

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN V617F DEL GEN JAK2 EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS (SMPC)

L. Zamora^a, M. Cabezón^a, I. Granada^a, N. Ruiz Xiville^a, J. Grau^a, B. Xicoy^b, A. Flores^b, S. Vives^{a,b}, A. Serrano^{a,b}, T. Navarro^a, J.M. Ribera^b, F. Millá^a y E. Feliu^{a,b}

Unitat de Biologia Molecular. Unitat de Citogenètica. ^aServei Laboratori d'Hematologia.

^bServei d'Hematologia Clínica. ICO – Hospital Universitari. Germans Trias i Pujol. Badalona.

Introducción: En el 2005 diferentes grupos identificaron una mutación en el gen de la tirosin cinasa JAK2 V617F (G #fderecha T) que ha resultado ser la alteración molecular más frecuente en los SMPC. Esta mutación confiere una ventaja proliferativa a los precursores hemopoyéticos que serán hipersensibles a citoquinas. Algunos autores incluso han descrito implicaciones clínicas en pacientes portadores de esta mutación. El método clásico para la detección de dicha mutación es la secuenciación, que permite distinguir entre mutaciones homocigotas de heterocigotas.

Objetivos: Estandarizar una técnica que permita identificar la mutación de JAK2, y de igual modo discriminar su zigosis, de forma más rápida y sencilla que otros métodos ya existentes.

Material y métodos: Se ha analizado sangre periférica de 50 pacientes ya diagnosticados o con sospecha de SMPC Ph-. La extracción del ADN presente en la muestra se ha realizado mediante digestión con proteinasa K y posterior purificación con columnas de afinidad (QIAmp DNA Blood Mini Kit, Qiagen). Se han realizado dos metodologías para detectar la mutación: 1) Secuenciación directa, 2) Discriminación alélica (TaqMan[®] ABI Prism 7000) con un par de primers y dos sondas TaqMan[®] marcadas con diferentes fluoróforos (una de ellas complementaria al alelo wild-type y la otra al mutado). Según las fluorescencias detectadas podremos discriminar si está presente o no la mutación. La sensibilidad de las dos técnicas se ha analizado utilizando un banco de diluciones seriadas de ADN genómico de un paciente homocigoto para la mutación de JAK2 V617F en ADN normal.

Resultados: Habiendo analizado la sangre periférica de los 50 pacientes con las dos tecnologías, los resultados han sido coincidentes en el 84% de los casos: a) Todos los pacientes con mutación homocigota se han detectado por las dos metodologías, b) Aquellos pacientes con una heterocigosidad de la mutación inferior al 50% sólo se han podido detectar por discriminación alélica y no por secuenciación directa. Mediante la técnica de discriminación alélica, 26 de los 50 pacientes presentaban la mutación JAK2 V617F (11 homocigotos y 15 heterocigotos). Con el banco de diluciones hemos establecido que la técnica de discriminación alélica es capaz de detectar una mutación heterocigota presente en el 10% de las células mientras que por secuenciación directa este porcentaje asciende al 50%.

Comentarios: Estos datos indican que la mutación de JAK2 V617F puede ser detectada eficazmente mediante discriminación alélica (genotipado de SNP). Se trata pues, de una técnica de gran utilidad como test diagnóstico en laboratorios de rutina por ser más sencilla, rápida y sensible que las técnicas clásicas de secuenciación.

Agradecimientos: Fundació Internacional José Carreras (FIJC-P-EF-03), Red C03/010 y Red G03/008.