajó con un rango que osciló entre 50 a 60%, por su parte, en el momento en que se diseñaron los primers se tomó un rango que osciló entre 40 a 60%, los cuales se obtuvieron bibliográficamente, esto no representó un problema en la PCR *in-vitro* ⁽²¹⁾, sin embargo, presentó alta probabilidad de formar estructuras complementarias entre sí (Heterodímeros) por su elevada autocomplementariedad, por ende, existió la probabilidad de que hubiesen

errores en la PCR *in vitro* de forma moderada, y se hubiesen obtenido resultados pocos satisfactorios no relevantes para el interés de diagnóstico necesario.

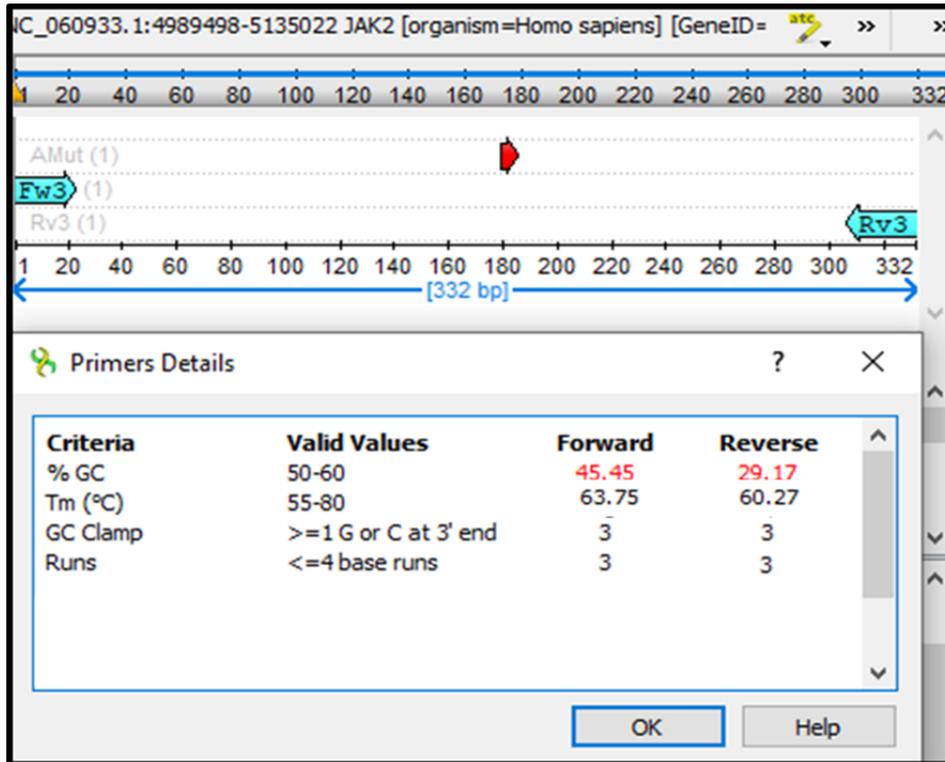


Figura 11. Ampliación y Características obtenidas para el juego de Primer 3, mediante una PCR *in silico* en el software Ugene.

El tercer juego de primer, presentó una banda de amplificado de 332 pb, con una temperatura de alineamiento promedio de 62 °C, presentó baja autocomplementariedad y baja capacidad en la formación de heterodímeros, por otro lado, es de importancia resaltar que el primer Reverse presentó bajo contenido de GC lo cual podría haber generado una alineación un poco más débil a lo establecido bibliográficamente pero se generaron resultados igual de satisfactorios.

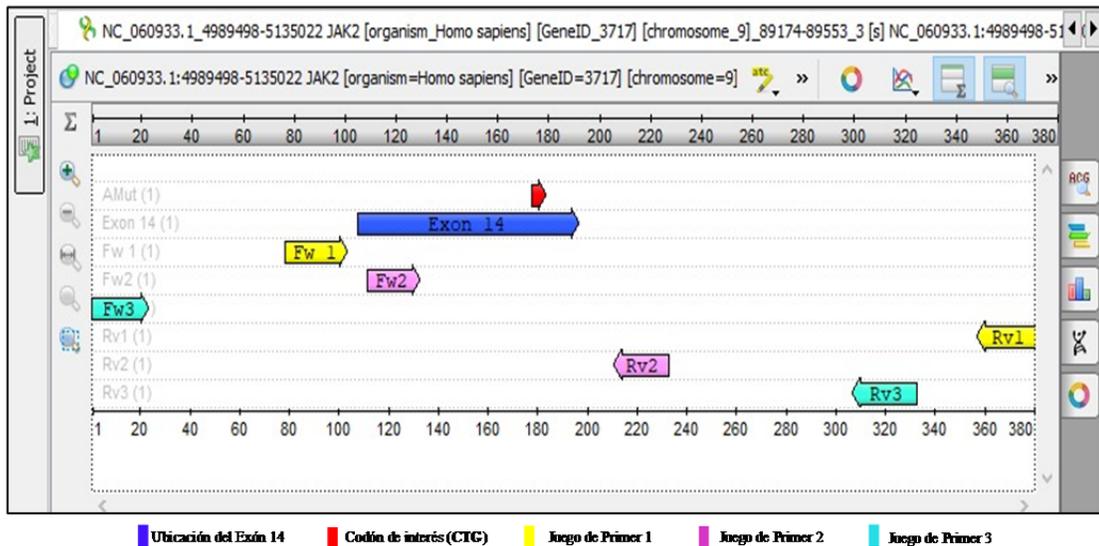


Figura 12. Visualización de la zona de alineamiento obtenida para los tres juegos de Primers diseñados, mediante una PCR *in silico* en el software Ugene.

Lo expresado en la figura 12, permitió visualizar en conjunto las diferentes ubicaciones de alineamiento de los tres juegos de primers diseñados, y la distancia de ellos con la zona de interés. Se evaluaron las características de cada primer por separado y se visualizó la distancia entre la zona de alineamiento, por ende, se concluyó lo siguiente:

- El juego 1 de primers, presentó un Tm bajo (Figura 9), esto indicó la posibilidad media en la formación heterodímeros, y presentó muy baja concentración de GC, también se visualizó que el inicio de alineación del primer forward (Fw1) ocurrió a 76 pb antes de la posición donde se genera el polimorfismo del nucleótido (G>T), siendo una distancia bastante cercana lo que podría interferir en el resultado de la secuenciación de los fragmentos amplificados al encontrarse en la zona de inicio.
- Al evaluar el juego 2, se observó el mismo inconveniente en la ubicación de alineamiento, observado en el juego 1 de primers, donde en este caso, el primer

Forward (Fw2) y Reverse (Rv2) alinearon en una zona más cercana al punto donde se genera el polimorfismo, lo cual hubiese acarreado los mismos errores presentados en el juego 1 de primers, además, como características individuales presentaron alta capacidad de formar estructuras secundarias por la interacción entre ellos, por ende, se descartó automáticamente como opción.

- El juego de primer 3, se consideró el más óptimo para realizar *in vitro* la amplificación exitosa del gen JAK2, debido a que presentó una zona de alineamiento en el gen a una distancia considerable de 106 pb de la zona de interés, y características propias (Figura 11), esto indicó que al trabajar bajo esas condiciones establecidas, el uso de estos primers no generarían complicaciones en los resultados de la amplificación y secuenciación.

Posterior a la selección del juego de primers a utilizar, se solicitó a un proveedor fabricante de oligonucleótidos, los primers en forma liofilizada, para ser utilizados en la detección de la mutación JAK2V617F en el ADN de los pacientes estudiados.

- **Aplicación de las Técnicas de Biología Molecular.**

Se estudiaron 45 pacientes con sospecha o diagnóstico anatomopatológico de neoplasias Mieloproliferativas (NMP) sin expresión leucémica en cualquiera de sus formas (PV: Policitemia Vera, TE: Trombocitemia Esencial, MFP: Mielofibrosis Primaria) que acudieron a consulta hematológica por presentar un diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa, los mismos, fueron categorizados de acuerdo a la NMP, se obtuvieron los siguientes resultados: 26 (57.8%) de los pacientes presentaban PV, 9 (20%) de los pacientes presentaban TE y 10 (22.2%) de los pacientes padecían de MFP.

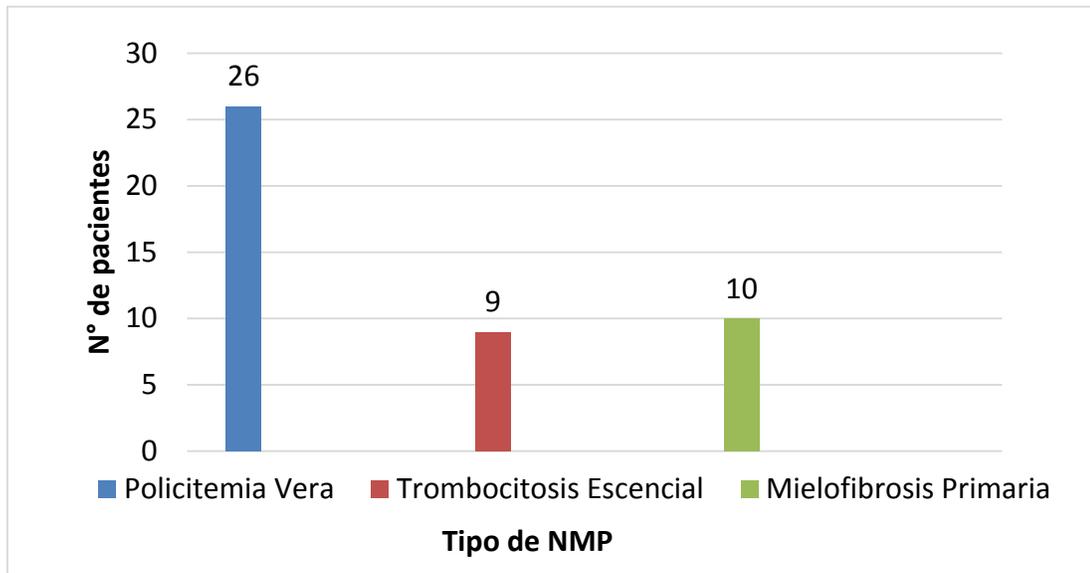


Figura 13. Categorización de los pacientes de acuerdo al diagnóstico clínico.

A cada paciente, se le tomó una muestra de Sangre total, por flebotomía y en casos especiales se obtuvo la muestra por aspirado medular, procedimiento que fue llevado a cabo por el médico hematólogo. Las muestras sanguíneas, fueron trasladadas al Laboratorio de Genética Molecular GENMOLAB, donde se inició la preparación de la mismas para la Extracción de ADN, procedimiento que fue llevado a cabo bajo el método salino propuesto por de Lahiri y Numberger ⁽²²⁾ y, posteriormente se cuantificó cualitativamente el material genético extraído (ADN) a través, de una electroforesis horizontal en gel de agarosa a 1.5x revelado con SyberSafe, se visualizó una extracción exitosa y la calidad de la muestra de ADN fue la adecuada.

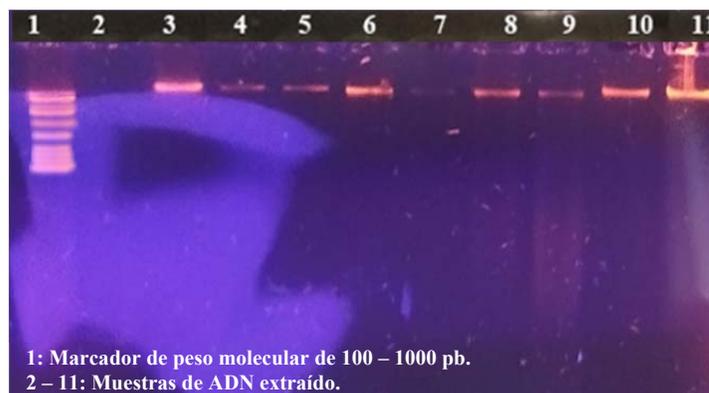


Figura 14. Corrida electroforética, de las muestras extraídas.

En el momento en que se visualizó la cantidad de ADN extraído, se determinó, la cantidad de muestra de ADN que se utilizaría posteriormente en el proceso de PCR, en el cual se utilizaron volúmenes que oscilaron entre los 2 a 4 μL . La cantidad de muestra utilizada estuvo condicionada por la intensidad y grosor de la banda observada tras la electroforesis. Las muestras en las que la banda de ADN extraído presentaban una gran intensidad y grosor, fueron diluidas en una proporción 1:2 con H_2O ultra pura, se obtuvo de esta forma, un ADN más diluido, ya que las altas concentraciones de ADN, hubiesen inhibido la PCR, por exceso de componentes.

La reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR), fue llevada a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700, bajo las condiciones establecidas en el diseño de los oligonucleótidos sintetizados, se empleó una MasterMix de PCR GoTaq G2 de la casa comercial PROMEGA, se aplicaron 40 ciclos de variaciones de temperaturas, cada ciclo consistió en: 15 segundos de desnaturalización a 95°C , 15 segundos de Temperatura de Alineamiento a 62°C , 15 segundos de Temperatura de extensión a 72°C , y un periodo de extensión final de 3 minutos a 72°C , quedando

asegurado de que todos los productos de amplificación hayan sido completamente terminados y tuviesen exactamente la misma longitud. Como paso previo al inicio del ciclado se realizó un calentamiento a 95°C por 3 minutos para la activación de la DNA polimerasa. Cada muestra, fue amplificada por separado 3 veces (por triplicado), con esto se aseguró la veracidad de los resultados obtenidos en cada replica de las muestras.

Los resultados de la PCR, fueron llevados a una electroforesis en gel, en la cual se revelaron los fragmentos amplificados y se evidenció la eficacia del primer al haber amplificado la región de interés con un producto de 332 pb. Como control de calidad de la PCR, se incluyeron además de las muestras de interés, un control negativo, un blanco de reacción que consistió en agua destilada y un control positivo, con esto se evaluó la capacidad de los primers en amplificar la región de interés.



Figura 15. Corrida electroforética, del fragmento JAK2 amplificado.

Posteriormente, se procedió a la purificación de los fragmentos amplificados a través del método de purificación de ADN por perlas magnéticas, en el cual se utilizó el estuche comercial MagneSil-Green de la casa comercial PROMEGA ⁽²⁵⁾.

A los productos amplificados y purificados, se les aplicó la técnica de Secuenciación Sanger, basada en una electroforesis capilar, en la que se obtuvo la secuencia específica de nucleótidos que conforman el fragmento amplificado. Para ello, las muestras fueron tratadas previamente con un reactivo de marcaje (**BigDye – Terminator v3.1** de la casa comercial APPLIED BIOSYSTEMS), se aplicó la misma técnica de PCR, pero se sustituyó el reactivo GoTaq G2, por el reactivo BigDye Terminator, el cual estuvo constituido por didesoxinucleotidos (ddNTPs) marcados con un fluoroforo cuya fluorescencia fue detectada por el secuenciador. Posteriormente, se purificó el producto del marcaje, con esto se eliminaron los residuos producidos en la reacción. (Protocolo explicado en la Figura 5A y 5B).

Una vez obtenidos los productos marcados purificados, se inició la secuenciación, que se llevó a cabo en un Secuenciador ABI modelo 310, cuyos resultados (Electroferogramas) fueron analizados en el programa Gene Analyzer V.3.0, con el que se evidenció la secuencia nucleotídica de cada muestra y se determinó si presentaba la mutación (G>T) en el codón de interés.

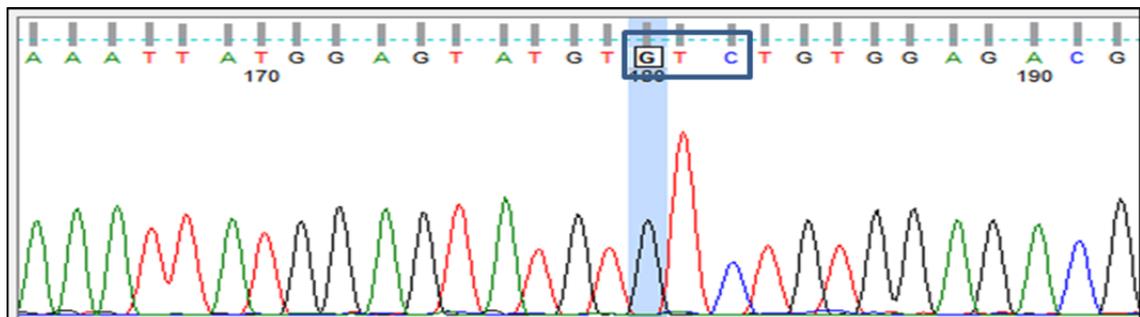


Figura 16. Electroferograma del Control Negativo.

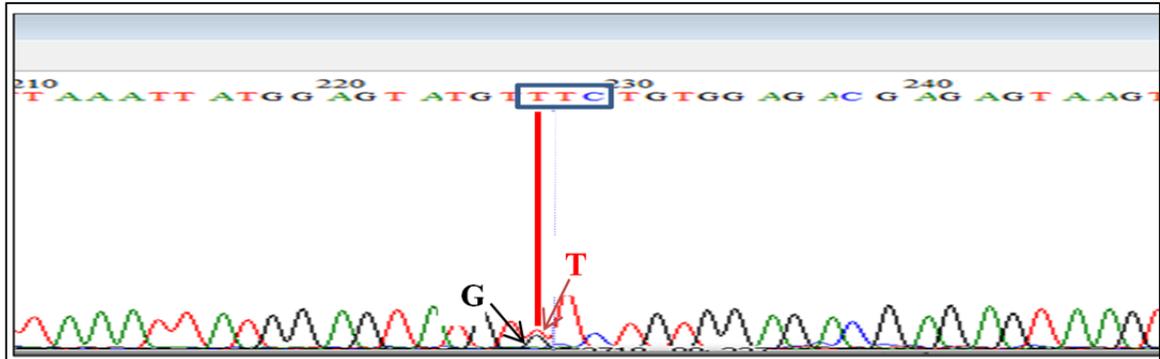


Figura 17. Electroferograma del Control Positivo.

En la figura 16 se visualizan los resultados de la secuencia parcial del exón 14 del gen JAK2 del control negativo, en esta se evidenció la presencia de una Guanina (G) en la posición 1.849 del exón 14 del gen JAK2 lo que indicó un resultado negativo (homocigoto normal), mientras que en la figura 17 se evidenció la presencia de una Guanina (G) y una timina (T) una en la posición 1.849 del exón 14 del gen JAK2, resultado que se traduce como Positivo (Heterocigoto Mutado), por ende, se modificó el codón de interés pasando de ser “GTC” a “TTC”, esto generó una Fenilalanina en vez de una Valina en la posición 617 de la proteína JAK2.

De este modo, se analizaron todos los electroferogramas de los diferentes pacientes y se obtuvieron 27 resultados positivos de pacientes para la mutación JAK2V617F. Es importante resaltar, que no se encontraron incongruencias en los resultados obtenidos, ya que se mantuvo la misma tendencia del resultado de cada muestra en las tres repeticiones realizadas.

Tabla 4. Distribución de frecuencia de los resultados obtenidos en la detección de la mutación JAK2V617F según el tipo de NMP.

	Resultados			
	Positivos		Negativos	
	n	%	n	%
Policitemia Vera (PV)	22	84.6	4	15.4
Tombocitosis Esencial (TE)	3	33.3	6	66.7
Mielofibrosis Primaria (MFP)	2	20.0	8	80.0
Total:	27	60.0	18	40.0
X²: 15.89 p < 0.001				

X²: Resultado de la prueba de Chi²; p: Razón de verosimilitud

En la tabla 4, se puede observar la distribución en la frecuencia de la mutación JAK2V617F, con respecto al tipo de neoplasia mieloproliferativa diagnosticada, se apreció una considerable prevalencia de la mutación en los pacientes estudiados (60%; n= 27/45), con una mayor frecuencia en los pacientes con PV con un 84% (n = 22/26), seguido de TE y MFP con 33.3% (n = 3/9) y un 20% (n = 2/10) respectivamente. Por otro lado, se evaluó la relación existente entre la mutación JAK2V617F con el resto de las variables, esto evidenció una correlación significativa con las diferentes entidades patológicas del grupo de Neoplasias Mieloproliferativas sin expresión leucémica ($p < 0.001$). Por lo tanto, la mutación JAK2V617F se asoció significativamente con las manifestaciones patológicas estudiadas, principalmente en pacientes con Policitemia Vera.

DISCUSIÓN

La identificación de la mutación JAK2V617F, juega un papel central en el diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas, específicamente TE, PV y MFP. En 2008, la OMS mencionó la positividad de la mutación somática recurrente en el exón 14 del gen JAK2, como un criterio principal para el diagnóstico de estas patologías, criterios que se mantienen vigentes actualmente y que fueron revisados por la OMS en el año 2016⁽³⁰⁻³²⁾.

Por tal motivo, a través del uso de softwares bioinformáticos y técnicas moleculares se diseñaron primers específicos del gen JAK2 en el exón 14, para la detección de la mutación JAK2V617F en los pacientes venezolanos diagnosticados con alguna NMP y con el gen BCR-ABL negativo.

El éxito de los resultados finales en la detección de la mutación radicó en la correcta amplificación del fragmento de interés en la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que dependió en gran medida de la especificidad y eficiencia de los primers utilizados, para ello, en este trabajo de investigación fueron diseñados tres diferentes juegos de primers mediante la utilización de programa bioinformático Primer3Plus, de los cuales se seleccionó al tercer juego de Primers ya que cumplió en su mayor parte con los criterios establecidos por Abd-Elsalam, para el correcto diseño y uso de los mismos, exceptuando la concentración GC en el primer Rv, cuya concentración levemente disminuida afectaría solamente la fuerza del apareamiento pero no su capacidad de amplificar⁽²⁰⁾.

Entre las características propias que cada primer presentó, se mencionan, un tamaño de 21 y 24 pb, para el primer forward (Fw) y reverse (Rv) respectivamente, con temperatura de alineamiento (Tm) de 60 °C para el Fw y 64 °C para el Rv, teniendo una diferencia de Tm de 4 °C, el %GC del primer Fw y Rv fue de 50 y 34,8% respectivamente, éstos presentaron una baja capacidad en la formación de

dímeros y una energía libre de Gibbs (ΔG) de -2 para el Fw y -3 Rv, quedando minimizada la formación de estructuras secundarias que pudiesen haber interferido con la PCR. En el momento en que evaluó su funcionalidad mediante la aplicación una PCR *in silico*, quedó demostrado que el fragmento amplificado obtenido cuando se utilizaron estos primer fue de 332 pb, cuya zona de interés se ubicó a una distancia entre el inicio del primer Fw y el Rv de 100 pb aproximadamente.

Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Guevara y col (2023), quienes diseñaron un grupo de primers con el programa Primer3Plus, los cuales presentaron una longitud que osciló entre 20 y 19 pares de base, para el primer forward (Fw) y reverse (Rv) respectivamente, con temperatura de alineamiento (T_m) de 59,9 °C para el Fw y 62,1 °C para el Rv, teniendo una diferencia de T_m de 2,2 °C, el %GC del primer Fw y Rv fue de 40 y 52,6% respectivamente, éstos presentaron una baja capacidad en la formación de dímeros y una energía libre de Gibbs (ΔG) de -3.53 para el Fw y -5.47 Rv, esto dejó minimizada la formación de estructuras secundarias que pudiesen haber interferido con la PCR. Cuando evaluaron su funcionalidad mediante la aplicación una PCR *in silico*, quedó demostrado que el fragmento amplificado obtenido cuando se utilizaron estos primer fue de 147 pb⁽²⁹⁾.

Esto pone en manifiesto que la especificidad y eficiencia de los primers diseñados cumplió con los criterios establecidos por Abd-Elsalam, para el correcto uso y diseño de los primers⁽²⁰⁾. Se logró que el diseño fuera altamente específico, sensible y efectivo para la aplicación de la PCR *in vitro*, se obtuvieron resultados satisfactorios comparados a los obtenidos *in silico*.

En esta investigación, se estudió una población de pacientes diagnosticados con Neoplasias Mieloproliferativas, éstos se categorizaron según el tipo de NMP que presentaban, en cuyos resultados se observó que de un total de 45 pacientes con diagnóstico de NMP, el 57.8% (n= 26) de los pacientes fueron diagnosticados con PV, 22.2% (n= 10) con MFP y el 20% (n= 9) restante de los pacientes con TE. Se

comparó la distribución en la categorización de los pacientes según su manifestación patológica, con la población de estudio de otros investigadores, en contraste con la investigación realizada por Aguilar y col en el año 2020, quienes incluyeron a 264 pacientes, de los cuales un 25.4% (n= 67) presentó PV, un 42,8% (n= 113) presentó TE y el restante 31,8% (n= 84) con MFP. Esto evidencia que el tipo de NMP expresada puede ser variable entre poblaciones, pudiendo verse influenciada por los factores propios de cada población, lo cual explicaría la diferencia entre los porcentajes de los pacientes en cada patología de ambos estudios ⁽⁸⁾.

Ahora bien, en un estudio realizado por Giraldo y col para el año 2023, se evaluó el perfil mutacional para Neoplasias Mieloproliferativas en una población conformada por 52 pacientes con PV, TE y MFP, obtuvieron como resultado que la mutación JAK2V617F la portaban el 51.9% de los pacientes, la mutación CALR el 23.0% y la mutación MPL el 3.8% y teniendo un 23.0% de triple negativos para las mutaciones analizadas ⁽⁷⁾. Esto último coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual de una población de 45 pacientes diagnosticados con PV, TE y MFP, la mutación JAK2V617F, fue detectada en el 60% de los casos estudiados, evidenciado que la mutación en JAK2V617F se encuentra expresada en más del 50% de la población afectada, tal como lo expresa la OMS ⁽¹⁻³⁾.

Por otro lado, en contraste con los resultados obtenidos por Samia y col en Túnez (2021), encontraron que de un total de 974 pacientes solo se detectó la mutación JAK2V617F en el 35,8% (n= 349) de los casos, de los cuales informaron que la frecuencia de la mutación fue del 37% en PV, 44% en TE y 25% en MFP, en este contexto indicaron que hasta el 62% de los pacientes con PV dieron negativos para la mutación mencionada ⁽⁹⁾.

Esto pone en evidencia la discrepancia existente sus hallazgos y los datos obtenido en la presente investigación, en el cual se obtuvo una mayor frecuencia en los pacientes con PV con un 84% de los casos, seguido de TE y MFP con un 33.3% y

un 20% respectivamente, fenómeno que se puede explicar por los diferentes tamaños de cohortes, variación de los grupos étnicos, el polimorfismo de un solo nucleótido y los factores ambientales de cada región ⁽³³⁻³⁵⁾. Concluyeron que los pacientes tunecinos presentan la tasa de mutación JAK2V617F más baja reportada hasta la actualidad, en relación a lo reportado en la literatura internacional donde se informó que la detección de la mutación se encontró negativa en menos del 3% de los pacientes con PV ^(9,33-35).

Cruz Aleman y col (2016) realizaron un estudio basado en la detección cualitativa de la mutación JAK2V617F a través de la amplificación del alelo específico mediante la técnica de PCR y determinaron la presencia del fragmento mutado por medio de electroforesis en gel ⁽³⁶⁾, obtuvieron resultados satisfactorios que coincidieron con los obtenidos en el presente estudio, donde se detectó la mutación JAK2V617F mediante PCR alelo específico y secuenciación, esto demostró que a pesar de la tendencia actual de realizar estudios moleculares cuantitativos mediante PCR en tiempo real (qPCR), se sigue considerando válido y eficiente el análisis cualitativo de mutaciones puntuales, especialmente para la identificación por primera vez en una población y/o en las etapas iniciales de las enfermedades.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado las conclusiones más relevantes fueron:

- Se identificó mediante la bibliografía la región en el cual se produce el polimorfismo de nucleótido único que ocasiona la mutación JAK2V617F, se obtuvo la secuencia de referencia del gen de interés JAK2/RefSeq: NG_009904.1.
- Se diseñó un juego de primers de alta especificidad de alineación con la zona de interés, mediante el programa bioinformático Primer3Plus, se modificaron las características requeridas a criterio del investigador.
- Se seleccionó el mejor juego de primers diseñados, gracias a la validación a través de la PCR *in silico* mediante el programa Ugene, se verificaron los factores que puedan generar interferencia en la aplicación *in vitro*.
- La PCR con los primers diseñados y seleccionados para la detección de la mutación JAK2V617F se consideró una técnica de alta especificidad y reproducibilidad, debido que al aplicar el procedimiento estandarizado por triplicado no se detectaron vulnerabilidades, y por ende, se mantuvo el mismo resultado en cada repetición.
- Se detectó la mutación JAK2V617F en un 60% de los casos estudiados, se obtuvo una mayor frecuencia en PV con un 84% de positividad.
- El uso de técnicas moleculares cuantitativas como la PCR punto final y la secuenciación, permitieron identificar de forma certera la presencia o ausencia de mutaciones puntuales, considerándose una técnica confiable.

RECOMENDACIONES

Se recomienda abiertamente a la facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, en promover las investigaciones científicas dentro del análisis molecular y el diagnóstico hematológico desempeñados en la escuela de Bioanálisis

A los estudiantes de Bioanálisis y de otras especialidades en el área de la salud y las ciencias biomédicas, en realizar estudios complementarios sobre la frecuencia de esta mutación y/u otras dentro del perfil mutacional de las neoplasias mieloproliferativas, con el fin de colaborar a la correcta clasificación en el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas en el país.

Por último, se incentiva a los profesionales y estudiantes de ciencias de la salud a que continúen realizando trabajos de investigación que reflejen la epidemiología de las neoplasias mieloproliferativas y/u otras enfermedades en Venezuela, debido a que muchos de estos datos en la actualidad se desconocen. Por tanto, cualquier actualización epidemiológica será un gran aporte.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khoury, J.D., Solaty, E., Abla, O. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Hematolymphoid Tumors: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Lukemia* 36, 1703-1719 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
2. Fernández Martínez Lesbia, Garrote Santana Heidys, Díaz Alonso Carmen Alina. Biomarcadores en las neoplasias mieloproliferativas clásicas BCRABL1 negativas. *Rev. Cubana Hematología Inmunología Hemoterapia* [Internet]. 2019 Diciembre. [citado 2024 Marzo 10]; 35 (4): e1029. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-02892019000400003 Epub 20-Feb-2020.
3. Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, et al. The mutation profile of JAK2, MPL and CALR in Mexican patients 66 with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2015;8:16-21
4. Jimenez S. Myeloproliferative Neoplasms. From clinic to molecular biology. *Acta Medica Colombiana*.2017;42(1):15-17
5. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2022. Accessed 28 Feb 2024. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>

6. Cueva P, Tarupi W, Caballero H. Incidencia y mortalidad por cáncer en Quito: Información para controlar las políticas de control del cáncer. *Colom Med (Cali)*, 2022; 53 (1): e2024929 doi: <http://doi.org/10.25100/cm.v53i1.4929>
7. Giraldo R.A, Naranjo M. S, Gomez, L. N, Perfiles de Mutación JAK2, CALR y MPL en Pacientes Colombianos con Neoplasias Mieloproliferativas BCR-ABL Negativas. 2023 Jul-Sep; 54(3): e2035353. Published online 2023 Sep 30. doi: [10.25100/cm.v54i3.5353](https://doi.org/10.25100/cm.v54i3.5353)
8. Aguilar Vera R, Bendek G, Barzallo M, Schutz N, Brulc E, Perusini M, Kohan D, Valeo M, Nucifora E. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms clinical manifestation and outcome. Experience at Hospital Italiano de Buenos Aires. *SAIH, Hematologia* Vol 24 N^o 2:20-28, 2020
9. Samia Menif et al. JAK2 p.(V617F) mutation in Tunisian myeloproliferative neoplasms and its genotypephenotype correlation. *Pan African Medical Journal*. 2021; 39(194). DOI: 10.11604/pamj.2021.39.194.28307.
10. Arias FG. *El Proyecto de Investigación*. 5ta Edición. Caracas Venezuela; 2006.
11. Tamayo y Tamayo, M. *El proceso de la investigación científica; incluye glosario y manual de evaluación de proyectos*. 4^a edición. Guadalajara, México. 2007.
12. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2000 [Internet]. [citado 2024 Jun 21]. Disponible en: <https://pdf-it.dev.acw.website/please-and-thank-you?url=https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres->

[humanos/&pdfName=declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos](#)

13. Comisión de Bioética y Bioseguridad UC. Reglamento de la comisión permanente, las comisiones operativas y las subcomisiones operativas de bioética y bioseguridad de la Universidad de Carabobo. 2021. [Internet]. [citado 2024 Jun 21]. Disponible en: https://drive.google.com/file/d/18u_aoycJ6Vnss59rErvxHZ9eON19XCJh/view?usp=sharing
14. República Bolivariana de Venezuela, Ministerio del Poder Popular para Ciencias, Tecnologías e Industrias Intermedias. Código de ética para la vida. 2011. [Internet]. [citado 2024 Jun 21]. Disponible en: <https://www.redgia.org/sgc-redgia/public/assets/docs/codigo-de-etica-para-la-vida.pdf>
15. República Bolivariana de Venezuela, Asamblea Nacional Constituyente. Constitución de la República Bolivariana de Venezuela. 1999, Art 46. [Internet]. [citado 2024 Jun 21]. Disponible en: <https://www.asambleanacional.gob.ve/storage/documentos/botones/constitucion-nacional-20191205135853.PDF>
16. Academia nacional de medicina. Código de Deontología Médica Venezolano. 1985. [Internet]. [citado 2024 Septiembre 9]. Disponible en: <https://academianacionaldemedicina.org/publicaciones/libros/codigo-de-deontologia-medica-venezolano/>
17. Arroyo Castro L. El consentimiento informado en la investigación científica. Marco jurídico. Rev Jur Seg Soc. 2004; 13: 83-96.

18. Ramos. P, Arenas. A. Acceso a las fichas clínicas para investigación científica. Revista Chilena de derecho, 40(3), 1055-1071. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34372013000300017>
19. Lanza T. G, Di Muro. J, Ortega. F. Historia Clínica: Nueva metodología para el registro de los datos. GacMéd Caracas [Internet] 2002. [citado 2024 Sep 17]; 110 (3): 347-349. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?scrip=sci_arttext&pid=S0367-47622002000300009&Ing=es
20. Abd-Elsalam. K. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer desing. African Journal of Biotechnology. [Internet]. 2003 [citado 2024 Sep 17]; 2: 91-95. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/14794/58513>
21. Van Weezep E, Kooi EA, van Rijn PA. PCR diagnostics: In silico validation by an automated tool using freely available software programs. J Virol Methods. 2019 Apr; 270:106-112. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.05.002.
22. Lahiri, D. K, Numberger. Jr. J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFPL studies. Nucleicacids research. 1991. 19 (19), 5444.
23. Hernandez, A.K. Diagnóstico molecular de aneuploidías en los cromosomas; 13, 16, 18 y 21, mediante reacción de cadena de la polimerasa por fluorescencia cuantitativa (QF-PCR). Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 2018.
24. Promega. GoTaq G2 DNA Polymerase, TaqPolymerase, PCR Amplification. [Internet] U.S.A. 2018 [Consultado; 5 Sep 2024] Disponible en:

https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-g2-dna-polymerase-protocol.pdf?rev=898d6c55ba2b4af69deda726d7098996&sc_lang=en

25. Promega. MagneSil Sequencing Reaction Clean-Up System, Instructions for use of products. [Internet] U.S.A 2010. [Consultado; 5 Sep 2024]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-magnesil-sequencing-reaction-clean-up-system-protocol.pdf?rev=3e53bd01b7fb4bd7b6a003746db973bd&la=en>
26. Applied Biosystems. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Protocol. [Internet] U.S.A. 2010. [Consultado; 5 Sep 2024]. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf
27. Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Ostell J, Pruitt KD, Karsch-Mizrachi I. GenBank. Nucleic Acids Res. 2019; 47 (D1): D94-D99. <https://doi.org/10.1093/nar/gky989>
28. Pinilla Bermúdez G. Biología molecular. 1ª ed. Bogotá-Colombia: Editorial el manual moderno S. A. S.; 2019. DOI: 10.1234/abcd.5678
29. Guevara KJGG, Polit LFV, Valle DAC, Galarza CFG. Diseño in silico de primers para el gen GSTM1 en diagnóstico de Cáncer de Pulmón [Internet]. Vol. 8, Polo del Conocimiento. Polo de Capacitacion, Investigacion y Publicacion; 2023 [cited 2024 Oct 11]. p. 2589–604. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.23857/pc.v8i8.5991>
30. Sieza Y, Di Camilo I, Mazziotta L, Archuby ML, Riva ME, Orellano L. Distribución de mutaciones en JAK2, MPL y CALR en pacientes con sospecha

de neoplasias mieloproliferativas crónicas Phi negativas provenientes de hospitales públicos de la provincia de Buenos Aires. HEMATOLOGÍA. 2018; 22(2):151-6.

31. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, Tefferi A. The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances. *Blood Rev.* 2016; 30(6): 453-459. DOI: 10.1016/j.blre.2016.06.001
32. Boluda C, Larrán A. Manual de recomendaciones en neoplasias mieloproliferativas crónicas filadelfia negativas. 3era ed. España: GEMFIN: Grupo español de enfermedades mieloproliferativas crónicas filadelfia negativas; 2020. 45 p.
33. Soliman EA, El-Ghlban S, El-Aziz SA, Abdelaleem A, Shamaa S, Abdel-Ghaffar H. JAK2, CALR, and MPL Mutations in Egyptian Patients With Classic Philadelphia-negative Myeloproliferative Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020; 20 (10): e645-e651. doi:10.1016/j.clml.2020.05.011
34. Rossi D, Cortini F, Deambrogi C, et al. Usefulness of JAK2V617F mutation in distinguishing idiopathic erythrocytosis from polycythemia vera. *Leuk Res.* 2007;31 (1): 97-101. doi:10.1016/j.leukres.2006.02.027
35. O'Sullivan J, Mead AJ. Heterogeneity in myeloproliferative neoplasms: Causes and consequences. *Adv Biol Regul.* 2019; 71: 55-68. doi:10.1016/j.jbior.2018.11.007

36. Cruz Alemán, Santos Alberto; Larios Roque, Adriana Belén y Caldera Suazo, Uxmal Javier (2016). 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. Otra thesis, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.



ANEXO A

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS-SEDE CARABOBO



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Consentimiento Informado para participar en el proyecto de investigación sobre:
**“ONCOGÉN JAK2, BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024.”**

Introducción.

Nos dirigimos a usted para informarle acerca de un proyecto de investigación, desarrollado por estudiantes de pre-grado de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, Sede-Carabobo, en el que se le invita cordialmente a participar.

Su participación es voluntaria. Por favor, tómese el tiempo que necesite para leer la siguiente información, consultar y preguntar a los investigadores de este estudio, si hay algo que no le queda claro o si desea obtener mayor información al respecto.

Objetivo del estudio.

El objetivo del estudio es determinar la mutación V617F (oncogén JAK2) para el diagnóstico de Neoplasias Mieloproliferativas (**PV**: Policitemia Vera, **TE**: Trombocitemia Esencial, **MFP**: Mielofibrosis Primaria), a través de técnicas de biología molecular en Venezuela en el año 2024, y así poder distinguir la relación existente entre la mutación antes mencionada y el estado clínico de los pacientes, con el fin de que la investigación pueda contribuir en el avance médico de la enfermedad en Venezuela, para el beneficio de otros pacientes, en el futuro.

Este estudio de investigación ha sido aprobado por el Comité de Ética de **GENMOLAB, C.A**, Laboratorio de Genética Molecular, ubicado en el Km 21 de la carretera Panamericana, Centro Comercial La Cascada, Centro Profesional, Piso 3, Oficina 20, Carrizal, Edo-Miranda, lugar donde se llevará a cabo el desarrollo de la investigación gracias a la colaboración de su departamento de Diagnóstico Molecular, que cuenta con amplio grupo de profesionales expertos en el área de

estudio, y por parte del Comité de Bioética de la **Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo** Sede- Carabobo. Siendo ambas instituciones, las encargadas de respaldar y validar la presente investigación, asegurando que el desarrollo del estudio se lleve a cabo bajo el reglamento del Código de Ética para la Vida, rigiéndose por las leyes Nacionales y por los principios establecidos en las declaraciones Universales para las investigaciones genéticas en humanos.

Es importante enfatizar, que en el presente proyecto **sólo se utilizarán muestras sobrantes** de la práctica asistencial. Por tanto, el empleo de estas muestras no supondrá para usted, ninguna molestia o riesgo.

Procedimientos del estudio y posibles riesgos y molestias.

La participación como voluntario en este estudio no produciría ninguna molestia y no implica riesgo alguno para la salud. El desarrollo del estudio se realizará mediante análisis molecular asociado a un oncogén específico (JAK2V617F), en muestras sanguíneas obtenidas por el método de Venopunción, de una población susceptible; grupo de pacientes diagnosticados o con sospechas de una neoplasia mieloproliferativa.

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, es por ello que la Asociación Médica Mundial ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos que sirvan para orientar a los profesionales del área de la salud que realizan investigación médica en seres humanos, debido a que en esta línea de investigaciones se incluye la manipulación del material humano o de información identificables, por lo tanto, en el **art. 9** del tratado antes mencionado se expresa: “Los investigadores deben conocer los requisitos éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que los requisitos internacionales vigentes”, con la finalidad de proteger la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del paciente partícipe de la investigación.

En tal sentido, se expone a continuación artículos contemplados en la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, **Artículo 46, Ordinal 3** “Ninguna persona será sometida **sin su libre consentimiento** a experimentos científicos, o a exámenes médicos o de laboratorio, excepto cuando se encuentre en peligro su vida o por otras circunstancias que determine la ley” y **Artículo 15** del código de Deontología Médica Venezolano, que expone: “El médico no expondrá a su paciente a riesgos injustificados. **Pedirá su consentimiento** para aplicar los procedimientos diagnósticos y terapéuticos que considere indispensables y que puedan afectarlo física o psíquicamente”

Al firmar este documento, usted acepta que se utilicen **Los Sobrantes de las Muestras**, posterior al análisis del estudio solicitado por el médico tratante, para los fines de este estudio de investigación.

Es nuestro deber hacerle saber que sus muestras como sus datos se mantendrán bajo las condiciones de seguridad adecuadas y se garantiza que los sujetos no podrán ser identificados por personas distintas a las autorizadas. Las muestras sobrantes se almacenarán en las instalaciones del Laboratorio de Genética Molecular GENMOLAB.

Es importante resaltar que el paciente no percibirá beneficio económico por la donación de las muestras y la cesión de los datos proporcionados, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación desarrollada. En caso de que se planteara el uso o cesión de sus muestras en una investigación diferente, los investigadores a cargo del estudio, se pondrán en contacto con usted con el fin de solicitar nuevamente su consentimiento.

Participación y retirada voluntaria.

Usted puede decidir libremente si desea o no formar parte en este estudio; La participación es totalmente voluntaria. Si decide participar, sigue teniendo la posibilidad de retirarse en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin penalización alguna, ni consecuencias negativas para Ud. Si cambiara de opinión en relación con sus muestras o sus datos, tiene derecho a solicitar su destrucción o anonimización. No obstante, debe saber que los datos que se hayan obtenido en los análisis realizados hasta ese momento, podrán ser utilizados para los fines solicitados y podrán conservarse en cumplimiento de las obligaciones legales correspondientes.

Protección de datos y confidencialidad.

Toda la información sobre sus resultados se tratará de manera estrictamente confidencial. El equipo investigador se compromete a cumplir con la normativa de protección de datos. Los datos recogidos para el estudio serán identificados a través de una secuencia numérica (código), de forma que no se incluya información personal que pueda identificarle y sólo el equipo investigador podrá relacionar dichos datos con usted. Si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los participantes en esta investigación.

Información sobre resultados.

En el caso de que usted lo solicite, al final del estudio, se facilitará información sobre los resultados del proyecto de investigación en el que se utilizó sus muestras. En el caso de que en este estudio se obtuvieran datos que pudieran ser relevantes para usted o su familia, puede solicitar que le sean comunicados, si así lo indica en la casilla que aparece a continuación.

1. Deseo que el investigador me comunique la información genética que pueda ser relevante para mi salud o la de mis familiares.

SI NO

2. En caso de almacenamiento de muestras, consiento al almacenamiento y uso de las muestras biológicas, para futura investigaciones en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI NO

3. Consiento en que en el futuro se acceda de nuevo a mi historia clínica para recoger datos que se consideren importantes para realizar otras investigaciones relacionadas con la especialidad médica o el área de investigación del presente estudio.

SI NO

ANEXO A



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS-SEDE CARABOBO
LABORATORIO DE GENETICA MOLECULAR GENMOLAB.**

Ciudad: _____ . Día: _____ . Mes: _____ . Año: _____ .

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio:

“ONCOGÉN JAK2, BIOMARCARADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024.”

Yo: _____, titular del número de cédula V- _____.

Consiento que:

1. He hablado con los Investigadores a cargo del estudio.
2. He leído la hoja de información que se me ha entregado.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. He podido hacer preguntas sobre el estudio.

Comprendiendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que tenga ninguna repercusión negativa.

Por lo tanto, **ACEPTO** voluntariamente participar en el proyecto y autorizo el uso de las muestras sobrantes de la práctica asistencial y toda la información obtenida, para llevar a cabo el desarrollo del proyecto de investigación explicado con anterioridad.

Entiendo que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Firma del participante

Firma de (1) investigador

Firma del Testigo

Firma de Testigo

Contacto Investigadores: Freddy Marquines, Lania Paredes, Lourdes Gómez.
TLF: 0424-272-57-52 / 0414-415-88-23 / 0414-425-19-48 / 0424-497-61-79.
E-Mail: mutacion.v617f@gmail.com

ANEXO B



HISTORIA MÉDICA.

N° _____

“ONCOGÉN JAK2, BIOMARCARADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP). VENEZUELA. 2024.”

1. DATOS DEL PACIENTE

NOMBRES: _____

APELLIDOS: _____

C.I: _____

EDAD: _____

FECHA DE NACIMIENTO: / /

CIUDAD DONDE RESIDE: _____

SEXO: M ___ F ___

TLF (Hab): _____

TLF (Cel): _____

E-MAIL: _____

2. ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

- CITOMEGALOVIRUS.
- TUBERCULOSIS.
- HEPATITIS. TIPO ()
- Virus *Varicela zoster* (Herpes zoster)
- HIV.
- OTROS: _____

3. DATOS DE MUESTRA

FECHA DE RECEPCIÓN: / /

TIPO DE MUESTRA: _____

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE

MUESTRA: _____

MÉDICO TRATANTE: _____

4. ONCOGÉN A ANALIZAR

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

- JAK2

5. CONSIDERACIONES PARA DIAGNÓSTICO DE MUTACIÓN JAK2

- **Ha sido el paciente diagnosticado con alguna NMP:** SI ___ NO ___
Tipo de NMP (En caso afirmativo): _____
Edad en que fue diagnosticado: _____
- **¿Tiene usted realizado el estudio molecular BCR/ABL?** SI ___ NO ___
Indique Resultado: POSITIVO: ___ NEGATIVO: ___
- **¿Hay o conoce algún caso de mutaciones en el gen JAK2 en su familia?:**
SI ___ NO ___
Indique parentesco: _____
- **¿En su familia hay historia médica de cáncer?** SI ___ NO ___
Tipo de cáncer (En caso afirmativo): _____
Edad en que fue diagnosticado (familiar): _____

6. HEMOGRAMA

WBC ___ cel/mm³ **RBC** ___ cel/mm³ × 10⁶

HB ___ gr/dL **HTO** ___ %

PLQ ___ cel/mm³ × 10³

FORMULA DIFERENCIAL

Seg. Neutrófilos ___ % **Seg. Eosinófilos** ___ %

Linfocitos ___ % **Monocitos** ___ %

7. CONSIDERACIONES GENERALES

- **¿Ha presentado alguna complicación, asociada a la enfermedad base?:**
SI ___ NO ___
- **Indique cuales:** _____
- **¿Recibe algún tratamiento para la Neoplasia mieloproliferativa?**
SI ___ NO ___
- **Indique cuales:** _____