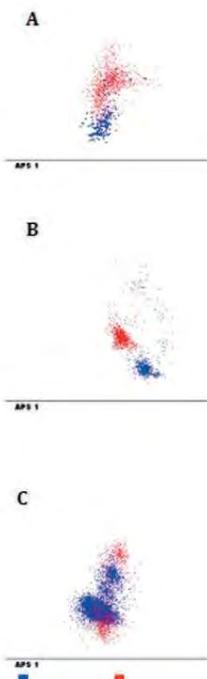


evolución post-tratamiento mediante los Softwares FACSDiva (Becton-Dickinson, USA) e Infinicyt (Cytognos, Spain). El análisis estadístico de las variables clínico-biológicas y análisis de supervivencia se realizó mediante software SPSS v.10.

Resultados: Para la serie global, las variables clínicas al diagnóstico: insuficiencia renal y Hb<8 g/dL se correlacionaron de manera estadísticamente significativa con >riesgo de éxitus en el caso de la primera ($P<0.04$) y >riesgo de progresión en la segunda ($p<0.03$). La ausencia de expresión del marcador CD56 al diagnóstico, se correlacionó con >tasa de progresión y éxitus, ($P<0.02$ y $P<0.001$), así como CD117- al diagnóstico influyó negativamente en la progresión ($P<0.037$). En la re-evaluación post-tratamiento, un 65.8% (N=27) de los pacientes presentaban aún CP patológicas (CP-M), enfermedad mínima residual (EMR) (+) con una mediana de 71% de CP-M. De ellos, 23 pacientes (85.2%) sufrían cambios en la intensidad de expresión en los marcadores antigénicos en CP-M. Así, 34.8% (N=8) cambian un marcador, 34.8% (N=8) dos, 21.7% (N=5) tres y 8.7% (N=2) más de tres. CD27 y CD117 fueron los marcadores que más cambios presentaron, en un 22.9%, CD81 en un 20.8%, CD45 18.75%, CD56 10.4% y CD 19 4.1%. Mediante el Automatic Population Separator (APS) de Infinicyt, comparando las muestras diagnóstico-recadaída, se evidencian 3 patrones en la evolución fenotípica post tratamiento que se muestran en la *Figura 1*.

Conclusión: El tratamiento de primera línea en pacientes afectados de MM induce RC en un notable porcentaje de pacientes. Sin embargo, los pacientes con EMR (+) presentan un alto porcentaje de casos (85.2%) modificaciones en el fenotipo de las CP-M con aparición de subclones o incluso clones fenotípicamente distintos a los del diagnóstico. El mejor conocimiento de la selección-evolución clonal de las CP-M permitiría diseñar tratamiento dirigidos de segunda línea.



Gráfica APS evolución clonal de células plasmáticas patológicas, comparando el diagnóstico y recaída/progresión. A- Persistencia de clon principal con mínimos cambios. B- Aparición de un clon fenotípicamente distinto y C- Persistencia clon principal y aparición de subclon.

Figura 1.

CO-091

UTILIDAD DE CINCO TEJIDOS PARA DISCRIMINAR VARIANTES SOMÁTICAS Y GERMINALES EN NEOPLASIAS MIELOIDES

Aguilera-Díaz A¹, Palomino-Echeverría S², Vázquez I², Ariceta B², Mañú A², Blasco-Iturri Z², Larrayoz MJ², Del Castillo TB³, Olivares-Salaverri M⁴, Olave M⁵, Riego V⁶, Rifón-Roca J⁶, Alfonso-Pierola A⁶, Prosper F⁶, Fernández-Mercado M², Calazanz MJ²

¹Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra; ²CIMA LAB Diagnostics, Universidad de Navarra; ³Hospital Universitario Central de Asturias; ⁴Hospital Universitario de Galdakao; ⁵Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa; ⁶Clínica Universidad de Navarra (CUN)

Introducción: Los síndromes hereditarios están adquiriendo una gran importancia en el panorama de las hemopatías malignas. De hecho, la revisión de 2016 de la OMS ha incluido una sección sobre predisposición germinal a neoplasias mieloides (NM). Distinguir entre una neoplasia mieloides de predisposición hereditaria (NMPH) de una NM esporádica es crucial por su impacto en el seguimiento de estos pacientes, así como en el de sus familiares sanos. La generalización de técnicas como la NGS en el estudio inicial de pacientes con NM ha puesto de manifiesto que un porcentaje no desdeñable de pacientes podrían tener variantes de origen germinal. Sin embargo, para su diagnóstico, se precisa de la confirmación de la naturaleza de la variante en un tejido no hematopoyético, sin que exista un consenso sobre el tejido a utilizar.

Métodos: Nos propusimos evaluar cinco tejidos (fibroblastos de médula ósea, fibroblastos de piel, folículos pilosos, frotis bucal y células CD3⁺) en cuanto a su capacidad de discriminar si las variantes sospechosas eran de origen somático o germinal. El estudio se realizó en una cohorte de 299 pacientes a los que en algún momento del curso de la enfermedad se les hizo un panel de NGS Pan-Mieloides (PMP, 48 genes), que incluye 22 genes descritos en la literatura como relacionados con NMPH, incluyendo los recomendados por la OMS (*ANKRD26*, *CEBPA*, *DDX41*, *ETV6*, *GATA2*, *RUNX1*). De los 299 pacientes, 100 portaban variantes en algunos de esos 22 genes, que presentaban una frecuencia alélica (VAF) ~ 50%. Recolectamos un total de 21 muestras de tejidos pertenecientes a 8 pacientes (edad 27-77 años) con variantes sospechosas de NMPH (Figura1). Tras el procesamiento de cada tejido, el ADN fue extraído y cuanti-cualificado antes de ser sometido a secuenciación.

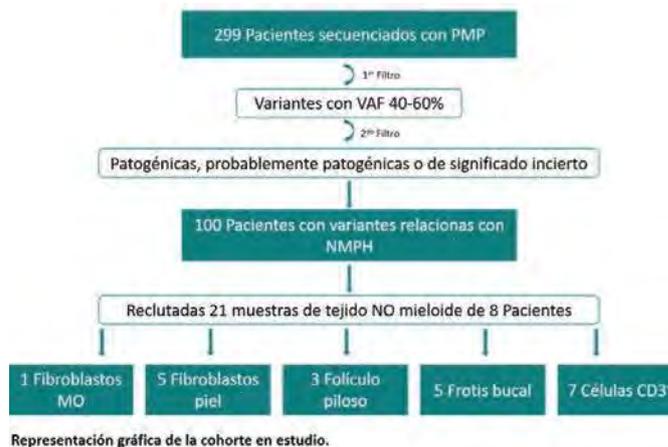


Figura 1.

Resultados: De las 21 muestras recogidas, 5 no pasaron el QC; las 16 restantes fueron secuenciadas con el PMP (Tabla 1). Diez variantes fueron sospechosas de ser germinales, en los genes *ASXL1* (2), *DDX41* (1), *GATA2* (1), *IKZF1* (1), *NF1* (3), *SH2B3* (1), *TET2* (1) (Tabla 2). De ellas, 8 fueron detectadas también en los tejidos no mieloides. De entre estas 8 variantes germinales, 3 confieren predisposición a desarrollar NMPH (Tabla 2). En una muestra de frotis bucal (caso 3) se detectaron 2 variantes (*ASXL1*-p.Arg693*, *PHF6*-p.Thr179Asnfs*11) con VAF~50% no presentes en el análisis de los otros tejidos. Este resultado indica que la muestra estaba contaminada por células tumorales, lo que impidió aclarar el origen de estas 2 variantes con este tejido. Otras 4 variantes con-

firmadas como somáticas (casos 3 y 7) presentaron VAF~1-9% en muestras de frotis bucal y células CD3+, aunque esta baja VAF no generó dudas sobre su origen.

Conclusiones: En nuestra cohorte, pudimos confirmar que 7 de 8 pacientes portaban alguna variante germinal, y de ellas 3 confieren predisposición a desarrollar NMPH, lo que apoya las recomendaciones de la OMS 2016 de la necesidad de determinar la naturaleza de las variantes sospechosas de ser germinales. Tres de los 5 tejidos analizados fueron útiles para averiguar la naturaleza de las variantes: fibroblastos de piel, células CD3+, y foliculos pilosos. El correcto diagnóstico de estos síndromes familiares, debido a su importancia tanto para el paciente como para su familia, precisa de la estandarización de los protocolos, incluyendo el tejido de análisis.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto DIANA, 0011-1411-2017-000028, P116/00159, P117/00701 y AIO2014.

Tabla 1.

Datos de QC de todas las muestras analizadas. Se recogió al menos un tejido de estirpe no mieloides de los 8 pacientes.

Caso	Diagnóstico	Tejido	Cantidad ADN (DIN)	Cantidad ADN (ng)	Secuenciado con PMP
1	SMD alto riesgo	MO Diagnóstico	8,6	21500	SI
		Fibroblastos de piel	8,9	3250	SI
		Células CD3+	6,2	695	SI
		Frotis Bucal	No DIN	Muy bajo	NO
7	SMD-EB2	Foliculo piloso	6,4	71,1	SI
		MO Recidiva	8,7	6000	SI
		Fibroblastos de piel	No DIN	150	SI
		Fibroblastos de piel	7,6	7950	SI
3	SMD	Fibroblastos de piel	8	492,5	SI
		Frotis Bucal	5,4	1000	SI
		Células CD3+	8,3	327,5	SI
		Foliculo piloso	4,2	90	SI
4	SMD	MO Diagnóstico	7,2	3950	SI
		Células CD3+	7,7	3800	SI
5	LMA	MO Diagnóstico	9	7750	SI
		Células CD3+	9	377,5	SI
		Foliculo Piloso	1,21	168	NO
		Frotis Bucal	0,62	Muy bajo	NO
6	LMA	Fibroblastos MO	No DIN	150	NO
		MO Diagnóstico	8,1	9400	SI
		Células CD3+	8,4	184	SI
		Foliculo Piloso	7,3	411	SI
7	LMA	Frotis Bucal	5,1	252,5	SI
		MO Diagnóstico	9,2	6650	SI
		Frotis Bucal	6,4	1112,5	SI
		Células CD3+	7,6	290	SI
8	LMA	Foliculo Piloso	1,4	10,8	NO
		MO Diagnóstico	8,5	8650	SI
		Células CD3+	9,2	5050	SI
		Células CD3+	9,2	5050	SI

MO= médula ósea; SMD= Síndrome Mielodisplásico; LMA= Leucemia Mielode Aguda

Tabla 2.

Descripción de las variantes informadas de los 8 pacientes y determinación de su naturaleza como somáticas o germinales. Las variantes sospechosas de ser germinales se resaltan en gris. Las variantes somáticas detectables en alguno de los tejidos no mieloides incluidos en el estudio se resaltan en azul.

Caso	Gen	Variantes	Categorización	MO (VAF)	Fb. Piel (VAF)	SI. Píloso (VAF)	F. Bucal (VAF)	CD3+ (VAF)	Naturaleza
1	DNMT3A	p.Arg1462Gln>C2	Patogénica	44%	45%	47%	ND	44%	Germlinal
		p.Arg225His	Patogénica	5%	0%	0%	ND	0%	Somática
		p.Cys1378Tyr	Patogénica	48%	0%	ND	ND	ND	Somática
		p.Pro95Arg	Patogénica	49%	0%	ND	ND	ND	Somática
7	DNMT3A	p.Ala122Ser	Probablemente Patogénica	46%	0%	ND	ND	ND	Somática
		p.Gly647Gly>T2	Probablemente Patogénica	38%	0%	ND	ND	ND	Somática
		p.Gly967Gly	Probablemente Patogénica	43%	45%	ND	ND	ND	Germlinal
		p.Phe173Cys	Significado incierto	48%	0%	ND	ND	ND	Somática
5	DNMT3A	p.Arg691*	Patogénica	48%	0%	0%	3%	5%	Somática
		p.Arg740His	Patogénica	3%	0%	0%	3%	0%	Somática
		p.Thr179Asn>I1	Probablemente Patogénica	86%	0%	0%	84%	0%	Somática
		p.Ser684Asn	Significado incierto	50%	50%	45%	50%	52%	Germlinal
4	DNMT3A	p.Pro124His	Significado incierto	48%	47%	49%	47%	30%	Germlinal
		p.Ala155Ser	Probablemente Patogénica	25%	0%	0%	3%	0%	Somática
		p.Arg265Gln	Significado incierto	49%	ND	ND	ND	49%	Germlinal
		p.Lys705Glu	Patogénica	6%	ND	ND	ND	0%	Somática
6	DNMT3A	p.Ala628_Arg131del	Significado incierto	5%	ND	ND	ND	0%	Somática
		p.Met92del	Patogénica	45%	ND	ND	ND	44%	Germlinal
		p.Arg595_Lys601del	Patogénica	40%	ND	ND	ND	0%	Somática
		p.Gly120Glu	Significado incierto	50%	ND	40%	35%	41%	Germlinal
3	DNMT3A	p.Pro95_Arg103del	Patogénica	47%	ND	0%	0%	0%	Somática
		p.Arg132His	Patogénica	45%	ND	0%	0%	0%	Somática
		p.Tyr288>Cys>T2	Patogénica	33%	ND	0%	0%	0%	Somática
		p.Arg248Tyr	Significado incierto	47%	ND	ND	49%	30%	Germlinal
8	DNMT3A	p.Arg248Tyr	Patogénica	7%	ND	ND	2%	2%	Somática
		p.Glu1907>Val>I4	Significado incierto	5%	ND	ND	0%	0%	Somática
		p.Lys705Glu	Patogénica	42%	ND	ND	ND	0%	Somática
		p.Ala138Tyr	Patogénica	42%	ND	ND	ND	0%	Somática
7	DNMT3A	p.Cys129W	Patogénica	12%	ND	ND	ND	0%	Somática
		p.Ala272Ile	Patogénica	7%	ND	ND	ND	0%	Somática
		p.Gln1Arg	Patogénica	1%	ND	ND	ND	0%	Somática
		p.Lys236Asp>T2	Significado incierto	43%	ND	ND	ND	0%	Somática

MO= Médula ósea; VAF= Frecuencia alélica de la variante; Fb= Fibroblasto; Ff= Foliculo; Fr= Frotis; ND= No hay datos

LABORATORIO BÁSICO Y BIOLOGÍA HEMATOLÓGICA II

CO-092

DETECCIÓN RÁPIDA DEL TRANSCRITO PML-RARA DIRECTAMENTE EN RNA EN UN SOLO PASO MEDIANTE RETRO-TRANSCRIPTION LOOP MEDIATED AMPLIFICATION (RT-Q-LAMP)

Sargas C, Jiménez O, Lopez P, Alfonso V, Minnucci G, Amicarelli G, Barragán E

Centros de Trabajo de los autores: Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, Spain; Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, Spain; Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, Spain; DiaSorin SpA, Gerenzano (VA), Italy; DiaSorin SpA, Gerenzano (VA), Italy; DiaSorin SpA, Gerenzano (VA), Italy; Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia, Spain

Introducción: La determinación dirigida del transcrito de fusión PML-RARA es obligatoria para confirmar de la sospecha morfológica de leucemia promielocítica aguda (LPA) y la administración de la terapia adecuada a fin de reducir el riesgo de complicaciones hemorrágicas. El diagnóstico de LPA se realiza por estudio citomorfológico mediante la presencia de la translocación t(15;17) y del reordenamiento PML-RARA a través de RT-PCR. El ensayo provee resultados en 3-6 horas y puede estar afectado por la mala calidad o cantidad insuficiente de ARN, retrasando el correcto diagnóstico. El objetivo del estudio fue evaluar un nuevo método para el diagnóstico molecular de la LPA, ultra rápido, específico y robusto incluso para muestras no-óptimas de ARN: RT-Q-LAMP (Iam PML-RARA DiaSorin).

Métodos: El ensayo PML-RARA se basa en un método innovador, isoterma para la amplificación directa, sensible y específica, de muestras de ARN. Consiste en dos ensayos multiplex fluorescentes: el primero específico para los transcritos del gen de fusión PML-RARA del tipo bcr1 y bcr3 y uno para para el transcrito menos frecuente bcr2. La mezcla de reactivos contiene también cebadores adicionales para la detección del gen GUSb como control interno. La reacción se realizó en 40 minutos, con la amplificación de las muestras positivas en aproximadamente 15 minutos, en el Liaison IAM instrument (DiaSorin) a una temperatura constante, y con una monitorización constante de la fluorescencia. Los datos obtenidos fueron elaborados directamente por el software de análisis, que permitió la discriminación de los diferentes transcritos. Se analizaron 500 ng de ARN de 19 muestras y los resultados se compararon con los resultados previamente obtenidos por RT-PCR.

Tabla 1. Características biológicas y moleculares de los pacientes analizados para el gen de fusión PML-RARA.

Muestra	Tipo de muestra	Resultado esperado	Resultado Q-LAMP
1	MO	bcr2	bcr2
2	MO	bcr2	bcr2
3	MO	bcr2	bcr2
4	MO	Negativo	Negativo
5	MO	bcr1	bcr1
6	MO	bcr1	bcr1
7	MO	bcr1	bcr1
8	MO	bcr1	bcr1
9	MO	bcr3	bcr3
10	MO	bcr1	bcr1
11	MO	bcr1	bcr1
12	MO	bcr3	bcr3
13	MO	bcr3	bcr3
14	MO	bcr1	bcr1
15	MO	Negativo	Negativo
16	MO	Negativo	Negativo
17	MO	Negativo	Negativo
18	MO	Negativo	Negativo
19	MO	bcr1	bcr1

Resultados: Los ensayos RT-Q-LAMP triple (bcr1-bcr3-GUSb) y dú-