

## DETERMINACIÓN DE ZAP-70 POR RT-Q-PCR EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

García Ballesteros C<sup>a</sup>, Amigo García V<sup>a</sup>, Benet Campos C<sup>a</sup>, Enguñdanos Hernandorena C<sup>a</sup>, Somoza Goyanes R<sup>a</sup>, Jantus Lewintre E<sup>b</sup>, García-Conde J<sup>b</sup>, Mayans Ferrer JR<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Servicio de Hematología, Hospital Arnau de Vilanova (Valencia). <sup>b</sup>Laboratorio de Hematología Molecular, Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia).

**Introducción:** El estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub> es un factor pronóstico adverso independiente que nos puede ayudar a clasificar a los pacientes de LLC. Los perfiles de expresión génica muestran diferencias en unos pocos genes entre los casos con presencia o ausencia de mutaciones. Uno de estos genes codifica para ZAP-70, una tirosín-cinasa asociada al receptor de la célula T que se expresa selectivamente en los linfocitos T y células NK y en los linfocitos B de las LLC con ausencia de mutaciones en IgV<sub>H</sub>. El análisis de la proteína ZAP-70 por citometría se ha correlacionado con el estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub>, sin embargo, existen casos discrepantes entre ambas determinaciones. La posibilidad de analizar el ARN mensajero del gen ZAP-70 puede ofrecernos un método rápido y muy sensible para poder determinar de modo indirecto el estado mutacional de los pacientes diagnosticados LLC.

**Objetivo:** El objetivo de nuestro trabajo consiste en validar el análisis del ARN del gen ZAP-70 como método de clasificación y correlacionarlo con otros factores pronóstico como las alteraciones citogenéticas o CD38.

**Método:** Para ello se ha seleccionado una serie de 39 pacientes diagnosticados de LLC estadio A de Binet. En todos los casos, se ha determinado el estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub> por secuenciación directa del ADN usando el protocolo estandarizado del proyecto BIOMED-2 y la expresión de la proteína ZAP-70 por citometría de flujo. Asimismo, de todos los pacientes se ha realizado la determinación de CD38 y la presencia de alteraciones citogenéticas mediante hibridación *in situ* fluorescente para la región crítica del brazo largo del cromosoma 13 (13q14), la presencia de trisomía 12, y la detección de las deleciones de las regiones 17p13 y 11q22.3.

El análisis del ARN requiere de una selección celular previa de linfocitos B mediante separación inmunomagnética. Para determinar la pureza de esta selección, se realiza un marcaje con anticuerpos para CD20, CD57, CD45 y CD3. El análisis de la expresión de ZAP-70 se realiza mediante la técnica del delta Ct comparado con el control endógeno 18s (DCt = Ct zap70 – Ct 18s).

**Resultado:** El análisis previo de los resultados demuestra que 12 de 39 pacientes (30,8%) son ZAP-70 positivo por citometría. De éstos, 8 (61,5%) no presentan mutaciones en el gen IgV<sub>H</sub>, mientras que 4 de ellos están mutados.

**Conclusiones:** En el análisis por RT-PCR cuantitativa se excluyeron los 4 casos discordantes. La media del DCt de los casos con mutaciones en IgV<sub>H</sub> es significativamente mayor que la media de DCt de los casos sin mutaciones, pudiendo establecer un valor de DCt que permite discriminar los casos positivos de los negativos. El cálculo de este DCt corte está siendo validado en una serie independiente de casos de LLC. Únicamente un paciente presentó deleción de 17p13, asociado a expresión de ZAP70 y ausencia de mutaciones. Todos los pacientes con alteraciones citogenéticas de buen pronóstico (del 13q14) presentaron mutaciones en IgV<sub>H</sub>.