

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP70 MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO Y PCR CUANTITATIVA (QPCR) : CORRELACIÓN CON EL ESTADO MUTACIONAL EN LLC-B

Reinoso-Martin C^a, Jantus-Lewintre E^a, García-Ballesteros C^b, Mayans-Ferrer JR^b y García-Conde J^{a,c}

^a Laboratorio de Hematología Molecular, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia. ^b Servicio de Hematología, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia. ^c Facultad de Medicina, Universidad de Valencia

Introducción: ZAP70 es una proteína utilizada como marcador pronóstico potencial en LLC. Es una quinasa de la familia src, importante para la transducción de señales en linfocitos T y NKs, pero ausente en linfocitos B normales, que se expresa en las células de LLC con IgV_H no mutado. La detección de ZAP70 por citometría de flujo toma relevancia dado que podría convertirse en un marcador subrogante del análisis mutacional de los genes IgV_H al proveer información pronóstica rápida y a bajo costo, que ser asumido por un laboratorio de hematología. Sin embargo existen entre un 20% y 30% de discordancias entre la expresión de ZAP70 y el estado mutacional de IgV_H. Otra posible alternativa para la detección de la expresión de ZAP70 es mediante PCR cuantitativa (qPCR), para lo que se sintetizó cDNA a partir de RNA.

Método: Para este estudio se recogieron muestras de sangre de 38 pacientes diagnosticados de LLC-B, en estadio A de Binet, no tratados. A partir de las muestras de sangre se obtuvieron células mononucleadas (PBMC) por gradiente de centrifugación en Ficoll-Hypaque y se seleccionaron células B mediante bolas inmunomagnéticas. Se usó como gen control endógeno GUS. Los niveles de expresión de ZAP70 se determinaron usando: TaqMan® Gene Expression Assay (AB): (Hs00277148_m1), cDNA proveniente de 10 ng de RNA y TaqMan® Universal Master Mix, en un vf de 20ml, en un termociclador Light Cycler® 480 (Roche). Para cuantificar los niveles de expresión se realizó una curva estándar relativa, usando diluciones seriadas de un pool de muestras usando como calibrador cDNA de una línea celular (Jurkat). Posteriormente los valores se normalizaron respecto al control endógeno. La cuantificación de ZAP70 se determinó por citometría de flujo según protocolo de Crespo y col. Se determinó el estado mutacional en todos los pacientes de los genes IgV_H, (30 muestras mutadas y 8 no mutadas). Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de ZAP70 en cada muestra, definiéndose como ZAP70+, aquellas con expresión > 20% y negativas el resto.

Resultados: En general los resultados obtenidos por citometría de flujo concuerdan con el estado mutacional de los pacientes, salvo 4 casos discordantes que tienen expresión + de ZAP70, siendo mutados. Al analizar la expresión de ZAP70 mediante qPCR, observamos concordancia con el estado mutacional similar a la determinada por citometría de flujo. Así todos los no mutados dan valores superiores en cuanto a expresión respecto a los mutados, habiendo solamente 3 discordancias en el grupo de los mutados, que dan valores de expresión alta, uno de ellos coincidente con los resultados de citometría de flujo que presentaba expresión de ZAP70 de 62.6%.

Conclusión: Podemos concluir que la qPCR es una herramienta muy útil para la determinación de la expresión de ZAP70, alternativa a la determinación por citometría de flujo, que concuerda bien con ésta última e incluso mejor con el estado mutacional de los pacientes en LLC-B.