

CUANTIFICACIÓN DE CARGA ALÉLICA DE LA MUTACIÓN JAK2V617F EN PACIENTES CON ENFERMEDAD MIELOPROLIFERATIVA CRÓNICA FILADELFIA NEGATIVA. METODOLOGÍA Y RESULTADOS PRELIMINARES

M.C. Alonso^a, L. Hernández-Nieto^b, B.J. González-González^b, J.M. Raya^b, M.J. Rodríguez-Salazar^b, R. Rodríguez-Sánchez^b, M.T. Hernández-García^b, E. Salido^a

^aUnidad Mixta de Investigación y ^bServicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Canarias. Universidad de la Laguna. Tenerife

Introducción: La tirosincinasa citoplasmática *JAK2*, es fundamental en la regulación celular inducida tras activación de receptores de citoquinas. En enfermedades mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas, se ha demostrado un papel patogenético clave de la mutación somática adquirida en el exón 14 del gen *JAK2* (*JAK2*^{V617F}) que contribuye al fenotipo de la enfermedad. Recientemente se ha demostrado un efecto de dosis del alelo mutado *JAK2*^{V617F}, con homocigosis generalmente asociada a Policitemia Vera (PV), y con menor frecuencia a Trombocitemia esencial (TE) y Mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM).

Material y métodos: Los niveles de expresión de *JAK2*^{V617F} se correlacionan con la ratio entre alelos mutantes y *wild-type* determinada en el ADN, por lo que hemos desarrollado un método de obtención de ratios alélicas en pacientes previamente genotipados como heterocigotos portadores de la mutación. La dosis de cada alelo se determina por análisis de regresión. Se extrajo el ADN genómico de granulocitos aislados de sangre periférica procedente de cada paciente. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *JAK2*, se amplificó un fragmento de 289 pares de bases en torno a la mutación V617F. El producto se clonó en el vector de alto número de copias *pGEM®-T Easy Vector II*, según las indicaciones del fabricante (Promega). Este constructo se transfeció en las células competentes JM 109. La selección de los transformantes con el fragmento de interés se realizó sobre placas con LB / ampicilina / IPTG / X-Gal. La confirmación de los alelos *wild-type* y mutante en los productos de transfección se realizó por secuenciación y técnica de PCR-RFLP (*restriction fragment long polymorphism*) específica. Con este método se tiene una estimación de la frecuencia de la mutación mediante análisis de imagen de geles de ADN usando una curva estándar generada a partir de alelos clonados en plásmido que se mezclan en proporciones conocidas. Hemos empleado esta técnica en un estudio piloto sobre 8 pacientes con EMPC Phi-.

Resultados: Con esta metodología hemos logrado cuantificar las ratios alélicas de 8 pacientes heterocigotos para la mutación, encontrándose en rangos del 8-35% hasta el momento. Hemos observado los porcentajes más altos de alelos *JAK2*^{V617F} en pacientes con PV (media 72%), y los más bajos en TE (media 22 %). La MMM mostró valores intermedios (36%).

Conclusiones: Hemos llevado a cabo en un grupo de pacientes con EMPC Phi (-) un método de genotipado desarrollado en nuestro laboratorio para cuantificación alélica de la mutación V619F de *JAK2* mediante PCR-RFLP, cuya metodología se documenta, que aunque algo más laborioso que la RT-PCR, puede considerarse útil, sencillo y específico (al tratarse de un método enzimático) y recomendable para dicha cuantificación, lo que permitirá mayor información clínica en estos pacientes.