

TÍTULO: Elaboración de un algoritmo basado en secuenciación masiva en sangre periférica para el diagnóstico de síndromes linfoproliferativos crónicos leucemizados

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Miguel Bastos Boente

Laboratorio de Biología Molecular y HLA, Servicio de Hematología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca

OBJETIVO GENERAL: Desarrollar un modelo predictivo que emplee datos clínicos, biológicos y genómicos para caracterizar síndromes linfoproliferativos crónicos de célula B.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Seleccionar y secuenciar un grupo de casos control con diagnóstico conocido mediante el panel de NGS Euroclonality-NDC.
2. Entrenar un modelo predictivo basado en redes neuronales utilizando la información clínica, biológica y genómica de cada muestra.
3. Validar el modelo predictivo a nivel interno (casos incluidos en la generación del algoritmo) y a nivel externo (casos no expuestos al modelo).
4. Evaluar la eficacia del modelo en la predicción de casos de SLPC-B NOS, comparando su predicción con el diagnóstico más probable en base a la información clínica y evolución del paciente.

DISEÑO:

Se seleccionarán dos grupos de muestras: (i) un grupo control compuesto por pacientes con un diagnóstico confirmado en base a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (revisión histológica del ganglio linfático y/o citometría de flujo en casos leucemizados); y (ii) un grupo de pacientes con síndromes linfoproliferativos crónicos de célula B no específicos (SLPC-B NOS).

El grupo control se dividirá en tres subgrupos: (a) una serie de entrenamiento para la red neuronal (64% del total); (b) una serie de validación interna para la optimización de los pesos del modelo (16% del total); y (c) una serie de validación externa (20% del total). En todos los grupos se estratificará aleatoriamente por

patología para que todas estén igualmente representadas. Se incluirán, en un principio, casos de las siguientes patologías: leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF), linfoma de la zona marginal (LZM), tricoleucemia (HCL) y macroglobulinemia de Waldenström (MW). Se estima un total de 300 casos, con un mínimo de 50 por patología; además, se plantea la inclusión de otras patologías como el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en base a la disponibilidad de muestras.

De todos los casos se recogerá la información clínica básica (edad al diagnóstico y sexo), además de la presencia o ausencia de esplenomegalia por técnicas de imagen. Por otro lado, se recogerá la presencia de componente monoclonal por proteinograma (IgM, IgG o IgA) y la información de expresión de citometría de flujo de, al menos: CD5, CD10, CD20, CD23 y cadenas ligeras de inmunoglobulina (si están disponibles, se recogerán los datos de expresión de CD200, sIgM, CD11c y CD103).

Los casos serán secuenciados empleando el panel de NGS Euroclonality-NDC en un sistema Illumina NextSeq2000 y los archivos resultantes se analizarán empleando el *software* específico de Euroclonality depositado en la plataforma Basespace de Illumina. Posteriormente, se realizará un preprocesamiento de los archivos resultantes mediante un *pipeline* automatizado en R y se generará una base de datos que será empleada para la generación de la red neuronal en el lenguaje de programación Python. Se considerarán las variantes no germinales y con presencia en el clon mayoritario, para lo que se requiere la infiltración de la muestra y, en contadas ocasiones, una muestra no tumoral.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Por limitaciones presupuestarias, sólo podrá incluirse un total de **25 casos** que cumplan los tres criterios:

- 1) Pacientes con diagnóstico confirmado de **síndrome linfoproliferativo B crónico** con componente en sangre periférica (**leucemizado**) al que no se le pueda atribuir un **diagnóstico específico**, es decir, que cumpla uno de los siguientes criterios:

- **Diagnóstico no específico** a partir del fenotipo por citometría de flujo (i.e. casos CD5-/CD10-).
- **Diagnóstico intermedio** entre dos entidades en base al fenotipo por citometría de flujo (i.e. casos CD5+ intermedios entre LCM y LLC).
- Casos en los que exista **discrepancia entre dos o más pruebas diagnósticas** (i.e. casos con fenotipo de LLC por CMF y con translocaciones aberrantes por FISH).
- Casos con **presentación nodal** donde se cumpla alguno de los siguientes supuestos:
 - Casos con presentación fenotípica de **linfoma de células del manto**, pero **sin presencia de la translocación t(11;14) y/o sobreexpresión de la Ciclina D1** por inmunohistoquímica.
 - Casos con presentación fenotípica de **linfoma folicular sin la translocación t(14;18)**.
 - Casos donde la **revisión del ganglio linfático no sea suficiente** para la caracterización de la entidad.

2) Disponibilidad de muestra biológica adecuada (sangre periférica) con infiltración suficiente (>15% o linfocitosis clara) para la extracción de ADN.

3) Disponibilidad de datos clínicos/biológicos mínimos:

- Presencia/ausencia de esplenomegalia.
- Presencia/ausencia de componente monoclonal (IgM, IgG o IgA).
- Expresión de CD5, CD10, CD20, CD23 y cadena ligera de inmunoglobulina por citometría de flujo.

SUJETOS Y MATERIAL DE ESTUDIO

El estudio se realizará sobre muestras biológicas de sangre periférica procedentes de pacientes diagnosticados con síndromes linfoproliferativos crónicos de célula B (SLPC-B) no clasificables (SLPC-B NOS).

Las muestras requeridas incluyen:

- **Un tubo de sangre periférica (EDTA – 10mL) con infiltración tumoral suficiente** (>15% por citometría de flujo o presencia de linfocitosis clara).

Las muestras serán analizadas mediante secuenciación masiva utilizando el panel **Euroclonality-NDC** en un sistema **Illumina NextSeq2000**. El procesamiento bioinformático se realizará con el software específico de Euroclonality a través de la plataforma BaseSpace, y un pipeline de análisis en R y Python para la generación del modelo predictivo.

Los datos **clínicos mínimos requeridos** incluyen:

- **Edad al diagnóstico, sexo y estado del paciente al envío** (Diagnóstico, enfermedad estable o progresión). Si el paciente ha recibido **algún tratamiento previo** debe indicarse.
- Presencia/ausencia de **esplenomegalia**.
- Presencia/ausencia de **componente monoclonal** (IgM, IgG, IgA).
- **Inmunofenotipo por citometría de flujo**: CD5, CD10, CD20, CD23, cadenas ligeras de inmunoglobulina ($\pm$ CD200, sIgM, CD11c, CD103 si estuviesen disponibles).

En todos los casos estudiados, **se devolverá la información obtenida al clínico para su uso con motivos diagnósticos**.

MUESTRAS A ENVIAR

Para la participación en este estudio se enviará un **tubo EDTA de 10mL de Sangre periférica con infiltración suficiente** (>15% por citometría de flujo o linfocitosis clara).

DOCUMENTACIÓN A ENVIAR

Consentimiento informado del estudio [se adjunta PDF]

En el volante de petición, por favor indicad: “Estudio algoritmo”

FORMA DE ENVÍO Y CORREO DE CONTACTO

Contactar previamente por correo electrónico para informar de los casos a enviar y la fecha aproximada de recepción.

Las muestras se pueden enviar a temperatura ambiente dentro de las valijas convencionales con muestras asistenciales.

- Correos: mbastos.ibsal@saludcastillayleon.es /
alcocebasanchez@saludcastillayleon.es