



UNIVERSIDADE
DA CORUÑA



Búsqueda de alternativas experimentales para reducir costes en pruebas de diagnóstico molecular en cáncer.

Busca de alternativas experimentais para reducir os custos en exames de diagnóstico molecular do cancro.

Experimental search for alternatives to reduce costs in molecular diagnostic tests in cancer.

Ana Belén Álvarez López

A Coruña, Febrero 2016



UNIVERSIDADE
DA CORUÑA



FACULTADE DE CIENCIAS DE A CORUÑA

UNIDAD DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS

Búsqueda de alternativas experimentales para reducir costes en pruebas de diagnóstico molecular en cáncer.

Busca de alternativas experimentais para reducir os custos en exames de diagnóstico molecular do cancro.

Experimental search for alternatives to reduce costs in molecular diagnostic tests in cancer.

Dr. Luís Lombardía Ferreira y Dr. Manuel Becerra en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

Manuel Becerra Fernández

Tutor académico

Luís Lombardía Ferreira

Tutor empresa

Ana Belén Álvarez López

A Coruña, Febrero 2016

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC)	1
1.1.1. Clasificación de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC)	1
1.1.2. Etiología de las NMPC.....	2
1.2. <i>JAK2</i> en las NMPCs	3
1.2.1. Antecedentes de las proteínas quinasas y <i>JAK2</i>	3
1.2.2. Vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en la oncogénesis.	4
1.2.3. Mutaciones en <i>JAK2</i>	6
1.3. Reacción en cadena polimerasa (PCR).....	8
1.3.1. Fundamentos de la PCR.	9
1.3.2. PCR en tiempo real	10
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Muestras	17
3.2. Ensayos realizados	18
3.2.1. Pacientes para diagnóstico	19
3.2.2. Pacientes para seguimiento	19
3.3. Cuantificación de la concentración de ADN de las muestras seleccionadas.	20
3.4. Determinación de la carga alélica, PCR en tiempo real y cuantificación relativa. ...	20
3.4.1. Preparación de la mezcla de PCR	21
3.4.2. Controles utilizados.....	22
3.4.3. Configuración de la reacción de RT-PCR.....	22
3.4.4. Cuantificación relativa	23
3.5. Curvas de disociación o curvas de <i>melting</i>	25
3.6. Electroforesis en geles de agarosa	25
3.7. Cálculo de costes	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4. 1. Cálculo de costes	27
4.1.1. Costes de la prueba de determinación de la mutación V617F del gen <i>JAK2</i> por cuantificación absoluta utilizando sondas TAQman.....	27
4.1.2. Costes de la prueba de determinación de la mutación V617F del gen <i>JAK2</i> por cuantificación relativa utilizando <i>SYBR Green</i>	29

4.2. Curvas de disociación (Curvas <i>melting</i>)	30
4.2.1. Curvas de disociación para la determinación de la carga alélica en pacientes en el momento del diagnóstico.....	30
4.2.2. Curvas de disociación para la determinación de la carga alélica en pacientes para seguimiento.	33
4.3. Geles de agarosa	33
4.3.1. Gel de agarosa para la determinación de la carga alélica en pacientes en el momento del diagnóstico.	34
4.3.2. Geles de agarosa de un experimento para la determinación de la carga alélica en pacientes para seguimiento.....	34
4.4. Determinación de la carga alélica mediante PCR en tiempo real con <i>SYBR Green</i> . 35	
4.4.1. Determinación de la carga alélica en pacientes en el momento del diagnóstico.	36
4.4.2. Determinación carga alélica en pacientes para seguimiento.....	39
5. CONCLUSIONES.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC)

Los trastornos mieloproliferativos constituyen un grupo de enfermedades en las cuales la médula ósea produce demasiados glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas. Normalmente la médula ósea produce células madre y glóbulos sanguíneos inmaduros, que luego alcanzan su madurez. Existen tres tipos de glóbulos sanguíneos maduros:

- **Glóbulos rojos** encargados de llevar oxígeno y otras sustancias a los tejidos corporales.
- **Glóbulos blancos** a cargo de combatir infecciones y enfermedades.
- **Plaquetas** a cargo de prevenir sangrados mediante la formación de coágulos.

Los trastornos mieloproliferativos se originan en la médula ósea y podrán ocasionar que un número mayor de lo normal, de células madre, se tornen en uno o más tipos de glóbulos sanguíneos. Los trastornos tienden a empeorarse lentamente a medida que el excedente de células sanguíneas aumenta poco a poco. Existen diferentes tipos de trastornos mieloproliferativos crónicos que dependerá de si se están produciendo demasiados glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas [1-3].

1.1.1. Clasificación de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC)

- **Leucemia mieloide crónica (LMC)**
- **Neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas clásicas**
 - Policitemia vera (PV)
 - Trombocitemia esencial (TE)
 - Mielofibrosis primaria (MFP)
- **Neoplasias mieloproliferativas crónicas poco frecuentes**
 - Leucemia neutrofílica crónica (LNC)
 - Leucemia eosinofílica crónica (LEC)
 - Mastocitosis
 - Neoplasia mieloproliferativa no clasificable (NMPNC)

Las más relevantes en la práctica clínica son la leucemia mieloide crónica y las neoplasias mieloproliferativas crónicas cromosoma Filadelfia negativas clásicas [4-5].

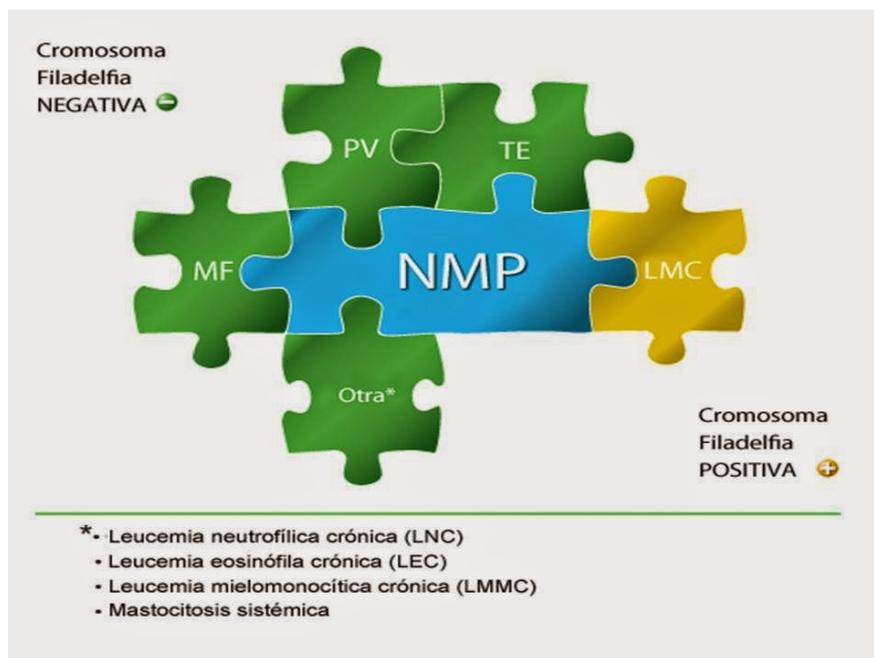


Figura 1. Clasificación de las NMPC en función de la existencia o ausencia del cromosoma Filadelfia (Ph) [6].

1.1.2. Etiología de las NMPC

La etiología de las NMPC es desconocida, aunque algunos casos se han relacionado con la exposición a radiaciones ionizantes y determinados disolventes orgánicos. Los primeros datos de un origen clonal de las NMPC se descubrieron con los estudios de las isoenzimas de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Posteriormente se descubrió que la LMC presenta una alteración citogenética específica, el cromosoma Filadelfia (Ph+), presente en el 95% de los casos. Más recientemente, el descubrimiento de la mutación *JAK2 V617F*, en un gen que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9, puso en evidencia una patogénesis común para las NMPC cromosoma Ph-. Esta mutación, que codifica para enzimas tirosina quinasa, responsables de la activación y crecimiento celular e independientes de los factores habituales del crecimiento celular, se encuentra en más del 90% de los pacientes con PV, y en un 60% de los casos de TE o de MFP (Figura 2). También se han descrito otras alteraciones genéticas más infrecuentes; como las del gen del receptor de la trombopoyetina (TPO) en megariocitos (*c-MPL*) y la del gen del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGFR*) [7-9].

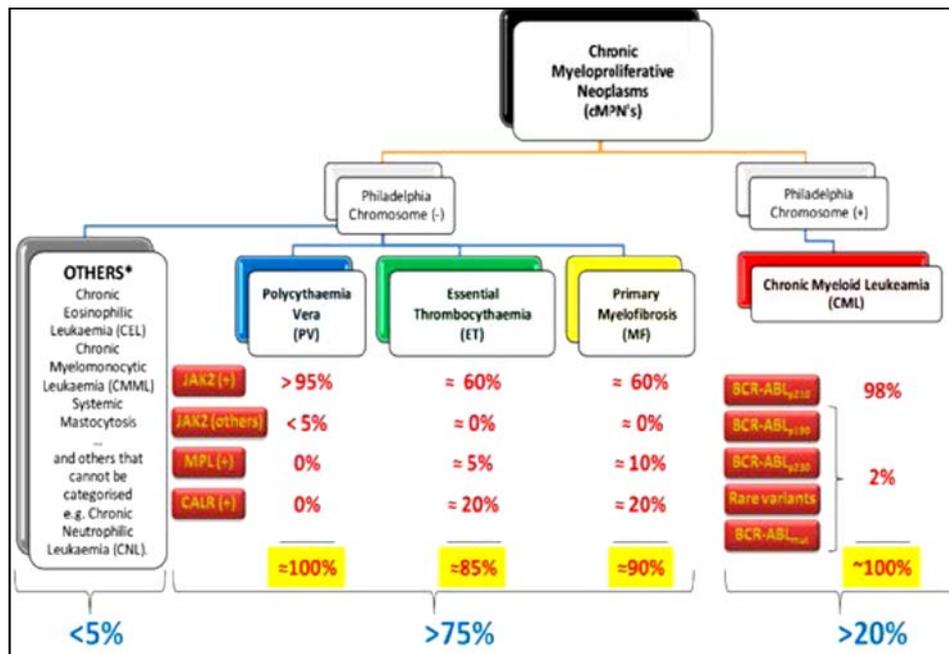


Figura 2. Marcadores moleculares de diagnóstico que permiten diagnosticar y clasificar más del 90% de los pacientes afectados por una NMPC.

1.2. JAK2 en las NMPCs

1.2.1. Antecedentes de las proteínas quinasas y JAK2

Las proteínas quinasas (PK) son enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas, mientras que las proteínas fosfatasas (PP) hacen lo contrario: regular la actividad de PK a través de la desfosforilación [10]. Por consiguiente, las proteínas tirosin-quinasas (PTK) catalizan la transferencia del grupo fosfato de la adenosina (ATP) a los grupos hidroxilo de los residuos específicos de tirosina en las proteínas de transducción de señales.

En general, existen dos categorías de PTK: receptor PTK (RPTK) y PTK citoplasmática (CPTK) [11, 12]. En los seres humanos, hay aproximadamente 90 genes conocidos que codifican PTKs, 58 codifican RPTKs y 32, CPTKs [13]. Ejemplos de RPTKs implicados en las NMPCs incluyen el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), KIT (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y el receptor del factor de crecimiento relacionada con la tirosina quinasa 3, FLT3 (*Fms-Like Tyrosine kinase 3*) [12, 13]. Ejemplos de CPTKs incluyen a la familia de las Janus quinasas con JAK1, JAK2, JAK3, la tirosina quinasa 2 (TYK2) [14, 15], la familia de quinasas SRC (homólogos de la oncoproteína del virus del sarcoma de Rous) [16] y ABL (homólogo de la oncoproteína del virus murino de leucemia Abelson) [17].

1.2.2. Vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en la oncogénesis.

Los factores de crecimiento que regulan la diferenciación, la proliferación y las actividades de numerosos tipos de células, en especial de las sanguíneas, se conocen como citocinas. La señal que algunas de estas citocinas generan al unirse a sus receptores extracelulares se transmite al interior de la célula, mediante la vía JAK-STAT. Los receptores de citocinas forman complejos con las proteínas de la familia de la cinasa Jano (JAK) [18].

La Janus quinasa 2 (JAK2) es una proteína tirosina quinasa (PTK) citoplasmática y su estructura está especialmente caracterizada por la presencia de dos dominios homólogos de quinasa: JH 1 que es funcional y JH2 que carece de la actividad quinasa (es decir, pseudoquinasa) [14, 17, 19, 20]. (Figura 3).



Figura 3. Representación de los distintos dominios funcionales del gen JAK2.

Por otro lado, las proteínas STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) son proteínas intracelulares, se encuentran en estado latente y se activan al ser fosforiladas por las proteínas JAK. Una vez activadas se trasladan al núcleo, donde se unen al ADN y activan la transcripción génica [21, 22]. La vía JAK-STAT (receptor-JAK-STAT-ADN) es la vía más importante de transmisión de señal desde los receptores de las citocinas [23].

La vía JAK-STAT funciona como se muestra en la Figura 4:

1. La unión del ligando induce a la dimerización del receptor de la citocina, en algunos casos, la trimerización o inclusive la tetramerización.
2. Las dos proteínas JAK asociadas al receptor de citocina son yuxtapuestas, con lo que se fosforilan una a otra y luego a sus receptores asociados.
3. Las STAT se unen al grupo fosforilo de la Tirosina del receptor activado por medio de su dominio SH2 y luego son fosforiladas en un residuo conservado de Tirosina por la proteína JAK asociada.
4. Luego de su disociación del receptor, las STAT fosforiladas forman homodímeros o heterodímeros por medio de la asociación de sus residuos de Tirosina fosforilados con el dominio SH2 en la subunidad opuesta.
5. Los dímeros de STAT finalmente se transfieren al núcleo, donde estos factores de transcripción, que ahora son funcionales, inducen a la expresión de sus genes diana.

La vía JAK-STAT es importante para una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación celular, así como en el funcionamiento normal

del tejido hematopoyético, inmunológico y cardíaco. Además ejerce control sobre la supervivencia celular y apoptosis, con efecto contrario según los sistemas. Por todo ello es de esperar que las alteraciones en procesos de regulación de la vía JAK-STAT pueda conducir a la oncogénesis y que su activación constitutiva se asocie a transformación maligna.

La vía JAK/STAT de señalización está regulada a múltiples niveles como, por ejemplo, desfosforilación directa de JAK2 por la proteína tirosina fosfatasa (PTP) (por ejemplo, SHP-1), la degradación proteolítica de JAK2 a través de la unión con una familia de supresores de la señalización de citocinas (por ejemplo, SOCS y LNK) y la inhibición de la unión de las proteínas STAT a ADN [24-27].

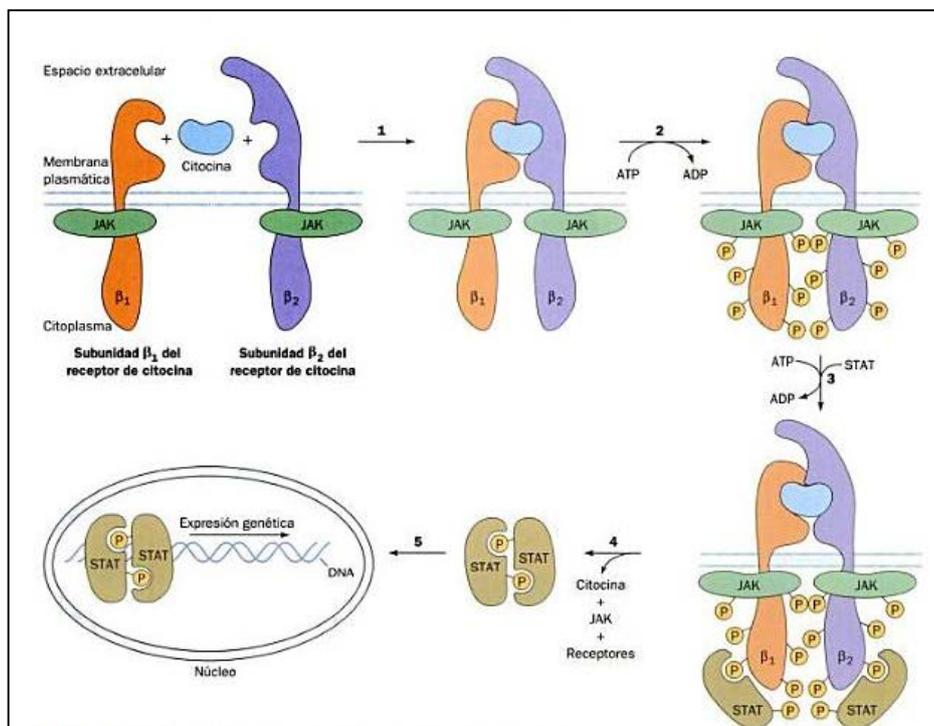


Figura 4. Vía de JAK-STAT para la transducción intracelular de las señales de citocinas. (Tomado de Carpenter LR, Yancopolus GD y Stahl N. Adv Prot Chem 1999; 52,109.)

Actualmente, se está investigando el papel de las vías inhibitorias en la regulación de la señalización JAK-STAT en los pacientes diagnosticados de NMPC [28]. Se ha demostrado en modelos animales que la pérdida de Lnk acelera y exagera oncogénicos de enfermedades mieloproliferativas (MPD) inducida por JAK2 [29]. De modo que, la pérdida de los programas celulares de control de la apoptosis e hiperproliferación junto con la adquisición de nuevas anomalías moleculares, probablemente estén contribuyendo a la expansión clonal y a la progresión a leucemia mieloide aguda (LMA) en NMPC (Figura 5) [30]. En este sentido, la acción de algunos fármacos antitumorales podría estar mediada, al menos parcialmente, por su efecto sobre la vía JAK-STAT.

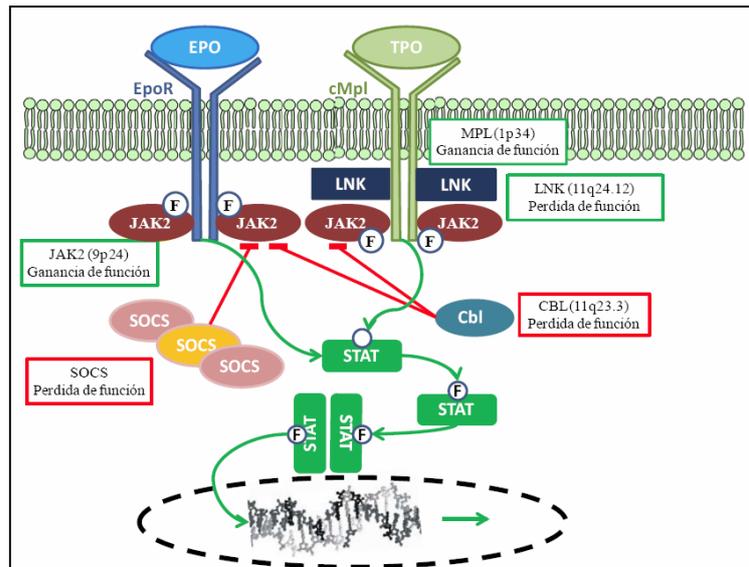


Figura 5. Influencia de las mutaciones en distintos genes sobre la regulación de la vía JAK2 (Modificado de Vannucchi *et al.*, 2009). F, grupo fosfato; LNK, *CG17367 gene product from transcript CG17367-RC*; JAK2, *Janus kinase 2*; STAT, *signal-transducer and activator of transcription protein*; SOCS, *Suppressor of cytokine signaling*; Cbl, *Casitas B-lineage lymphoma*; EPO, eritropoyetina; EpoR, receptor de eritropoyetina; cMpl, *myeloproliferative leukemia virus oncogene*; TPO, trombopoyetina.

1.2.3. Mutaciones en JAK2

El gen *JAK2* está situado en el cromosoma 9p24, e incluye 25 exones y su proteína 1.132 aminoácidos. La proteína JAK2 es una de las cuatro proteínas tirosina quinasa perteneciente a la familia Janus (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3* y *Tyk2*). Las proteínas *JAK1*, *JAK2* y *Tyk2* se expresan en todas las células de los mamíferos, mientras que la expresión de *JAK3* se limita a las células hematopoyéticas. Las mutaciones en *JAK3* en la línea germinal se han asociado con ciertos síndromes de inmunodeficiencia combinada severa de herencia autosómica recesiva [15, 31].

Es conocido que mutaciones en *JAK1*, *JAK2* y *JAK3* han sido asociadas a neoplasias tanto linfoides y mieloides [32]. Sin embargo hemos de destacar, por su especial relevancia en las NMPC, el descubrimiento de la mutación V617F en el 2004 y su posterior publicación en 2005 [7, 8, 33,34].

1.2.3.1. Mutación V617F

La mutación somática *JAK2V617F* es la sustitución de una guanina (G) por timina (T) en el exón 14 de *JAK2*, que conduce a un cambio de nucleótido en la posición 1849 y la sustitución de valina por fenilalanina en el aminoácido 617 [35].

Este aminoácido se localiza en el dominio pseudoquinasa JH2 de la proteína JAK2 que tiene actividad inhibidora sobre el dominio quinasa. Como consecuencia de la mutación *JAK2V617F*, se produce una activación constitutiva de la proteína JAK2 en ausencia de la unión del ligando al receptor hematopoyético, que provoca una ganancia de función, es decir, una activación permanente de esta vía de transducción de señales (Figura 5).

La mutación V617F en el gen *JAK2* fue incorporada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2008 como criterio diagnóstico en PV, TE y PMF y es con diferencia la mutación más frecuente en NMPC *BCR-ABL* negativo. La mutación *JAK2V617F* se detecta en el 95% de los pacientes con PV, 60% de pacientes con TE y 60% de pacientes con MFP) [8], pero no es específica de NMPC.

Las NMPC incluyen entidades clínicamente distintas, planteando la cuestión de cómo esta única mutación podría dar lugar a tal diversidad fenotípica. Los modelos en ratón iniciales y los estudios clínicos posteriores han demostrado que los niveles de *JAK2V617F* (carga alélica) pueden determinar el fenotipo clínico (PV, TE y MFP), como veremos posteriormente [28].

Además de la carga alélica, el impacto de *JAK2V617F* en el fenotipo de la enfermedad puede estar relacionado con la línea celular donde se detecte la mutación.

1.2.3.2. Mecanismos alternativos de la patogénesis de NMPC

A pesar de que la mutación V617F se puede identificar en casi todos los pacientes con PV, así como aproximadamente el 50-60% de pacientes con ET y MFP, aún existe un gran número de pacientes que carecen de esta anomalía genética. Incluso en estos pacientes, la activación de la señalización JAK-STAT puede ser demostrada, lo que sugiere que las alteraciones en otros componentes de esta vía puede ser responsable de conducir a la patogénesis de la NMPC *JAK2V617F* negativa.

Mutación del exón 12

Las mutaciones del exón 12 son relativamente específicas para las NMPC *JAK2V617F* negativa. Fueron descritas por primera vez por Scott *et al.* en diez pacientes con diagnóstico inicial de eritrocitosis idiopática (Figura 6) [28, 36-38]. Estas mutaciones se encuentran en el extremo 5' del dominio pseudoquinasa de la proteína JAK2, y al igual que V617F, se especula que es causa de un cambio estructural que resulta en la activación de JAK2.

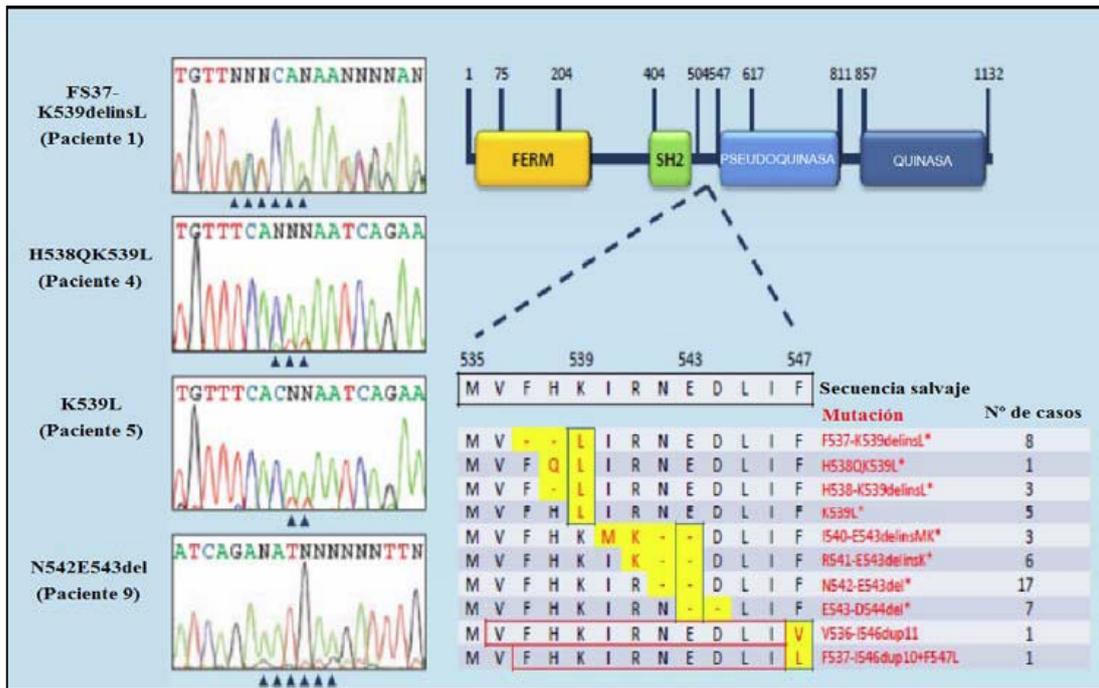


Figura 6. Mutaciones en el exón 12 del gen *JAK2*. Secuencias nucleicas y proteicas del exón 12 del gen *JAK2* donde se producen las mutaciones y frecuencia de casos asociada a cada mutación encontrada.

Los distintos estudios han identificado la delección N542-E543del como la más frecuente de las mutaciones descritas en el exón 12 [28]. Otras, que incluyen delecciones, mutaciones puntuales y duplicaciones, afectan principalmente a siete residuos de aminoácidos (F537 a E543) [37-40]. Como su mutación homóloga en el exón 14 (*JAK2V617F*), la mutación K539L en el exón 12 también se ha asociado a eritrocitosis en pacientes diagnosticados de PV [36]. En líneas generales, los pacientes positivos suelen ser heterocigotos [36, 41]. El curso clínico de estos pacientes parece ser similar al de los pacientes diagnosticados de PV *JAK2V617F* positivo. Estos hallazgos sugieren que en prácticamente todos los pacientes con PV, puede ser identificada una mutación en *JAK2* [39, 42]. Sin embargo, en contraste con la mutación V617F, las mutaciones en el exón 12 son exclusivas de la PV.

1.3. Reacción en cadena polimerasa (PCR)

A partir del descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick, varios grupos han mostrado un gran interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para estudiar los ácidos nucleicos; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos.

El progreso de esta técnica ha sido muy notable y ha ido en paralelo con los nuevos retos para estudiar y comprender mejor el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Una de las formas recientes para detectar y cuantificar a los ácidos nucleicos es a través de la PCR en tiempo real, la cual es una modalidad de la PCR que es considerada como una técnica cuantitativa.

Hoy en día, la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación que la utilizan principalmente para expresión génica, genotipificación, detección de patógenos, análisis de mutaciones, *etc.*.

1.3.1. Fundamentos de la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción suele aprovechar la actividad de una Taq ADN polimerasa, una enzima especial que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente a temperaturas elevadas el ADN en las bacterias *Thermophilus aquaticus*. Los elementos importantes en la reacción son:

- **Template o molde (ADN o ADNc):** cadenas de ADN de la muestra que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés.
- **Enzima:** la enzima más usada se llama Taq ADN polimerasa que se encarga de la catálisis de la reacción sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco.
- **Primers o cebadores:** son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta.
- **Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs; N=adenina, timina, citosina y guanina):** son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN
- **Ión magnesio (Mg⁺):** es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, debe tener una concentración adecuada (entre 0.5 y 2.5 mM) para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa. En ocasiones ya viene incluido en el buffer.
- **Solución tampón o buffer :** es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8).

- **Agua (H₂O):** es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales que conforman un ciclo de la PCR:

- **Desnaturalización:** las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán de molde para el siguiente paso.

- **Alineamiento:** los *primers*, directo e inverso, se alinean a ambos extremos, 5' y 3' respectivamente, de la secuencia diana. Para que se forme el complejo *template-primers*, es importante que la temperatura de fusión (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.

- **Extensión o elongación:** la Taq polimerasa actúa sobre el complejo *template-primers* y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C. Al final del ciclo de amplificación, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que separan los dos cebadores.

La reacción de PCR se completa repitiendo entre 25 y 35 veces las 3 fases descritas previamente, es decir, realizando entre 25 y 35 ciclos.

Por cada ciclo de PCR se duplica la cantidad de fragmento a amplificar, por tanto, al final del proceso se obtiene una cantidad de producto igual al de la cantidad inicial de ADN molde por 2ⁿ, siendo n el número de ciclos.

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo de condiciones de temperatura y tiempo en cada uno de los ciclos de amplificación.

Al final de la reacción, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.

1.3.2. PCR en tiempo real

El objetivo de la PCR en tiempo real es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El principio de la técnica se basa en la PCR punto final pero cambia la forma en cómo se detectan y

analizan los productos de la amplificación. El término tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción y el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible.

En la actualidad, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos, garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia.

Los reactivos químicos en la PCR en tiempo real, son los mismos que los utilizados en la PCR, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «*Master mix*», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los *primers* deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y, en la medida de lo posible, para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción puede disminuir considerablemente.

1.3.2.1. Cinética de la PCR en tiempo real

La cinética de amplificación de la PCR en tiempo real evidencia la acumulación de la emisión de fluorescencia en cada ciclo de reacción, y esta puede ser clasificada en cuatro fases (Figura 7):

- 1) **Inicial o basal:** entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminarla del ruido basal. Esta fase sirve para delimitar la línea base para la posterior cuantificación.
- 2) **Geométrica** (conocida como logarítmica o exponencial): los reactivos de la reacción se encuentran en cantidades saturantes por lo que la amplificación tiene una eficiencia entorno al 100%. En esta fase, el factor de amplificación del ADN es de 2^n ; es decir, a partir de cada molécula del ADN se generan otras dos, por lo que la cantidad del amplicon se duplica después de cada uno de los ciclos.
- 3) **Lineal:** comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase.
- 4) **Plateau o estacionaria:** la fase estacionaria muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción se agotaron. En ésta, la cantidad de producto obtenida es constante aunque se incremente el número de ciclos.

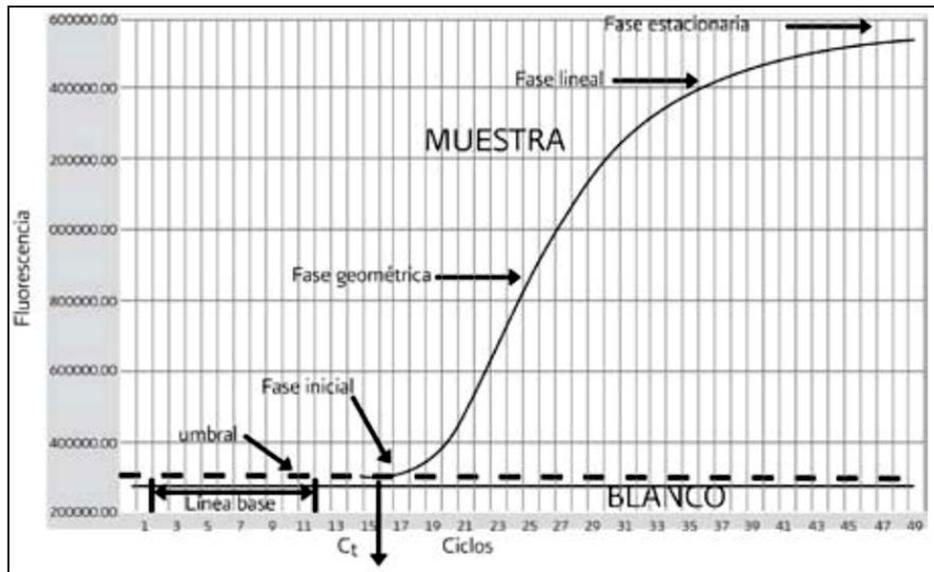


Figura 7. Cinética de amplificación de la PCR.

La línea base: es el nivel basal o fondo/*background* de fluorescencia durante los primeros ciclos de PCR. Sirve para corregir las curvas que se obtienen de un experimento, restándose a las curvas de amplificación. El umbral o *threshold* es el nivel de fluorescencia fijo por encima de la línea base.

El Ct (*Cycle threshold* o ciclo umbral) ó **Cp** (*Crossing point* o punto de cruce o corte): es el ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral y es detectada. La comparación de los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas de ADN o ADNc específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN diana hay en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Por tanto, el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN o ARN diana presente en la muestra; los datos que se obtienen permiten calcular la eficiencia de la amplificación.

1.3.2.2. Eficiencia

Es la proporción a la que un amplicón de PCR se genera, normalmente expresado con un valor en porcentaje. Si un amplicón dobla la cantidad durante la fase logarítmica de su amplificación por PCR, el ensayo tiene 100% de eficiencia. La curva estándar de la PCR es representada gráficamente como el semi-log del valor de Ct *versus* el log del ácido nucleico inicial; una pendiente de la curva estándar de -3.32 indica una reacción de PCR con 100% de eficiencia, mientras que pendientes más negativas que -3.32 indican reacciones que tienen menos del 100% de eficiencia. Pendientes más positivas que -3.32 pueden indicar problemas de calidad de la muestra o problemas de pipeteo (Figura 8) [43].

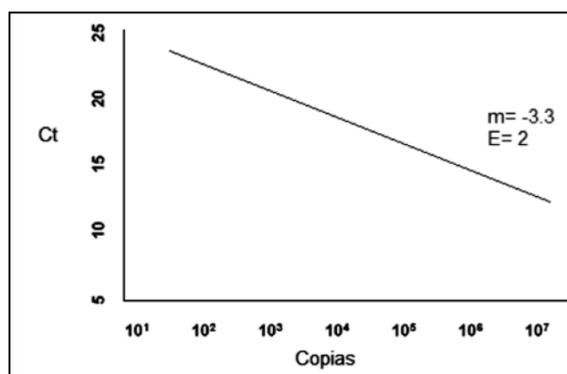


Figura 8. Gráfica de eficiencia de la PCR.
 $E = (10^{-1/m})$. Eficiencia (%) = $(E-1) \times 100$.

La eficiencia de la PCR puede ser estimada mediante curvas de calibración realizadas con diluciones seriadas de un estándar que puede ser ADN o un plásmido. Los parámetros que afectan la eficiencia de PCR son: especificidad de *primers* y sondas, concentraciones altas de dNTPs, agentes inhibidores como hemoglobina, heparina, IgG, altas concentraciones de proteína.

1.3.2.3. Métodos de detección de los productos amplificados

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real, para ello la estrategia tecnológica que ha dado buenos resultados se corresponde a los sistemas basados en reporteros fluorescentes. En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos y no específicos [44].

Métodos no específicos: se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines se llama *SYBR Green*, la cual es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia (Figura 9). Aunque el *SYBR Green* es uno de los reporteros fluorescentes más utilizados por los investigadores debido a su bajo costo, su principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de *primers*. Muchos laboratorios, para evitar esta situación, optimizan sus reacciones realizando una «curva *melting*» o «curva de disociación» al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de

dímeros de *primers*. Hoy en día la mayoría de los *softwares* de los termocicladores ofrecen esta función que es fácil de aplicar y analizar.

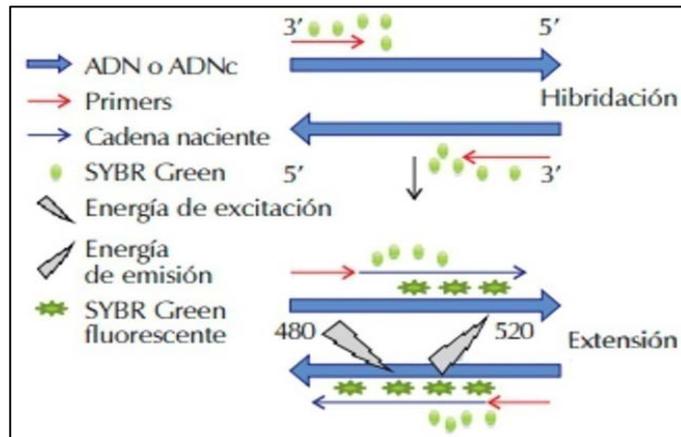


Figura 9. Método no específico. Cuando el SYBR Green está unido al ADN de doble cadena, es excitado a una longitud de 480nm, mientras que la longitud de onda de emisión corresponde a 520nm.

Métodos específicos: siguen el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o *quencher*. Para ello, existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación.

Los **métodos por hidrólisis** se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un *quencher*, ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el *quencher*, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan (Figura 10), aunque existen otras en el mercado.

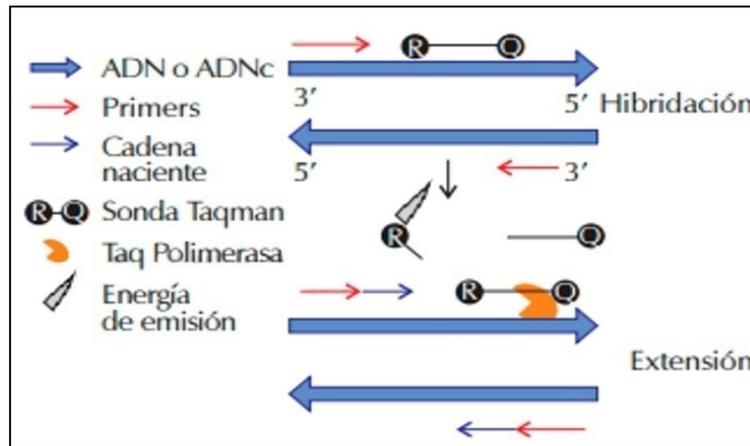


Figura 10. Método específico mediante la utilización de sondas TaqMan. R: Reportero fluorescente; Q: *Quencher*

Los **métodos por hibridación** consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia. Un ejemplo de este método son las sondas *Molecular Beacons* que también son comerciales.

Los métodos específicos son más costosos que los no específicos, pero son más eficientes al garantizar la especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos.

1.3.2.4. Técnicas de cuantificación

Un paso importante del análisis es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación precisa del blanco génico. Existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa.

Cuantificación absoluta: se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra para ello se realiza la comparación con amplificados de los cuales se conoce el número absoluto de moléculas iniciales a cuantificar (estándares), se amplifican en una misma reacción con la muestras de interés, pero en tubos diferentes. La curva estándar utiliza diluciones seriadas (mínimo 3) de estándares de concentraciones conocidas; el número de moléculas es calculado como una extrapolación a partir de una recta generada por los estándares (Figura 11).

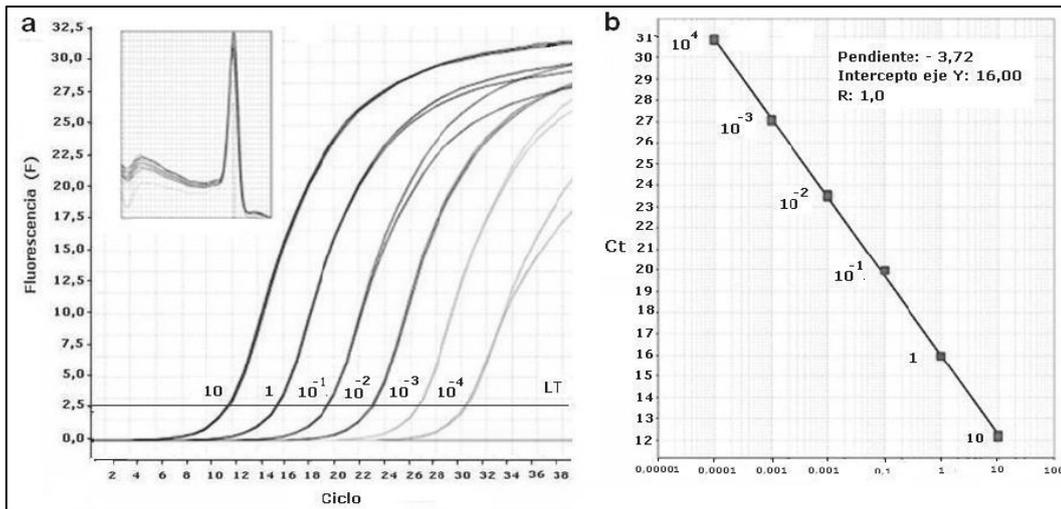


Figura 11. Curva estándar para cuantificación absoluta. **a)** Curva estándar de amplificación que se genera al realizar amplificaciones a partir de diluciones seriadas del ADN de una muestra con concentración conocida. **b)** Curva estándar, representa el log de la dilución frente al valor de Ct. La recta obtenida permite calcular las concentraciones desconocidas de las muestras y la eficiencia de la reacción.

Este método asume que todos los estándares y las muestras tienen aproximadamente igual eficiencia de amplificación. Se obtiene el valor absoluto como número de copias, células, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, etc.,

Cuantificación relativa: se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (gen *housekeeping*) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en el que aumentaron o disminuyeron los niveles de ARNm o en su caso, si no hubo cambios. Los resultados son expresados de manera relativa por lo que no se necesita una curva de calibración con un estándar de concentración conocida. La cuantificación relativa es útil y sencilla para analizar la expresión entre genes [43].

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta\text{CT}_{\text{blanco}}(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT}_{\text{ref}}(\text{control-muestra})}} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{-\Delta\text{CT}_{\text{blanco}}(\text{muestra-control})}}{(E_{\text{ref}})^{-\Delta\text{CT}_{\text{ref}}(\text{muestra-control})}}$$

Método de Ct comparativo (Método $\Delta\Delta\text{CT}$): este método es similar al método de la curva estándar relativa, excepto que este usa las fórmulas aritméticas para lograr un resultado para la cuantificación relativa.

Es posible eliminar el uso de curvas estándar y usar el método de $\Delta\Delta\text{CT}$, pero las eficiencias de PCR entre blanco(s) y control(es) endógeno(s) deben ser relativamente equivalentes. La

ventaja de este método es que no exige curvas estándar, permitiendo el ahorro de reactivos y es útil cuando hay un número alto de blancos y/o de muestras.

2. OBJETIVOS

El objetivo primario de este proyecto es el estudio de alternativas experimentales para abaratar costes en las pruebas de diagnóstico molecular en cáncer. La prueba que se tomó como referencia para llevar a cabo el estudio ha sido la cuantificación de la mutación V617F en el gen *JAK2* mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Los objetivos de este proyecto son:

1. Evaluar los descompuestos de los costes de la prueba usada en rutina (personal, material fungible, instrumentación) y determinar el peso de cada uno de ellos para determinar las partidas más costosas de la prueba que podrían ser reducidas.
2. Buscar alternativas experimentales que permitan abaratar estas partidas.
3. Analizar la posibilidad de realizar una cuantificación relativa en lugar de una cuantificación absoluta como se hace en rutina empleando el *SYBR Green* como agente intercalante de ADN para detectar los productos amplificados en vez de usar sondas oligonucleotídicas marcadas más caras.
4. Seleccionar las muestras de casos archivados y procesados en la unidad para llevar a cabo el estudio comparativo entre la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa de la mutación V617F del gen *JAK2*.
5. Realizar pruebas para comparar la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y precisión entre la técnica realizada de forma rutinaria en el laboratorio (cuantificación absoluta) y la alternativa estudiada (cuantificación relativa).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Las muestras utilizadas para realizar este estudio eran de pacientes del servicio de Hematología del Hospital Universitario La Paz de Madrid, diagnosticados con neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) y con presencia de la mutación de V617F en el gen *JAK2*. En la Tabla 1 se resumen las características de estos pacientes:

Tabla 1. Edad y sexo de los pacientes cuyas muestras se han empleado en este estudio.

PACIENTE	ID MUESTRAS	FECHA NACIMIENTO	EDAD	SEXO
1	15B0099	06/02/1960	55	MUJER
	14B0072			
	13B0109			
2	15B0044	09/05/1947	68	HOMBRE
	14B0040			
	13B0111			
3	15B0057	06/12/1929	86	HOMBRE
	13B0105			
	11B0446			
4	15B0136	08/10/1948	67	HOMBRE
	14B0248			
	13B0126			
	12B0247			
	12B0054			
5	14B0297	28/08/1939	76	HOMBRE
6	15B0136	08/10/1948	67	HOMBRE
7	15B0157	27/01/1959	56	HOMBRE
8	14B0053	06/02/1961	54	MUJER
9	14B0114	21/03/1931	84	HOMBRE
10	14B0095	04/04/1941	74	MUJER
11	13Q0022	N.A	N.A	N.A
12	15B0130	23/10/1974	41	MUJER

N.A.: No Aplica (la muestra nº11 es una muestra anónima utilizada para controles de calidad interlaboratorios). ID: código interno identificador de cada muestra.

3.2. Ensayos realizados

En este estudio, para valorar la posibilidad de sustituir el *SYBR Green* por las sondas *TAQman* y realizar una cuantificación relativa en lugar de una cuantitativa se decidió valorar dos tipos de casos como se muestra en la Figura 12.

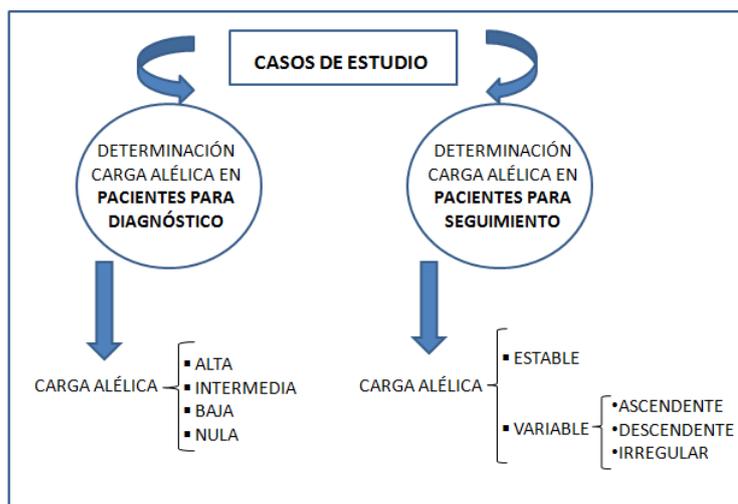


Figura 12. Esquema de los ensayos realizados para el estudio comparativo.

3.2.1. Pacientes para diagnóstico

Es necesario determinar la mutación V617F en el gen *JAK2* y el valor de la carga alélica de esta mutación. Para realizar el estudio se han elegido cuatro niveles de carga alélica:

- Alta (A) si era $\geq 80\%$,
- Intermedia (I) si estaba comprendida entre 30 y 80%,
- Baja (B) si era $\leq 30\%$,
- Nula (N) si era $\leq 1\%$

En cada nivel se han seleccionado dos casos y se ha realizado una búsqueda en los datos archivados de pacientes con la mutación V617F en el gen *JAK2* que se ajustasen a estos niveles de carga alélica (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras utilizadas para el estudio de la determinación del valor de la carga alélica en la mutación V617F del gen *JAK2*.

CARGA ALÉLICA	MUESTRA	ID PACIENTE	VALOR DE LA CARGA ALÉLICA INFORMADA (%)
ALTA	A1	14B0297	97
	A2	15B0136	81
INTERMEDIA	I1	15B0157	58
	I2	14B0053	41
BAJA	B1	14B0114	20
	B2	14B0095	5
NULA	N1	13Q0022	0,93
	N2	15B0130	0,00

3.2.2. Pacientes para seguimiento

En este caso es necesario realizar un seguimiento del valor de la carga alélica a lo largo del tiempo en pacientes que presentan la mutación V617F en el gen *JAK2* para ver cómo evoluciona el paciente al tratamiento. Se estudiaron dos casos:

1) Carga alélica del paciente estable en el tiempo.

En la base de datos se seleccionó un caso que cumpliera la estabilidad de la carga alélica y se han elegido 3 muestras de un paciente (Tabla 3). Las muestras eran de diferentes años, con un año aproximadamente entre cada una de ellas.

Tabla 3. Paciente seleccionado con una evolución estable en el tiempo de la carga alélica.

CARGA ALÉLICA	MUESTRA	ID PACIENTE	VALOR DE LA CARGA ALÉLICA INFORMADA (%)
ESTABLE	E1	15B0099	26
	E2	14B0072	26
	E3	13B0109	21

2) Carga alélica variable en el tiempo.

En el caso de carga alélica variable, se analizaron 3 posibilidades:

- Carga alélica ascendente en el tiempo (A)
- Carga alélica descendente en el tiempo (D)
- Carga alélica irregular en el tiempo (I)

En cada caso se han considerado 3 muestras (Ascendente: A1, A2 y A3) y (Descendente: D1, D2 y D3) y en el caso de carga variable irregular se eligieron 5 muestras en lugar de tres para poder observar mejor la irregularidad de la variación (I1, I2, I3, I4 e I5).

Tabla 4. Pacientes seleccionados para el estudio de seguimiento del valor de la carga alélica variable en el tiempo.

CARGA ALÉLICA	MUESTRA	PACIENTE	VALOR DE LA CARGA ALÉLICA INFORMADA (%)
ASCENDENTE	A1	13B0111	44
	A2	14B0040	72
	A3	15B0044	92
DESCENDENTE	D1	11B0446	94
	D2	13B0105	56
	D3	15B0057	13
IRREGULAR	I1	12B0054	41
	I2	12B0247	29
	I3	13B0126	9
	I4	14B0248	73
	I5	15B0136	81

3.3. Cuantificación de la concentración de ADN de las muestras seleccionadas.

Una vez seleccionadas las muestras del archivo en función del valor de carga alélica, se cuantifica la concentración de ADN por espectrofotometría con *Nanodrop* (*Thermo Scientific*) y se preparan disoluciones diluidas de las mismas para obtener una concentración de 20 ng/ μ L.

El kit de *SYBR Green* recomienda utilizar un máximo de 50-100 ng de ADN genómico para llevar a cabo la PCR. Por lo que se ha decidido utilizar la máxima concentración de 100 ng.

3.4. Determinación de la carga alélica, PCR en tiempo real y cuantificación relativa.

El estudio de la carga alélica se ha realizado mediante cuantificación relativa. La principal premisa para llevar a cabo una cuantificación relativa exacta es que las eficiencias de la amplificación por PCR de la secuencia diana y de la secuencia referencia no varíen ni entre sí, ni de una muestra a otra.

La gran ventaja de este modo es que no precisa conocer el número absoluto de copias en cada muestra y, por lo tanto, no requiere establecer un recta patrón con muestras estándares de concentración conocida que encarecen significativamente el proceso.

3.4.1. Preparación de la mezcla de PCR

La presencia de la mutación V617F en el gen *JAK2* se determinó empleando el kit comercial *Light Cycler 480 SYBR Green I Master* (Roche Applied Science). Para preparar una mezcla de reacción de 20 µL, se deben seguir los siguientes pasos:

- 1) Descongelar 1 vial *Light Cycler SYBR Green I Master* (Tubo etiquetado verde) y agua grado PCR. Mantener el *Master mix* lejos de la luz.
- 2) Preparar una concentración de los *primers* 10x.

Los *primers* son obtenidos de *Applied Biosystems* liofilizados, estos son resuspendidos a una concentración de 100 µM. Una alícuota del vial original es diluida a la concentración de 5 µM. Todos los *primers* se guardan a -20°C y son estables al menos durante un año.

La concentración de primer recomendada en el pocillo de PCR es de 0,5 µM.

Los *primers* utilizados son:

Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados.

CEBADOR	Secuencia (5' - 3')
KRAS-F	ATAGTGTATTAACCTTATGTGTG
KRAS-R	GAGAAACCTTTATCTGTATCA
JAK2-WT-F	GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGTG
JAK2-V617F-F	GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGTT
JAK2-R	GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC

- 3) En un tubo de reacción de 1,5 mL mantenido en hielo, se ha preparado una mezcla de PCR añadiendo los reactivos por el orden establecido (Tabla 6):

Tabla 6. Volúmenes utilizados en la preparación de la *mezcla de PCR*. Se multiplican estos volúmenes por el número de reacciones que se pretende llevar a cabo.

REACTIVO	Volumen por reacción (µL)
Agua, grado PCR (Tubo incoloro)	3
Primer-R PCR, 10X.	1
Primer-F PCR, 10X.	1
Master Mix, 2X conc. (Tubo verde)	10
Volumen Total	15

Primer-F: cebador directo; Primer-R: cebador reverso

- 4) Pipetear 15 μ L de mezcla de PCR en cada pocillo de una placa de 384 pocillos (Figura 2).
- 5) Añadir 5 μ L del ADN molde.
- 6) Sellar la placa con una lámina de sellado de plástico.
- 7) Centrifugar la placa a 1500g (3000 rpm) durante 2 min para eliminar burbujas.
- 8) Cargar la placa en el equipo *Light Cycler 480*.

3.4.2. Controles utilizados

Control de contaminación (Blanco)

Siempre se ha incluido una reacción sin ADN molde (blanco) para controlar posibles contaminaciones cruzadas .

Control positivo

Del mismo modo, se ha utilizado ADN molde con la mutación V617F para evaluar la eficacia de la reacción de PCR. En este procedimiento el control positivo es una muestra incluida en el kit (PC-V617F *JAK2* que contiene 100% de alelo mutado). El control interno debe amplificar en todas las muestras negativas para excluir falsos negativos debido al fracaso de la PCR. El control positivo debe dar un porcentaje de *JAK2* V617F superior al 99,9%.

Control negativo

Se ha utilizado un ADN molde sin la mutación (*Wild Type* o WT) para asegurar la especificidad del ensayo. Este control negativo es una muestra incluida en el kit (NC-V617F *JAK2* con 100% de alelo WT). En el control negativo solo se detectará amplificación de un control interno o gen de expresión constitutiva. El control negativo debe dar un porcentaje de *JAK2* V617F inferior al 0,1%.

3.4.3. Configuración de la reacción de RT-PCR

El protocolo que usa *Light Cycler 480 SYBR Green I Master* contiene las siguientes etapas (Figura 13 y tabla 7):

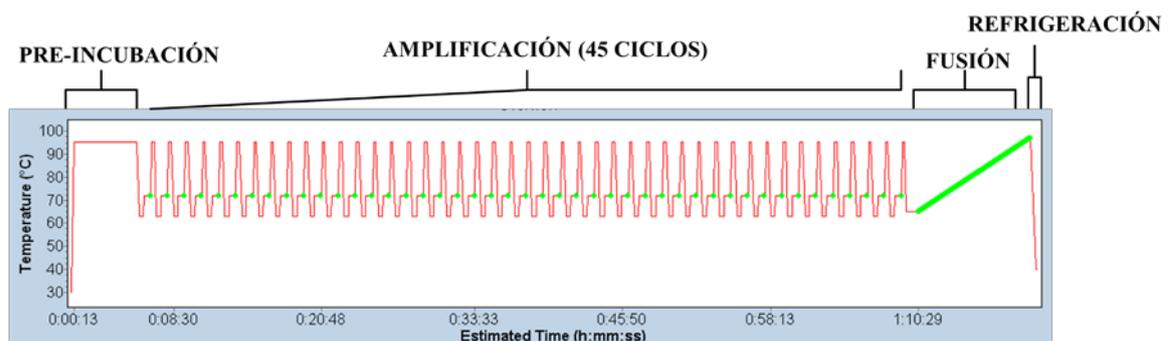


Figura 13. Diferentes etapas llevadas a cabo en cada PCR.

Tabla 7. Detalle de los Parámetros de la qRT-PCR .

Formato de Detección		Placa	Volumen de Reacción	
SYBR Green		384	3-20 µL	
PROGRAMAS				
Nombre de programa		Ciclos	Modo de Análisis	
Pre-incubación		1	Ninguno	
Amplificación		45	Cuantificación	
Curva de fusión		1	Curvas de fusión	
Refrigeración		1	Ninguno	
OBJETIVOS TEMPERATURA				
OBJETIVO (°C)	Modo Adquisición	Tiempo (hh:mm:ss)	Velocidad Rampa (°C/s)	Adquisiciones (por °C)
Pre-incubación				
95	Ninguno	0:05:00	4,8	-
Amplificación				
95	Ninguno	0:00:10	4,8	-
63	Ninguno	0:00:20	2,5	-
72	Simple	0:00:30	4,8	-
Curva de fusión				
95	Ninguno	0:00:05	4,8	
65	Ninguno	0:01:00	2,5	
97	Continuo	-	-	10
Refrigeración				
40	Ninguno	0:00:10	2,0	-

3.4.4. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se lleva a cabo comparando:

- El ratio de la secuencia de ADN diana con respecto a una secuencia de ADN de referencia en una muestra desconocida (la del paciente).
- El ratio de las mismas dos secuencias en una muestra estándar conocida como calibrador.

Diana: es el ADN de interés, en nuestro estudio será parte de la secuencia del gen *JAK2* que contiene la mutación V617F.

Referencia: es la secuencia de un gen del que se sabe que se encuentra en un número de copias constante en todas las muestras y sirve de control. En nuestro estudio el gen de referencia escogido ha sido el gen *KRAS*.

Calibrador: es típicamente una muestra positiva con un cociente estable de diana-referencia. Se utiliza para normalizar todas las muestras dentro de un experimento, pero además proporciona un punto de calibración constante entre varios experimentos. En el apartado 2.6 se detalla cómo se ha preparado esta disolución calibradora para los ensayos estudiados.

El resultado es expresado como un ratio normalizado de las concentraciones de las secuencias diana y de referencia en todas las muestras (Figura 14):

$$\text{Ratio Normalizado} = \frac{\left[\frac{[ADN]_{DIANA}}{[ADN]_{REFERENCIA}} \right]_{MUESTRA}}{\left[\frac{[ADN]_{DIANA}}{[ADN]_{REFERENCIA}} \right]_{CALIBRADOR}}$$

En este estudio se calcula 2 ratios normalizados, uno siendo la diana la mutación V617F del gen *JAK2* y otro siendo la diana la secuencia salvaje del gen *JAK2* (WT).

$$\text{Ratio Normalizado}_{V617F} = RN_{V617F} = \frac{\left[\frac{[ADN]_{V617F}}{[ADN]_{KRAS}} \right]_{MUESTRA}}{\left[\frac{[ADN]_{V617F}}{[ADN]_{KRAS}} \right]_{CALIBRADOR}}$$

$$\text{Ratio Normalizado}_{WT} = RN_{WT} = \frac{\left[\frac{[ADN]_{WT}}{[ADN]_{KRAS}} \right]_{MUESTRA}}{\left[\frac{[ADN]_{WT}}{[ADN]_{KRAS}} \right]_{CALIBRADOR}}$$

La cuantificación de las concentraciones de las secuencias diana y de referencia se basa en la determinación experimental del valor Cp (*Crossing point*). El Cp se corresponde al ciclo de PCR en el que el aumento de la fluorescencia detectada se considera exponencial (i.e. cuando, tras cada ciclo de PCR, se duplica la cantidad de material existente en el ciclo de PCR anterior) y es, por lo tanto, directamente proporcional a la concentración inicial de ADN en la muestra. El Cp de cada reacción de PCR se establece en el punto de cruce de la curva de amplificación con una línea basal establecida automáticamente en el umbral de detección de la técnica. De este modo, los Cp de todas las muestras con comparables entre sí, y esta característica es lo que permite cuantificar la concentración de ADN en cada una de ellas.

Subset Editor	Results			Manual Pairing			Target Name			
	Bar	Pairing	Sample Name	Targets	References	Target	Reference	Ratios		
	Chart	Pairing	Sample Name	Targets	References	Mean Cp	Mean Cp	Target/Ref	Normalized	Status
<input checked="" type="checkbox"/>			CAL KRAS;CAL V617F	V617F	KRAS	25.07	26.05	1.967	1.000	
<input checked="" type="checkbox"/>	B10/J10	E1		V617F	KRAS	25.45	25.63	1.136	0.5775	
<input checked="" type="checkbox"/>	B12/J12	E2		V617F	KRAS	26.14	27.04	1.861	0.9461	
<input checked="" type="checkbox"/>	B14/J14	E3		V617F	KRAS	25.41	25.80	1.314	0.6680	
<input checked="" type="checkbox"/>	B16/J16	A1		V617F	KRAS	24.59	26.72	4.359	2.216	
<input checked="" type="checkbox"/>	B18/J18	A2		V617F	KRAS	24.75	27.87	8.745	4.447	
<input checked="" type="checkbox"/>	B20/J20	A3		V617F	KRAS	23.82	26.44	6.146	3.125	
<input checked="" type="checkbox"/>	C10/K10	D1		V617F	KRAS	24.65	27.07	5.364	2.728	
<input checked="" type="checkbox"/>	C12/K12	D2		V617F	KRAS	25.10	27.23	4.389	2.232	
<input checked="" type="checkbox"/>	C14/K14	D3		V617F	KRAS	26.80	26.62	0.8833	0.4491	
<input checked="" type="checkbox"/>	D10/L10	I1		V617F	KRAS	26.04	27.96	3.790	1.927	
<input checked="" type="checkbox"/>	D12/L12	I2		V617F	KRAS	25.94	26.57	1.541	0.7835	
<input checked="" type="checkbox"/>	D14/L14	I3		V617F	KRAS	26.75	25.55	0.4345	0.2209	

Figura 14. Captura de pantalla del *software release 1.5.0 SP4* del equipo *LightCycler 480* que muestra los ratios normalizados para la mutación V617F y WT para cada una de las muestras después del transcurso de la PCR.

Finalmente la determinación de la carga alélica se obtiene a partir de los ratios normalizados de la secuencia de ADN mutada y la salvaje, como se detalla en la siguiente ecuación:

$$\text{Carga Alélica JAK2(V617F)(\%)} = \frac{RN_{V617F}}{RN_{V617F} + RN_{WT}}$$

3.5. Curvas de disociación o curvas de *melting*

Al utilizar *SYBR Green* es importante hacer curvas de disociación para cuantificar dímeros o bandas contaminantes que se hayan amplificado con la secuencia de estudio. Al finalizar el ciclo de PCR, el programa asociado al instrumento *Light Cycler 480* permite generar y visualizar las curvas de *melting* (Figura 15).

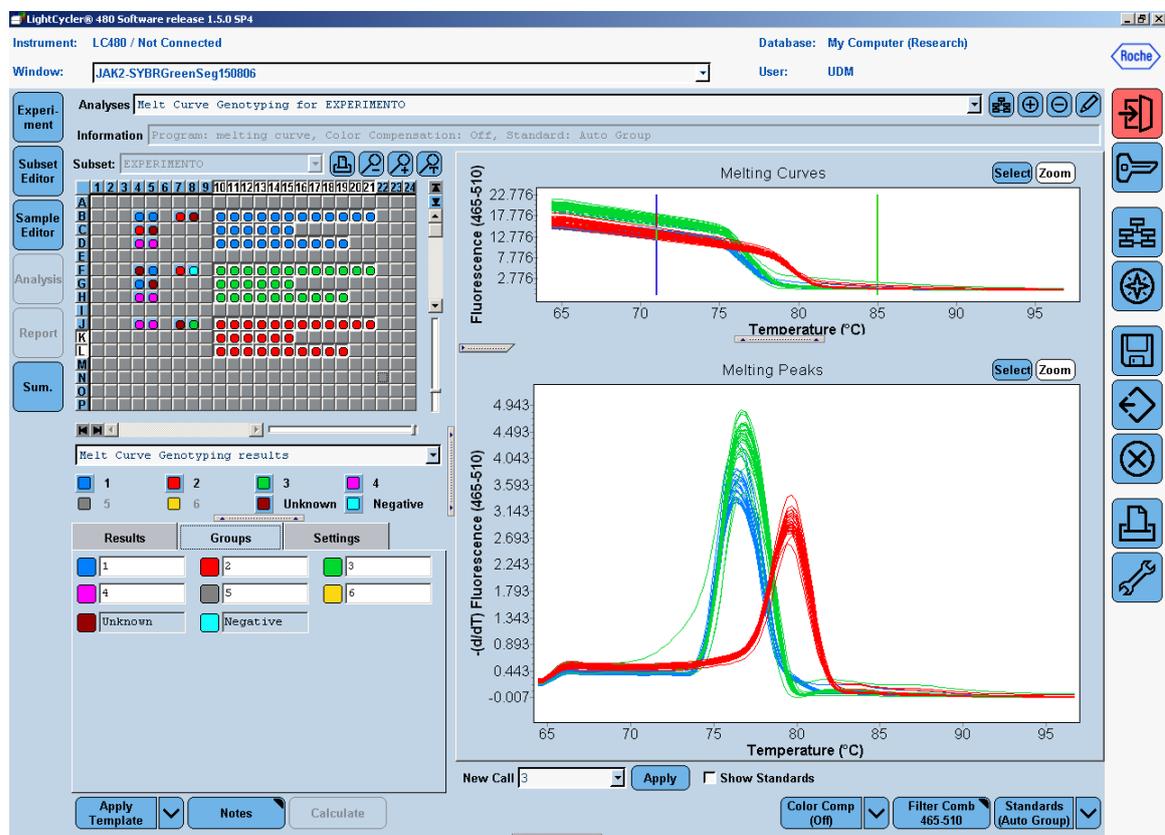


Figura 15. Curvas de *melting* que permiten detectar productos inespecíficos en las reacciones de qRT-PCR llevadas a cabo.

3.6. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se han migrado en un gel de agarosa al 2% para comprobar la idoneidad de los amplicones obtenidos. En cada pocillo se han cargado 4 μ L de muestra y 1 μ L de *buffer* de carga además de un marcador de pesos moleculares (Biotools).

3.7. Cálculo de costes

Para realizar este estudio económico se analizan los recursos consumidos (tiempo del personal, recursos materiales y uso de equipos) en cada etapa de las que consta la prueba realizada en rutina en la unidad (Tabla 8 y Tabla 9).

En la evaluación económica de tecnologías sanitarias, los costes se estiman multiplicando las cantidades de recursos utilizados por el coste unitario de estos recursos a precios constantes [45].

Tabla 8. Etapas del protocolo de trabajo para la realización de la prueba.

EXTRACCIÓN ADN	Introducción datos <i>Gestlab</i> . Operación en cabina flujo laminar. Centrifugación. Cuantificación ADN (NANODROP). Etiquetado y conservación muestra. Limpieza.
MONTAJE PCR	Preparación en cabina flujo laminar. Preparación de disoluciones. Preparación de disoluciones de cebadores. Dosificación de mezclas en placa. Centrifugación. Limpieza.
REALIZACIÓN PCR	Programación del experimento Introducción de la placa. Cargar programa.
ANÁLISIS DE RESULTADOS	Obtención datos brutos del equipo. Análisis e interpretación de resultados. Introducción resultados en <i>Gestlab</i> y elaboración de informe.

Tabla 9. Tabla de cálculo utilizada para estimar el coste de la prueba.

ETAPAS PRUEBA	PERSONAL				RECURSOS				EQUIPOS		COSTE
	Técnico	COSTE (€/min)	Jefe Unidad	COSTE (€/min)	Material	COSTE (€/Unidad)	Reactivos	COSTE (€/mL)	EQUIPO	COSTE (€/min)	
	Tiempo	Coste	Tiempo	Coste	Unidades		Volumen		Tiempo Uso		
EXTRACCIÓN											
MONTAJE PCR											
REALIZACIÓN PCR											
ANÁLISIS RESULTADOS											
									COSTE TOTAL PRUEBA		

El coste de personal se ha calculado determinando el tiempo necesario para realizar cada una de las tareas por parte del técnico y del jefe de unidad, sabiendo que el coste unitario son respectivamente 0,26 y 0,57 €/min. Para determinar, el coste de recursos se han examinado los materiales (guantes, puntas de pipeta, tubos, ...) y reactivos (reactivos químicos, *primers*, sonda *TaqMan*,...) necesarios en cada etapa. Los costes de materiales se calculan en función de las unidades consumidas y para los reactivos, que son líquidos, en función del volumen utilizado. En referencia a la partida de equipos (centrífuga, campana ,equipo de PCR,...) se calcula el tiempo de uso de cada equipo en cada una de las

etapas de la prueba y como se conoce el coste/minuto de cada equipo se determina la partida de coste de equipos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cálculo de costes

Para el cálculo de costes se han seguido los procedimientos indicados en materiales y métodos.

4.1.1. Costes de la prueba de determinación de la mutación V617F del gen *JAK2* por cuantificación absoluta utilizando sondas TAQman.

Para cada categoría de personal en el CNIO, los costes del personal que interviene en un servicio se calculan en base a un valor unitario establecido corporativamente para cada categoría en función de sus cualificaciones. Así para un Técnico este coste es de 0.26€/min y para un responsable de laboratorio de 0.57€/min. La partida “Personal” de la tarifa final se estima por lo tanto determinando la dedicación horaria de cada categoría de personal en las distintas etapas de realización de la prueba (Tabla 10).

Tabla 10. Estimación de los costes de personal en la determinación rutinaria de la carga alélica de la mutación V617F del gen *JAK2* por cuantificación absoluta.

ETAPAS PRUEBA	PERSONAL				COSTE PERSONAL (€)
	TÉCNICO	COSTE (€/min)	JEFE UNIDAD	COSTE (€/min)	
	Tiempo (min)	Coste (€)	Tiempo (min)	Coste (€)	
EXTRACCIÓN	30	7,8	2	1,14	8,94
MONTAJE PCR	30	7,8	0	0	7,8
REALIZACIÓN PCR	5	1,3	0	0	1,3
ANÁLISIS RESULTADOS	7	1,82	5	2,85	4,67
				COSTE TOTAL	22,71

Los costes de material y reactivos fungibles se establecen, estimando un coste unitario para cada tipo de material y reactivo que se usa para realizar una reacción o un procedimiento concreto y luego estableciendo el número de unidades usadas en la prueba que se está tarifando (Tabla 11).

Tabla 11. Estimación de los costes de materiales y reactivos fungibles en la determinación rutinaria de la carga alélica de la mutación V617F del gen JAK2 por cuantificación absoluta.

ETAPAS PRUEBA	RECURSOS							
	MATERIAL	Unidades	COSTE (€/Unidad)	COSTE (€)	REACTIVO	Volumen (mL)	COSTE (€/mL)	COSTE (€)
EXTRACCIÓN	Tubo 15 mL	2	0,29	0,58	Buffer EL	1	0,13	0,13
	Punta 1mL	4	0,09	0,36	Cell Lysis Solution	1	0,46	0,46
	Tubo de 1,5 mL	1	0,05	0,05	Protein Precipitation Solution	0,35	1,19	0,42
	Otros: guantes, papel, etiquetas,...			3,17	Isopropanol 100%	1	0,15	0,15
					Etanol 70%	1	0,01	0,01
					DNA Hydration Solution	0,2	1,66	0,33
			Total	4,16			Total	1,50
MONTAJE PCR							Reacción (€/reacción)	(€)
	Placa 384 (Light Cycler480)	1	3,65	3,65	Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems)	2	27,08	54,16
	Lámina sellado	1	0,69	0,69	Controles	6	6,77	40,62
	Punta 1mL	2	0,09	0,18	Sonda TQMAN	20	0,57	11,4
	Punta 0,2mL	5	0,09	0,45	Primer JAK2-WT-F	10	0,04	0,4
	Punta 20 µL	20	0,1	2	Primer JAK2-V617F-F	10	0,04	0,4
	Tubo de 1,5 mL	5	0,05	0,25	Primer JAK2-R	20	0,04	0,8
	Otros: guantes, papel, etiquetas,...			3,17				Total
			Total	10,39			Total prueba	123,83

Los costes debidos al uso de instrumentos se basa en un coste unitario establecido para cada equipo por la amortización de su coste en cinco años de uso. La partida “Equipos” se evalúa por lo tanto estimando el tiempo de uso de cada equipo para llevar a cabo todas las etapas de la prueba (Tabla12).

Tabla 12. Estimación de los costes debido al uso de equipos de laboratorio en la determinación rutinaria de la carga alélica de la mutación V617F del gen JAK2 por cuantificación absoluta.

ETAPAS PRUEBA	EQUIPOS		COSTE (€)
	EQUIPO	COSTE (€/min)	
EXTRACCIÓN			
Cabina Flujo Laminar	30	0,0075	0,2250
Mezclador	2	0,0004	0,0008
Centrífuga	14	0,0082	0,1148
Frigorífico y congelador	10	0,2886	2,8860
MONTAJE PCR			
Cabina Flujo Laminar	30	0,0075	0,2250
Mezclador	4	0,0004	0,0016
Centrífuga	2	0,0082	0,0164
Frigorífico y congelador	10	0,2886	2,8860
REALIZACIÓN PCR			
Equipo PCR cuantitativa ABI Light Cycler 480 II	30	0,0133	0,3990
		COSTE EQUIPOS	6,75

El coste de la determinación de la carga alélica por cuantificación absoluta empleando un kit comercial (*JAK2 MutaQuant™ Kit* - QIAGEN) asciende a 153.29€ Este valor se

obtiene de la suma de coste de personal (Tabla 10), coste de material y reactivos (Tabla 11) y coste de equipos (Tabla 12).

4.1.2. Costes de la prueba de determinación de la mutación V617F del gen *JAK2* por cuantificación relativa utilizando *SYBR Green*.

La partida “PERSONAL” de la tarifa final se estima determinando la dedicación horaria de cada categoría de personal en las distintas etapas de realización de esta prueba (Tabla 13).

Tabla 13. Estimación de los costes de personal en la determinación de la carga alélica de la mutación V617F del gen *JAK2* por cuantificación relativa.

ETAPAS PRUEBA	PERSONAL				COSTE PERSONAL (€)
	TÉCNICO	COSTE (€/min)	JEFE UNIDAD	COSTE (€/min)	
		0,26		0,57	
	Tiempo (min)	Coste (€)	Tiempo (min)	Coste (€)	
EXTRACCIÓN	30	7,8	2	1,14	8,94
MONTAJE PCR	40	10,4	0	0	10,4
REALIZACIÓN PCR	5	1,3	0	0	1,3
ANÁLISIS RESULTADOS	7	1,82	5	2,85	4,67
COSTE TOTAL					25,31

Los costes de material y reactivos fungibles se calculan estimando un coste unitario para cada tipo de material y reactivo y estableciendo el número de unidades usadas en la prueba (Tabla 14).

Tabla 14. Estimación de los costes de materiales y reactivos fungibles en la determinación de la carga alélica de la mutación V617F del gen *JAK2* por cuantificación relativa.

ETAPAS PRUEBA	RECURSOS							
	MATERIAL	Unidades	COSTE (€/Unidad)	COSTE (€)	REACTIVO	Volumen (mL)	COSTE (€/mL)	COSTE (€)
EXTRACCIÓN	Tubo 15 mL	2	0,29	0,58	Buffer EL	1	0,13	0,13
	Punta 1mL	4	0,09	0,36	Cell Lysis Solution	1	0,46	0,46
	Tubo de 1,5 mL	1	0,05	0,05	Protein Precipitation Solution	0,35	1,19	0,42
	Otros: guantes, papel, etiquetas,...			3,17	Isopropanol 100%	1	0,15	0,15
					Etanol 70%	1	0,01	0,01
					DNA Hydration Solution	0,2	1,66	0,33
	Total				4,16	Total		1,50
MONTAJE PCR	Reacción (€/reacción) (€)							
	Placa 384 (Light Cycler480)	1	3,65	3,65	Light Cycler 480 SYBR Green I Master Mix 2x	6	0,49	2,94
	Lámina sellado	1	0,69	0,69	Controles	20	0,49	9,8
	Punta 1mL	5	0,09	0,45	Primer JAK2-WT-F	10	0,04	0,4
	Punta 0,2mL	26	0,09	2,34	Primer JAK2-V617F-F	10	0,04	0,4
	Punta 20 µL	15	0,1	1,5	Primer JAK2-R	20	0,04	0,8
	Tubo de 1,5 mL	5	0,05	0,25	Primer KRAS-F	6	0,04	0,24
	Otros: guantes, papel, etiquetas,...			3,17	Primer KRAS-R	6	0,04	0,24
Total				12,05	Total		14,58	
Total prueba								32,29

Los costes debidos al uso de instrumentos se basa en un coste unitario establecido para cada equipo por la amortización de su coste en cinco años de uso. La partida “Equipos” se

evalúa por lo tanto estimando el tiempo de uso de cada equipo para llevar a cabo todas las etapas de la determinación por cuantificación relativa (Tabla15).

Tabla 15. Estimación de los costes debido al uso de equipos de laboratorio en la determinación de la carga alélica de la mutación V617F del gen JAK2 por cuantificación relativa.

ETAPAS PRUEBA	EQUIPOS		COSTE (€)
	EQUIPO Tiempo uso (min)	COSTE (€/min)	
EXTRACCIÓN			
Cabina Flujo Laminar	30	0,0075	0,2250
Mezclador	2	0,0004	0,0008
Centrífuga	14	0,0082	0,1148
Frigorífico y congelador	10	0,2886	2,8860
MONTAJE PCR			
Cabina Flujo Laminar	40	0,0075	0,3000
Mezclador	5	0,0004	0,0020
Centrífuga	2	0,0082	0,0164
Frigorífico y congelador	10	0,2886	2,8860
REALIZACIÓN PCR			
Equipo PCR cuantitativa <i>ABI Light Cycler 480 II</i>	80	0,0133	1,0640
COSTE EQUIPOS			7,50

El coste de la determinación de carga alélica por cuantificación relativa utilizando el kit comercial *Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science)* asciende a 65,1€ resultado de sumar los costes de personal (Tabla13), los costes de materiales y reactivos necesarios para realizar la prueba (Tabla 14) y los costes de equipos (Tabla 15).

4.2. Curvas de disociación (Curvas *melting*)

En los experimentos se utiliza *SYBR Green* como agente intercalante del ADN, por tratarse de una propuesta más económica. Aunque no es específico es muy utilizado para cuantificar ADN si la PCR se combina con curvas de disociación que permitan evaluar la especificidad del producto de reacción.

Se han realizado cinco series de experimentos para la determinación de la carga alélica; tres para el diagnóstico de pacientes y dos para realizar el seguimiento a pacientes ya diagnosticados.

4.2.1. Curvas de disociación para la determinación de la carga alélica en pacientes en el momento del diagnóstico.

Al finalizar la reacción de amplificación la medida de la disociación de las hebras del ADN en función de la temperatura se realiza aumentando la temperatura en el termociclador de 65°C a 95°C con una rampa lenta. Cuando las dobles cadenas de ADN se separan, la

fluorescencia disminuye porque el colorante deja de estar unido al producto de la PCR. La temperatura a la que el 50% del ADN se ha desnaturalizado se conoce como punto de fusión y es específica de cada secuencia de ADN (Figura 16).

Una reacción de amplificación que presente más de un pico reflejaría la presencia de amplicones inespecíficos o dímeros de cebadores (*primer dimers*).

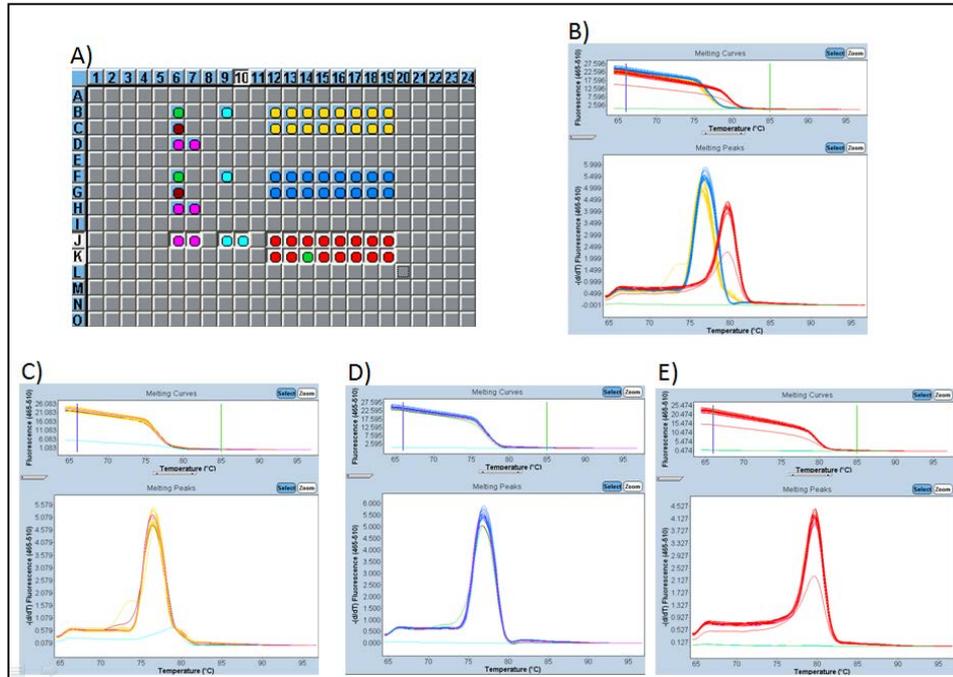


Figura 16. Curvas de disociación para el experimento 3 de la determinación de la carga alélica en pacientes en el momento del diagnóstico. A) Plantilla del experimento donde las muestras de color: verde son para el control +, marrón para el control -, rosa para la disolución calibradora, azul para el blanco, amarillo para la detección de la mutación V617F, azul para la detección de la secuencia nativa y rojo para la detección del gen de referencia KRAS. B) Curvas de disociación para todas las muestras del experimento. C) Curvas de disociación para la mutación V617F del gen *JAK2*. D) Curvas de disociación para la secuencia nativa del gen *JAK2*. E) Curvas de disociación para el gen de referencia KRAS.

Las curvas de disociación de las muestras con la mutación V617F del gen *JAK2* (amarilla en la gráfica B y C de la Figura 16) y con la secuencia nativa-nativa (azul en la gráfica B y D de la Figura 16) muestran una menor diferencia en la temperatura de *melting* que con las curvas del gen KRAS (rojo en la gráfica B y E de la Figura 16). Esto es debido a que la única diferencia en la secuencia de ADN entre las secuencias mutada y nativa reside en el cambio de una guanina (G) de la secuencia nativa por una timina (T) en la secuencia mutada. Cabe señalar que la mutación podría por lo tanto ser detectada por un cambio en el punto de fusión del producto de PCR como se lleva a cabo en experimentos de PCR mediante HRM (*High Resolution Melting*).

Se puede observar que tanto para cargas alélicas altas como bajas, se obtienen curvas de disociación superpuestas, indicando la especificidad de este ensayo. Del mismo modo, también se observan los blancos que no han amplificado en la mayoría de los pocillos (azul claro en la Figura 16). Excepcionalmente se observan pequeñas señales no esperadas para estos controles (gráfica C de la Figura 16) que reflejan amplificaciones inespecíficas en algún blanco. Una de las desventajas de la detección no específica mediante SYBR Green, se encuentra en que, en ausencia de ADN molde, se producen uniones indiscriminadas hacia cualquier estructura de doble cadena como pueden ser las que existen en los cebadores y que provocan la amplificación de dímeros de *primers*.

Las curvas de disociación de las muestras para la secuencia nativa, WT, del gen *JAK2* (gráfica D de la figura 16), la disolución de control + en color verde, muestra un pequeño pico previo, que se explica al igual que en el caso anterior porque el control + corresponde al 100% de alelo mutado y no presenta la secuencia nativa, WT.

En una muestra de las curvas de disociación para el gen *KRAS* (gráfica E de la Figura 16) se observa que el nivel de señal de fluorescencia es más bajo, pero el pico de temperatura es el mismo que las otras muestras, esto es debido a que con esta muestra hubo un problema en la dosificación de reactivos en este pocillo y es coherente con los otros resultados obtenidos de la C_p en la PCR para este pocillo. Todas las muestras se realizaron por duplicado. Se observa que los blancos no dan señal, líneas azules porque no hubo amplificación, como se esperaba.

4.2.2. Curvas de disociación para la determinación de la carga alélica en pacientes para seguimiento.

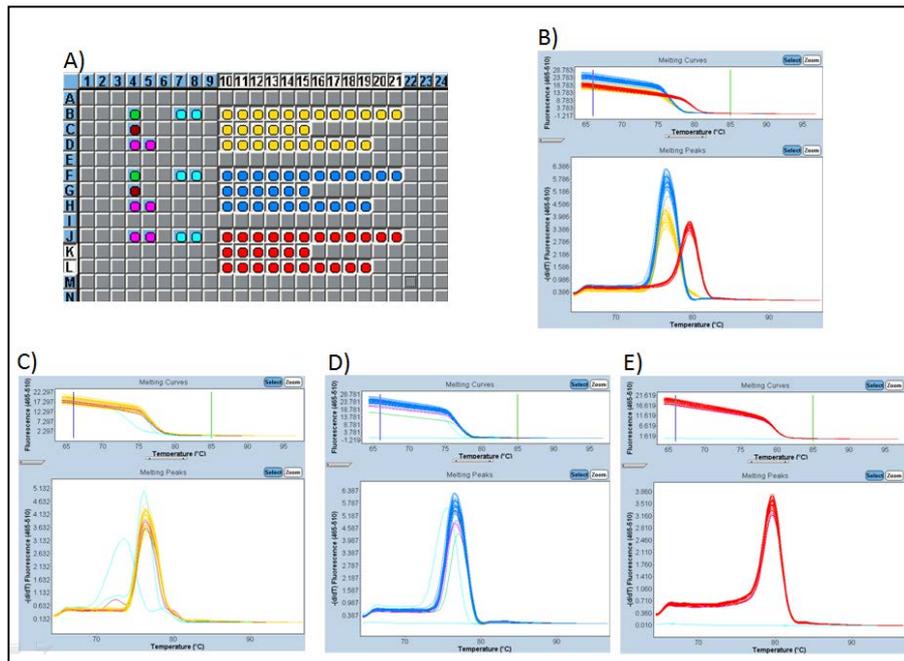


Figura 17. Curvas de disociación para el experimento 2 de la determinación de la carga alélica en pacientes para seguimiento. A) Plantilla del experimento con todas las muestras. B) Curvas de disociación para todas las muestras del experimento. C) Curvas de disociación para la mutación V617F del gen *JAK2*. D) Curvas de disociación para la secuencia nativa del gen *JAK2*. E) Curvas de disociación para el gen de referencia *KRAS*.

Las curvas de disociación del experimento 2, gráfica B de la Figura 17, al igual que sucede con los resultados del experimento 3 (gráfica B de la Figura 16), muestran que para cargas alélicas diferentes se obtienen curvas de disociación superpuestas resaltando así la especificidad de este ensayo.

En este experimento se ha producido una contaminación de los dos blancos para la detección de la mutación V617F del gen *JAK2* (líneas azules de la gráfica C de la Figura 17) y uno de los blancos de la secuencia nativa (WT) del gen *JAK2* (línea azul de la gráfica D de la Figura 17). Estos resultados son concordantes con los Cp obtenidos para estos pocillos.

4.3. Geles de agarosa

Para comprobar que la especificidad de los *primers* utilizados es la correcta se corren los productos de PCR en geles de agarosa al 2%. El tamaño del amplicón esperado es de 121 pb para el exón 14 del gen *JAK2*.

4.3.1. Gel de agarosa para la determinación de la carga alélica en pacientes en el momento del diagnóstico.

Los productos de PCR de las muestras con los *primers* específicos para detectar la mutación V617F del gen *JAK2* muestran la amplificación del amplicón esperado. Los carriles con el control negativo y uno de los blancos (3 y 4 del gel A de la Figura 18) presentan bandas tenues que reflejan contaminaciones cruzadas.

Todas las reacciones de PCR con los *primers* específicos para detectar las secuencias nativas del gen *JAK2* (carriles 2 a 14 del gel B de la Figura 18) mostraron productos de PCR con el tamaño esperado para todas las muestras. El control positivo (100% alelo mutado en el carril 2) se ha amplificado ligeramente indicando una pequeña contaminación en la reacción.

Las amplificaciones de las secuencias del gen *KRAS* (carriles 15 a 20 del gel A y 16 a 19 del gel B de la Figura 18) mostraron el amplicón esperado y el blanco no presenta contaminación. Cabe señalar que la amplificación de *KRAS* ha generado bandas de menor intensidad que para las amplificaciones de las secuencias mutadas o nativas de *JAK2* V617F. Esto es seguramente debido a que la temperatura de alineamiento de la PCR es más específica de los cebadores de *JAK2* que de los de *KRAS*.

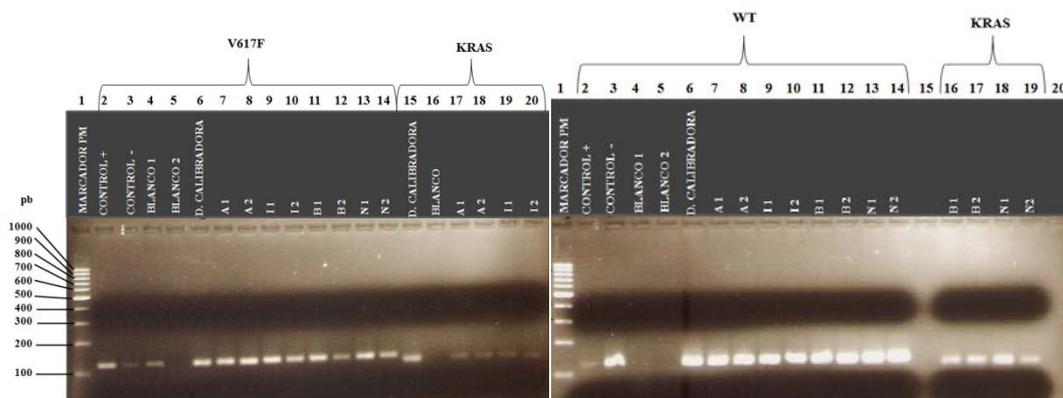


Figura 18. Gel de electroforesis al 2% de los productos de PCR obtenidos en la determinación de la carga alélica en pacientes para diagnóstico.

4.3.2. Geles de agarosa de un experimento para la determinación de la carga alélica en pacientes para seguimiento.

La amplificación de los blancos con los *primers* específicos para la detección de la mutación V617F del gen *JAK2* (carriles 5 y 6 del gel A de la Figura 19) presentan señal, tal y como se ha comprobado con el experimento de la curva de disociación (gráfica C de la Figura 17). La muestra de control - (pocillo 3) también presenta dos señales una con el tamaño del amplicón esperado y otra más débil con un tamaño menor de 100 pb. Este

resultado es coherente con el mostrado con la curva de disociación, (línea marrón en la gráfica C, de la figura 17). Todas las otras muestras (gel A de la Figura 19) presentan buena señal y el tamaño del amplicón es el esperado.

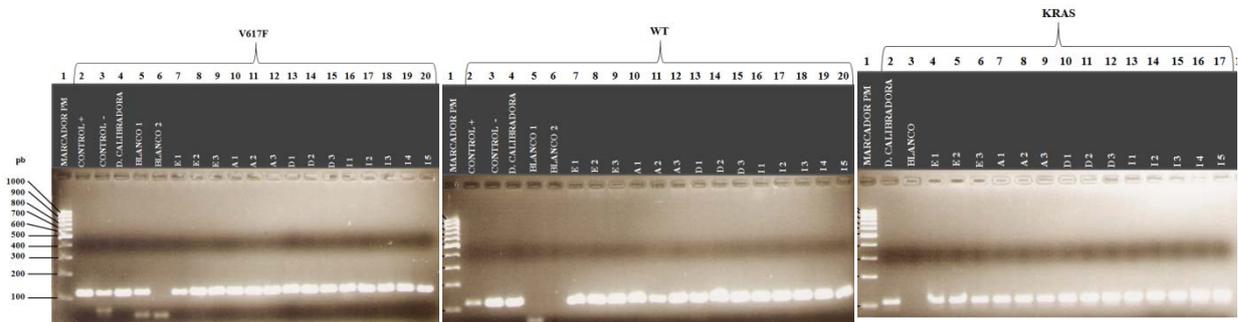


Figura 19. Gel de electroforesis al 2% de los productos de PCR obtenidos en el segundo experimento para la determinación de la carga alélica en pacientes para seguimiento.

La amplificación de uno de los blancos con los *primers* específicos de la secuencia WT del gen *JAK2* (pocillo 5 del gel B de la Figura 19) presenta señal con un amplicón de tamaño menor de 100 pb. Este resultado concuerda con la curva de disociación (gráfica D de la figura 17), la señal probablemente sea debida a dímeros de *primers*. La muestra de control + (100% alelo mutado) presenta una señal más débil (carril 2 del gel B de la Figura 19), pero el tamaño del amplicón es el esperado. Este resultado es coherente con la curva de disociación (línea de color verde en la gráfica D de la figura 17) que presenta una señal más débil de fluorescencia. Las muestras restantes presentan buena señal y el tamaño del amplicón es el esperado.

Las amplificaciones con los *primers* específicos del gen *KRAS* (gel C de la Figura 19) presentan buena señal y el tamaño del amplicón es el esperado. Los resultados obtenidos son concordantes con los obtenidos por las curvas de disociación (gráfica E de la figura 17).

4.4. Determinación de la carga alélica mediante PCR en tiempo real con *SYBR Green*

Los ensayos se han llevado a cabo mediante cuantificación relativa por PCR en tiempo real y empleando como agente reportero un intercalante fluorescente del ADN, el *SYBR Green*. A pesar de que no es un agente específico, se utiliza frecuentemente por ser más económico que el uso de sondas oligonucleotídicas marcadas. Además permite generar curvas de disociación que facilitan la evaluación posterior de la calidad de la reacción de amplificación.

4.4.1. Determinación de la carga alélica en pacientes en el momento del diagnóstico.

Se han realizado tres experimentos en diferentes periodos de tiempo. La cuantificación mediante la aplicación *software release 1.5.0 SP4* asociada al equipo *Light Cycler 480* ha permitido generar los ratios normalizados para las secuencias mutadas (V617F) o no (WT) en cada una de las muestras analizadas. A partir de estos datos se ha calculado en una hoja de cálculo Excel el valor de la carga alélica para cada muestra y para cada experimento (Tabla 16), según se indica en materiales y métodos.

Los datos de partida, que figuran en la base de datos, se habían obtenido mediante cuantificación absoluta por PCR cuantitativa en tiempo real de la fluorescencia emitida por una sonda TaqMan y empleando un *kit* comercial *JAK2 MutaQuant TM Kit* (QIAGEN).

Tabla 16. Resultados de la carga alélica de la mutación V617F del gen *JAK2* obtenidos en las experimentos realizadas y los datos de cuantificación absoluta.

CARGA ALÉLICA	MUESTRA	CUANTIFICACIÓN RELATIVA CARGA ALÉLICA (%)			CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA CARGA ALÉLICA (%)
		Experimento I	Experimento II	Experimento III	
ALTA	A1	97,90	96,61	97,07	97
	A2	88,76	85,69	85,80	81
INTERMEDIA	I1	66,23	54,59	61,69	58
	I2	48,78	42,16	43,44	41
BAJA	B1	18,00	15,03	14,97	20
	B2	4,30	6,03	4,92	5
NULA	N1	1,96	1,98	2,18	0,93
	N2	0,54	0,09	0,04	0,00

Las diferencias individuales para la carga alélica de las muestras en cada experimento con respecto a los datos de cuantificación absoluta no son muy significativas (Figura 20). La mayor diferencia es de 8 unidades en el primer experimento y se produce para valores de carga alélica intermedia. Todos los experimentos muestran pequeños errores para concentraciones bajas de carga alélica.

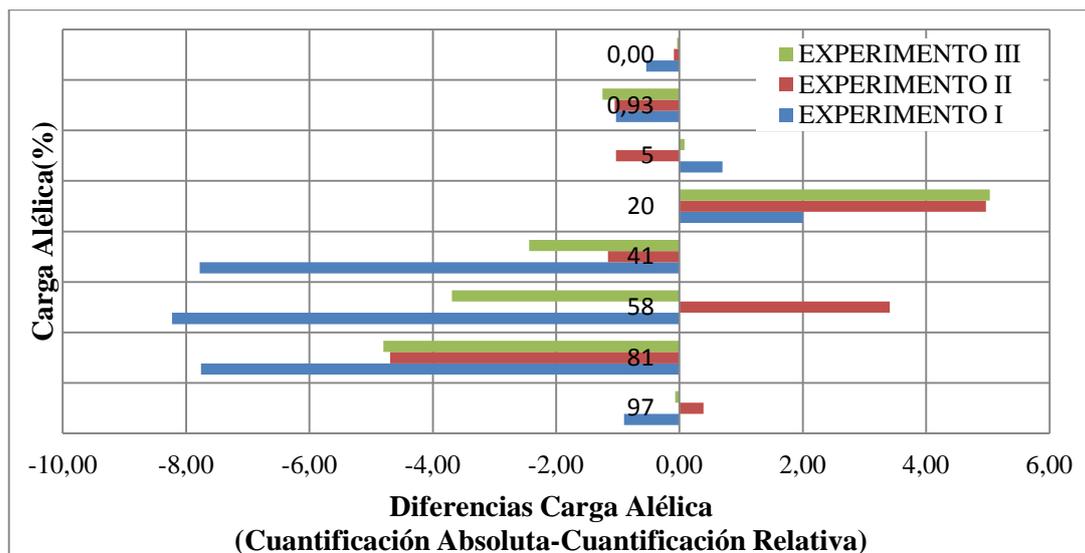


Figura 20. Diferencias en el valor de la carga alélica para cada muestra y para cada experimento en la determinación de la carga alélica en el momento del diagnóstico.

Para observar la variabilidad experimental en el uso del *SYBR Green* se ha calculado el valor promedio de carga alélica de las 3 experimentos y las diferencias a los valores máximo y mínimo para cada muestra (Tabla 17).

Tabla 17. Valor promedio de la carga alélica y variaciones máxima y mínima para cada muestra.

MUESTRA	CUANTIFICACIÓN RELATIVA CARGA ALÉLICA (%)						CUANT. ABSOLUTA CARGA ALÉLICA (%)
	Experimento I	Experimento II	Experimento III	Promedio	Variación MAX	Variación MIN	
A1	97,9	96,61	97,07	97,19	0,71	0,58	97,00
A2	88,76	85,69	85,8	86,75	2,01	1,06	81,00
I1	66,23	54,59	61,69	60,84	5,39	6,25	58,00
I2	48,78	42,16	43,44	44,79	3,99	2,63	41,00
B1	18,00	15,03	14,97	16,00	2,00	1,03	20,00
B2	4,30	6,03	4,92	5,08	0,95	0,78	5,00
N1	1,96	1,98	2,18	2,04	0,14	0,08	0,93
N2	0,54	0,09	0,04	0,22	0,32	0,18	0,00

Los valores que se han obtenido con la cuantificación relativa y la cuantificación absoluta son similares y los errores mayores se producen para valores de carga alélica intermedios. Para cargas alélicas altas y bajas, la variabilidad en la determinación de la carga alélica por cuantificación relativa es baja (Figura 21).

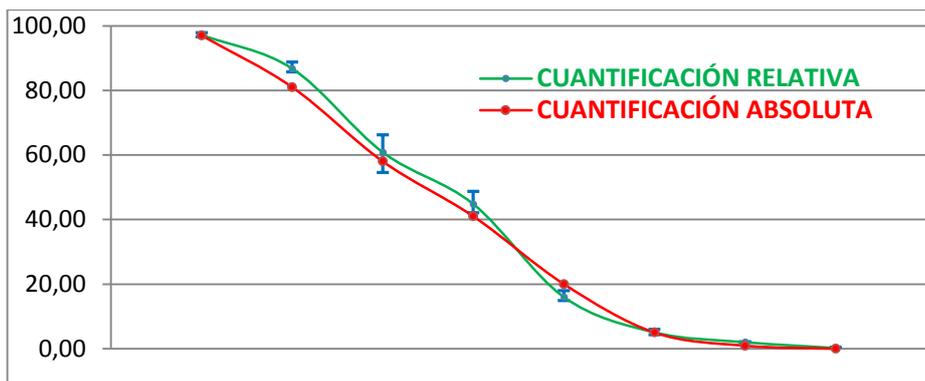


Figura 21 . Variabilidad intra experimental de la cuantificación relativa de la carga alélica en pacientes para diagnóstico.

La baja variabilidad entre los diferentes experimentos nos indica que la determinación de carga alélica por cuantificación relativa presenta una gran reproducibilidad. Por otra parte, las curvas de cuantificación relativa y absoluta son muy similares y apunta también a una alta reproducibilidad entre los dos métodos de cuantificación (Figura 21). Lo que corrobora la ecuación y el coeficiente de correlación (R^2) obtenidos para la línea de tendencia lineal que se ajusta a los datos experimentales de la cuantificación relativa y la cuantificación absoluta (Figura 22). El valor de $R^2 = 0,995$, muy próximo a 1, nos indica que la relación entre los datos de cuantificación absoluta y cuantificación relativa es máxima. Además, la recta de regresión pasa por el origen de coordenadas y su pendiente es muy cercana a 1, lo que indica que los datos de carga alélica, vengan de una cuantificación relativa o de una cuantificación absoluta, son prácticamente idénticos. Estos resultados demuestran la existencia de una gran reproducibilidad entre los 2 métodos de cuantificación.

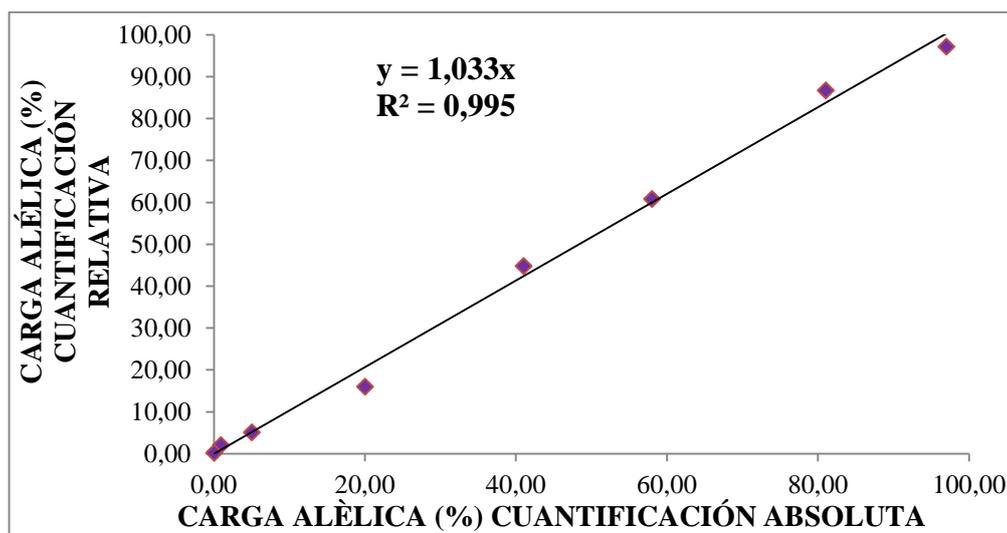


Figura 22. Variabilidad inter experimental (absoluta vs relativa) de la cuantificación de la carga alélica en pacientes al diagnóstico.

4.4.2. Determinación carga alélica en pacientes para seguimiento.

Se han calculado los valores de carga alélica para cada muestra y para cada experimento (Tabla 18).

Las diferencias son mucho más significativas que las encontradas para los experimentos de la determinación de la carga alélica al diagnóstico, la mayor es de 17 unidades en el primer experimento para la muestra I4 (73%) y se produce para valores de carga alélica intermedia. Las muestras que presentan valores altos de carga alélica (A2, A3 y D1, D2 e I5) muestran errores más pequeños (Figura23).

Tabla 18. Resultados de la carga alélica de la mutación V617F del gen *JAK2* obtenidos por cuantificación relativa y los datos de cuantificación absoluta en pacientes para seguimiento.

CARGA ALÉLICA	MUESTRA	CUANTIFICACIÓN RELATIVA CARGA ALÉLICA (%)		CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA CARGA ALÉLICA (%)
		Experimento I	Experimento II	
ESTABLE	E1	19,49	28,30	26
	E2	18,05	25,26	26
	E3	27,83	30,27	21
ASCENDIENTE	A1	54,84	61,17	44
	A2	72,38	80,81	72
	A3	92,1	93,47	92
DESCENDIENTE	D1	90,24	94,10	94
	D2	60,25	65,69	56
	D3	12,64	18,14	13
IRREGULAR	I1	39,82	51,64	41
	I2	26,29	34,60	29
	I3	22,38	20,22	9
	I4	53,66	68,21	73
	I5	86,34	89,04	81

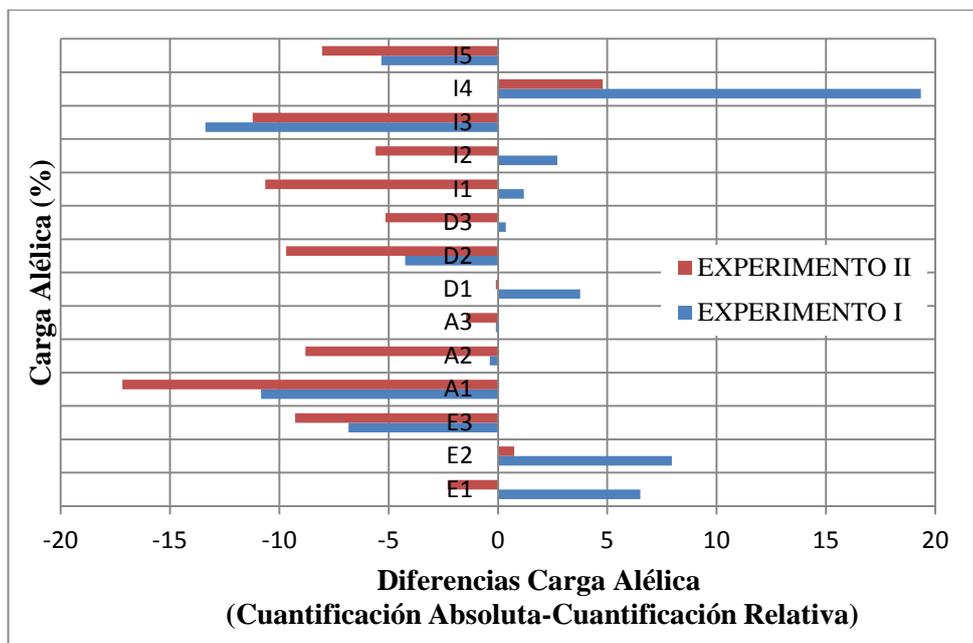


Figura 23. Diferencias en el valor de la carga alélica para cada muestra y para cada experimento en la determinación de la carga alélica en pacientes para seguimiento.

Del mismo modo que anteriormente, para observar la variabilidad experimental en el uso del *SYBR Green* se ha calculado el valor promedio de carga alélica de las 2 experimentos y las diferencias para cada muestra (Tabla 19).

Tabla 19. Valor promedio de la carga alélica y variaciones para cada muestra en las experimentos de seguimiento de carga alélica.

CARGA ALÉLICA	MUESTRA	CUANTIFICACIÓN RELATIVA CARGA ALÉLICA (%)				CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA CARGA ALÉLICA (%)
		EXPERIMENTO I	EXPERIMENTO II	Promedio	Variación	
ESTABLE	E1	19,49	28,30	23,90	4,41	26
	E2	18,05	25,26	21,66	3,61	26
	E3	27,83	30,27	29,05	1,22	21
ASCENDIENTE	A1	54,84	61,17	58,01	3,17	44
	A2	72,38	80,81	76,60	4,22	72
	A3	92,10	93,47	92,79	0,69	92
DESCENDIENTE	D1	90,24	94,10	92,17	1,93	94
	D2	60,25	65,69	62,97	2,72	56
	D3	12,64	18,14	15,39	2,75	13
IRREGULAR	I1	39,82	51,64	45,73	5,91	41
	I2	26,29	34,60	30,45	4,16	29
	I3	22,38	20,22	21,30	1,08	9
	I4	53,66	68,21	60,94	7,28	73
	I5	86,34	89,04	87,69	1,35	81

La variabilidad entre los experimentos realizados mediante cuantificación relativa es baja al igual que en los experimentos para diagnóstico. Esto nos indica que la determinación de carga alélica entre experimentos de cuantificación relativa presenta una gran reproducibilidad.

Asimismo, las curvas de cuantificación relativa y absoluta (Figura 24) son muy similares. Esta alta correlación queda demostrado con la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2) obtenidos para la línea de tendencia lineal que se ajusta a los datos experimentales de la cuantificación relativa y la cuantificación absoluta (Figura 25).

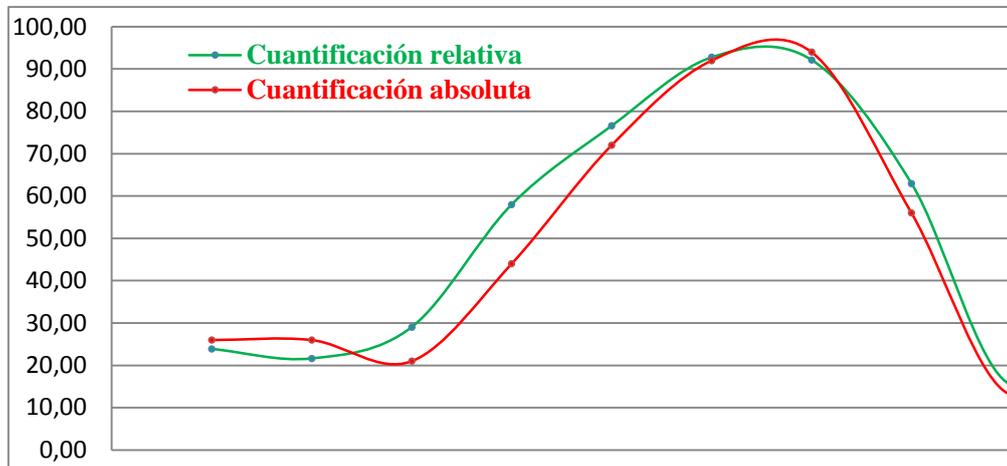


Figura 24 . Variabilidad intra experimental de la cuantificación relativa de la carga alélica en pacientes para seguimiento.

Así, el valor de $R^2 = 0,933$ y la pendiente de la recta, ambos próximos a 1, nos muestran la gran correlación lineal entre los datos de cuantificación absoluta y relativa.

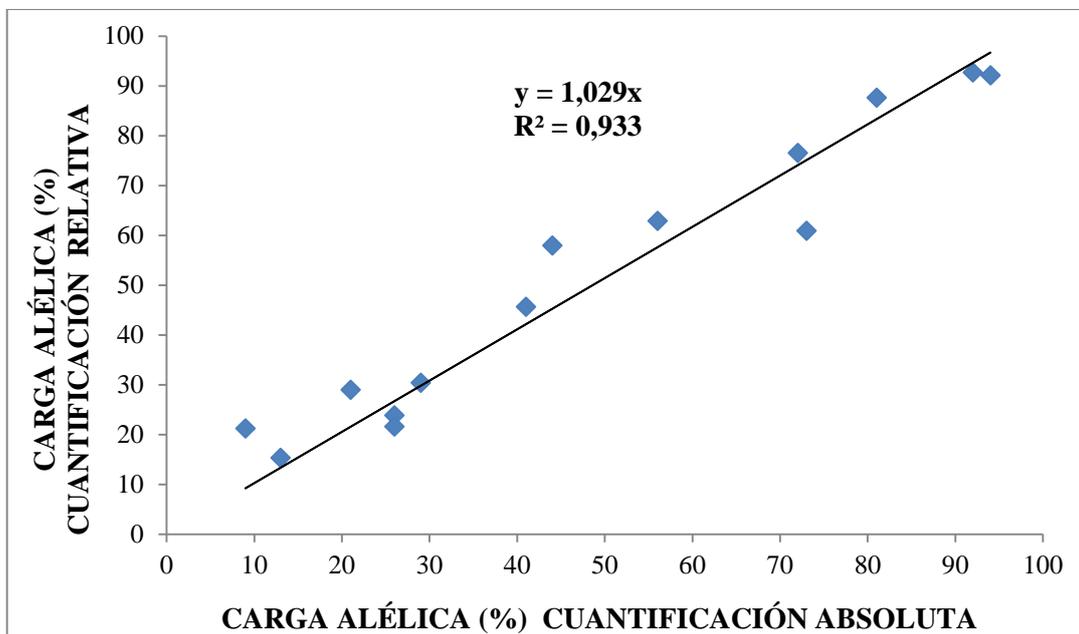


Figura 25. Variabilidad inter experimental (absoluta vs relativa) de la cuantificación de la carga alélica en pacientes para seguimiento.

5. CONCLUSIONES

El principal objetivo de este proyecto es estudiar alternativas experimentales para abaratar costes en las pruebas de diagnóstico molecular en cáncer. La prueba que se tomó como referencia para llevar a cabo el estudio ha sido la cuantificación de la mutación V617F en el gen *JAK2* mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Analizando el coste de la prueba que se tomó como referencia para llevar a cabo el estudio, cuantificación de la mutación V617F en el gen *JAK2* mediante PCR cuantitativa en tiempo real, se ha observado que la partida más costosa es la referente al uso de los reactivos en la etapa de montaje de PCR debido al coste elevado del kit comercial y a la necesidad de incluir varios controles (i.e. los estándares para establecer las rectas de calibración) en la elaboración de cada prueba. En la Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM) se suelen procesar varias muestras de pacientes en una misma placa por lo que se compensa ese coste elevado dividiéndolo entre el número de muestras clínicas procesadas. Aún así, la tarifa final de la prueba sigue siendo cara.

Se ha averiguado que el coste de la prueba alternativa propuesta, usando el kit comercial *Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science)*, de mucho menor coste, es cuatro veces menor, incluso sin la necesidad de dividir el gasto adicional debido a la inclusión de reacciones de control. Si bien se necesitan más recursos de personal y de material, por el número mayor de muestras que hay que procesar al tener que introducir muestras suplementarias para cuantificar el gen de referencia, este incremento de costes resulta insignificante frente a los costes de la prueba llevada a cabo rutinariamente en la UDM.

Por otra parte, se ha podido comprobar, mediante geles de agarosa y experimentos de curvas de disociación, que la utilización de SYBR Green en las reacciones de RT-PCR generan amplicones altamente específicos. Aunque se haya detectado alguna reacción con amplificaciones inespecíficas, debidas a ligeras contaminaciones o a la generación de dímeros de cebadores, estas no sólo han podido ser fácilmente detectadas tanto mediante curvas de fusión como por electroforesis convencional en gel de agarosa, pero además se ha podido comprobar que no afectaban la cuantificación relativa final de la carga alélica.

Asimismo, recurriendo a muestras de casos archivados en la UDM se ha podido llevar a cabo un estudio comparativo entre la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa.

De este modo hemos podido comprobar:

- Que la sensibilidad de la cuantificación relativa es comparable a la de la cuantificación absoluta ya que permite detectar la presencia de la mutación V617F en el gen *JAK2* en pacientes diagnosticados previamente por cuantificación absoluta por tener valores bajos de carga alélica.
- Que la cuantificación relativa presenta una gran reproducibilidad tanto intra-experimental como inter-experimental cuando se compara con la cuantificación.

Por lo tanto podemos concluir que, teniendo en cuenta el abaratamiento consecuente de los gastos sin menoscabo de las prestaciones de la cuantificación absoluta, se podría adoptar con total seguridad un procedimiento de qRT-PCR usando como agente reportero SYBRgreen en vez de sondas TAQman para llevar a cabo en rutina la prueba diagnóstica de detección de la mutación V617F en el gen *JAK2*.

Sin embargo cabe señalar que la UDM debe mantener el procedimiento de cuantificación absoluta debido a que el valor de la carga alélica de la mutación V617F en el gen *JAK2* todavía no tiene “accionabilidad” diagnóstica o terapéutica, de ahí que en la actualidad se siga informando a los hematólogos del número de copias de *JAK2* mutadas, valor que sólo se puede hallar mediante cuantificación absoluta.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Fenández Bayo, I., Timón, A., Méndez, T.(2005). Breve manual de oncología para informadores de la salud. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC)-Fundación para la Investigación del Cáncer. Proyecto financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Referencia: 087727CI/CCT00I-04-000I8.
2. Ayalew Tefferi, M.D. (2006). Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorder in the JAK2V617F Era. American Society of Hematology. 240-245.
3. Peter J. Campbell. (2006). The myeloproliferative disorders. The New England Journal of Medicine. 2452-2466.
4. Besses, C., Cervantes, F. (2014). Manual de Recomendaciones en Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas. GEMFIN.
5. Ayalew Tefferi, M.D., D. Gary Gilliland, M.D. (2005). The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: Status report and immediate indications for disease clasification and diagnosis. Genetics in Clinical Practice. 80: 947-958.
6. Ruiz de Adana Pérez,R. (2014). Neoplasias mieloproliferativas: aspectos básicos para el médico de familia.Recuperado el 20 de Enero de 2016 de <http://ricardoruizdeadana.blogspot.com.es/2014/09/neoplasias-mieloproliferativas-aspecto.html>
7. Levine R.L., M. Wadleigh, J. Cools, B.L. Ebert, G. Wernig, B.J. Huntly, et al., (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell. 7(4): p. 387-97.
8. Kralovics R., F. Passamonti, A.S. Buser, S.S. Teo, R. Tiedt, J.R. Passweg, et al., (2005) A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N. Engl. J. Med. 52(17): p. 1779-90.

9. Navarro Vázquez M. (2010). Marcadores moleculares de los síndromes mieloproliferativos. *Revista de Hematología*. 11(3):152-155.
10. Sun H. and N.K. Tonks, (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. **19**(11): p. 480-5.
11. Blume-Jensen P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*. **411**(6835): p. 355-65.
12. Schlessinger J., (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **103**(2): p. 211-25.
13. Robinson, D.R., Wu, Y.M. and Lin, S.F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. **19**(49): p. 5548-57.
14. Rane S.G. and Reddy, E.P. (2000), Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*,. **19**(49): p. 5662-79.
15. Yamaoka et al., (2004) The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.*, **5**(12): p. 253.
16. Roskoski R., Jr., (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**(4): p. 1155-64.
17. Rane S.G. and Reddy, E.P.,(2002) JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. **21**(21): p. 3334-58.
18. Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt. (2007) *Fundamental of Biochemistry*. Ed. Médica Panamericana.
19. Yeh T.C. and S. Pellegrini, The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(12): p. 1523-34.
20. Kerr, I.M., Costa-Pereira, A.P., Lillemeier, B.F., and Strobl, B. (2003) Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains. *FEBS Lett.*, **546**(1): p. 1-5.
21. Shuai K., et al., (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell.* **76**(5): p. 821-8.
22. Darnell J.E., et al., (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**(5164): p. 1415-21.
23. Duarte R.F. and Frank, D.A., (2000) The JAK-STAT signaling pathway and its role in oncogenesis, immunomodulation and development. *Med Clin (Barc)*. **114**(6): p. 227-34.
24. Starr R. and Hilton, D.J. (1999) Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*. **21**(1): p. 47-52.
25. Shuai K. and B. Liu, Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 900-11.
26. Sasaki A. et al., (2000) CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem*, **275**(38): p. 29338-47.lh
27. Stofega M.R., Herrington, J., Billestrup, N., and Carter-Su, C. (2000) Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. *Mol. Endocrinol*. **14**(9): p. 1338-50.
28. Oh S.T. and Gotlib, J. JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol*. **3**(3): p. 323-37.
29. Bersenev A. et al., Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J Clin Invest*. **120**(6): p. 2058-69.
30. Vannucchi A.M., Guglielmelli, P. and Tefferi, A. (2009) Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin*. **59**(3): p.171-91.
31. Macchi, P. et al., (1995) Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*. **377**(6544): p. 65-8.
32. Kaplan, M.H. and Grusby, M.J., (1998) Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules. *J Leukoc Biol*. **64**(1): p. 2-5.
33. Baxter E.J. et al., (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. **365**(9464): p. 1054-61.

34. James C. et al., (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. **434**(7037): p. 1144-8.
35. Kilpivaara O. and Levine, R.L., (2008) JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia*. **22**(10): p. 1813-7.
36. Scott L.M. et al., (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. **356**(5): p. 459-68.
37. Scott L.M. et al., (2007) Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera. *Br J Haematol*. **139**(3): p. 511-2.
38. Pietra D. et al., (2008) Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. **111**(3): p. 1686-9.
39. Pardanani A., Lasho, T.L., Finke, C., Hanson C.A., and Tefferi, A. (2007) Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F negative polycythemia vera. *Leukemia*. **21**(9): p. 1960-3.
40. Butcher C.M. et al., (2008) Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia*. **22**(4): p. 870-3.
41. Tefferi A. et al., (2007) Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. **110**(4): p. 1092-7.
42. Passamonti F. et al., (2010) A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. **115**(9): p. 1703-8.
43. Gladys Pinilla B., Karen Cubillos, Mónica Rodríguez. (2008) Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Ciencias Biomédicas*.. p. 65-75.
44. Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*. p. 70-78.
45. Puig-Junoy J., Ortún-Rubio V. y Pinto-Prades J.L. (2001) Los costes en la evaluación económica de tecnologías sanitarias. *Atención Primaria*. Vol. 27:186-189.