

TÍTULO:

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DEL PERFIL GENÓMICO COMPLETO DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

CRISTINA DE RAMÓN SÁNCHEZ

RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto): (ajustarse al espacio disponible)

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por una alta heterogeneidad clínica y genética. Las principales alteraciones genómicas incluyen traslocaciones cromosómicas, anomalías en el número de copias (CNAs) y mutaciones puntuales, como las del gen *TP53*, asociadas a mal pronóstico. Tradicionalmente, las alteraciones estructurales se identifican mediante FISH, considerada la técnica *gold standard*, y las mutaciones de *TP53* por secuenciación dirigida, con la limitación de que sólo se analiza un número reducido de regiones dentro del genoma. Si bien hay alteraciones cromosómicas que se podrían analizar mediante el cariotipo convencional, su rendimiento en el MM es bastante escaso debido a la dificultad para obtener metafases. En este contexto, las tecnologías de alto rendimiento que abarcan la práctica totalidad del genoma- secuenciación de nueva generación (NGS), y mapeo óptico del genoma (OGM)-, permiten detectar, en un único experimento, las traslocaciones de *IGH* y las CNAs incluidas en los índices pronósticos actuales, junto a todas las demás alteraciones de la célula plasmática tumoral no detectadas por las técnicas convencionales. Sin embargo, no hay estudios comparativos directos entre ambas técnicas en el contexto del MM.

La finalidad de este proyecto es comparar dos tecnologías emergentes y complementarias: un panel amplio de NGS y el OGM, con el objetivo de determinar cuál ofrece una caracterización más completa del genoma tumoral, y permite una mejor estratificación pronóstica de los pacientes con MM. Además, se evaluará su capacidad para detectar las alteraciones tradicionalmente analizadas por FISH, considerada el estándar de referencia.



ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA (Citar las referencias incluidas en el apartado siguiente) (Máximo 3 páginas)

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación y acumulación de células plasmáticas clonales en la médula ósea que producen una inmunoglobulina monoclonal. Es la segunda hemopatía más frecuente en nuestro medio después del linfoma. Se caracteriza por una gran complejidad genómica y molecular, lo que explica en buena medida la variabilidad observada en la evolución clínica y la respuesta al tratamiento. Las diversas alteraciones genómicas se pueden categorizar en traslocaciones; alteraciones en el número de copias (CNA), es decir, ganancias y pérdidas de material cromosómico; y mutaciones puntuales (1).

Las translocaciones del gen *IGH* más recurrentes son la t(11;14), detectada en el 15-20% de los casos, que da lugar al aumento de la expresión del gen *CCND1* (2); la t(4;14), que aparece en aproximadamente el 15% de los pacientes con MM y da lugar a la desregulación simultánea de dos genes, *FGFR3* y *MMSET/NSD2* (3); y la t(14;16), observada como máximo en el 5% de los MM y que conlleva un aumento de la expresión del oncogén *MAF* (3). Tanto la t(4;14) como la t(14;16) se incluyen en la mayoría de las estratificaciones pronósticas como marcadores genéticos de mal pronóstico (4, 5). El cromosoma más afectado por ganancias y pérdidas es el cromosoma 1, en el que se gana el brazo q en el 60% de los casos y se pierden regiones de 1p en aproximadamente el 30% de los pacientes. Ambas anomalías se han asociado a una corta supervivencia, y especialmente la amplificación de 1q, definida como la presencia de más de tres copias de 1q, que conlleva aún peor pronóstico (6). Otras pérdidas de material cromosómico frecuentes son la monosomía/delección del cromosoma 13 y la delección de 17p (del(17p)). La del(17p), que contiene el locus de *TP53*, está presente en el 8-10% de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico y se considera una de las alteraciones asociada a peor pronóstico (4), incluso de forma aislada en ausencia de mutación del gen *TP53* (7). Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en otros cánceres, el gen *TP53* está mutado en un pequeño porcentaje de pacientes con MM de nuevo diagnóstico que no supera el 10%, incluso utilizando las técnicas de secuenciación masiva. La identificación de estas alteraciones se lleva a cabo en todos los pacientes en el momento del diagnóstico con el fin de predecir la supervivencia y calcular algunos de los índices pronósticos (8). Esto supone realizar un experimento de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sondas específicas para cada una de las anomalías cromosómicas, excepto para las mutaciones de *TP53* que se estudian mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Además, en el contexto de nuevas terapias dirigidas contra el antígeno de maduración de células B (BCMA), es fundamental realizar un análisis detallado del gen *TNFRSF17*, que codifica para BCMA, con el fin de identificar posibles mecanismos de resistencia al tratamiento provocados por mutaciones inactivantes o delecciones. En este contexto, las tecnologías de alto rendimiento permiten en un solo experimento el estudio completo de las alteraciones cromosómicas relacionadas con el pronóstico mencionadas, así

como aquellas que podrían estar implicadas en la respuesta a nuevos fármacos.

La tecnología del **mapeo óptico del genoma (OGM)**, es un cariotipo digital de alta resolución que se basa en el estudio de secuencias largas de nucleótidos. Permite la detección de alteraciones estructurales, incluyendo traslocaciones, ganancias y pérdidas cromosómicas, con una resolución de hasta 500 pares de bases (pb) y un límite de sensibilidad que puede llegar al 5% (9). Se basa en la captura de imágenes de moléculas de DNA de alto peso molecular marcadas mediante fluorescencia en secuencias específicas. De esta forma se obtiene un patrón de marcaje único que, a través de su comparación con el patrón de marcaje de un genoma de referencia, permite la detección simultánea de alteraciones numéricas y estructurales con una sensibilidad y precisión mayores que el cariotipo. Esta técnica ha sido validada en numerosos estudios que han demostrado que es capaz de alcanzar una sensibilidad de hasta 5%, una especificidad de hasta el 100%, y un valor predictivo positivo superior al 80%, siempre y cuando se consiga una cobertura mínima de 400X (10).

Por otro lado, las **técnicas de NGS** permiten identificar todas las alteraciones previamente mencionadas, además de mutaciones puntuales no identificadas por OGM. No obstante, presentan limitaciones en la detección de CNAs de tamaño superior a 5 kilobases. Para la identificación de este tipo de variantes estructurales, se requiere el uso de técnicas de NGS más potentes, como la secuenciación del genoma completo (WGS) o del exoma completo (WES), o bien el empleo de paneles de secuenciación dirigidos que cubran regiones extensas del genoma, con el objetivo de optimizar costes sin comprometer la sensibilidad. Cabe señalar que esta tecnología conlleva la necesidad de análisis bioinformáticos complejos, cuya interpretación resulta especialmente desafiante. A pesar de ello, se han desarrollado diversos paneles específicos orientados a la detección de las principales alteraciones genómicas asociadas al mieloma (11).

La tecnología OGM permite la detección de variantes estructurales en un amplio rango de tamaños, desde reordenamientos a nivel cromosómico completo hasta eventos de aproximadamente 500 pb. Por su parte, las técnicas basadas en NGS abarcan un rango que va desde 1 pb hasta aproximadamente 5 kilobases (kpb), si bien es necesaria la aplicación de análisis bioinformáticos avanzados para identificar correctamente las alteraciones estructurales de mayor tamaño. Actualmente, no se dispone de estudios comparativos directos entre ambas tecnologías en el contexto del MM.



Por todo ello consideramos que un **análisis genómico integrador** mediante NGS proporcionará información relevante sobre el panorama genómico del MM, y su comparación con los datos obtenidos mediante OGM del anterior proyecto nos permitirá elegir la tecnología que mejor se adapte a las necesidades actuales. Nuestro grupo se encuentra entre los primeros del país en implementar la tecnología OGM para el estudio del MM, además de tener una amplia experiencia en el desarrollo de técnicas de secuenciación.

En este proyecto, se propone realizar una comparación entre NGS y otras tecnologías de alta resolución, como el OGM. También se dispondrán de los datos de la técnica FISH, considerada el *gold estándar* para el estudio de alteraciones genéticas estructurales en estos pacientes. El objetivo es determinar qué plataforma ofrece una caracterización genómica más completa, y permite una mejor estratificación pronóstica de los pacientes. Toda la información genética obtenida podría posibilitar en un futuro la adaptación terapéutica más precisa en función del perfil genómico individual.



BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE (Máximo 1 página)

1. Cardona-Benavides IJ, de Ramón C, Gutiérrez NC. Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells*. 2021 Feb 5;10(2):336.
2. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, Kaiser MF, Begum DB, Dahir NB, et al. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood*. 2013 Apr 25;121(17):3413-9.
3. Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2019 May 21;10:1121.
4. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 10;33(26):2863-9.
5. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(4):360-76.
6. Schmidt TM, Barwick BG, Joseph N, Heffner LT, Hofmeister CC, Bernal L, et al. Gain of Chromosome 1q is associated with early progression in multiple myeloma patients treated with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone. *Blood Cancer J*. 2019 Nov 25;9(12):94.
7. Corre J, Perrot A, Caillot D, Belhadj K, Hulin C, Leleu X, et al. del(17p) without TP53 mutation confers a poor prognosis in intensively treated newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Blood*. 2021 Mar 4;137(9):1192-1195.
8. Avet-Loiseau H, Davies FE, Samur MK, et al. International Myeloma Society/International Myeloma Working Group Consensus Recommendations on the Definition of High-Risk Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2025;JCO2401893. PMID: 40489728.
9. Yuan Y, Chung CY-L, Chan T-F. Advances in optical mapping for genomic research. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;18:2051–62. PMID: 32802277
10. Smith AC, Neveling K, Kanagal-Shamanna R. Optical genome mapping for structural variation analysis in hematologic malignancies. *Am J Hematol* 2022;97:975-82. PMID: 35560245
11. Sudha P, Ahsan A, Ashby C, et al. Myeloma Genome Project Panel is a Comprehensive Targeted Genomics Panel for Molecular Profiling of Patients with Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2022 Jul 1;28(13):2854-2864. PMID 35522533



HIPÓTESIS (Ajustarse al espacio disponible)

La finalidad de este proyecto es comparar las 2 técnicas de alto rendimiento que permiten evaluar el perfil genómico completo de pacientes con MM, que son la tecnología del mapeo óptico del genoma (OGM) y la NGS. Para ello, como continuación del proyecto concedido el pasado año en el que se está realizando el estudio de OGM en 15 muestras de pacientes diagnosticados de MM, se realizará en esas mismas muestras un estudio de secuenciación dirigida a las principales regiones que pueden verse alteradas en el MM, y se compararán los resultados entre ambas tecnologías.

Este análisis permitirá valorar la posible incorporación en la práctica clínica habitual de la tecnología que mejor sea capaz de identificar las alteraciones genéticas incluidas en los índices pronósticos actuales, así como las alteraciones con impacto pronóstico.

OBJETIVOS (ajustarse al espacio disponible)

1. Analizar alteraciones estructurales (variación en el número de copias y translocaciones) en 14 muestras de pacientes con diagnóstico de MM mediante un panel de NGS dirigido de captura.
 - Identificar las alteraciones citogenómicas que se analizan en la práctica clínica habitual del MM: (t4;14), t(14;16), del(17p), del(1p) y del(17p).
 - Describir las alteraciones adicionales encontradas y registrarlas para su análisis estadístico posterior.
 - Establecer criterios de filtrado, análisis e interpretación de variantes mediante análisis bioinformático de los resultados.
2. Comparar las alteraciones detectadas mediante NGS respecto a las identificadas por OGM en el proyecto anterior.
3. Determinar la capacidad de la NGS para detectar las alteraciones cromosómicas incluidas en la práctica clínica habitual, respecto a la FISH, considerada la metodología de referencia.



METODOLOGÍA (Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio) (Máximo 4 páginas)

METODOLOGÍA NGS.

El análisis de secuenciación se realiza mediante un panel dirigido de captura de Twist Bioscience (San Francisco, CA, USA) basado en el diseño inicial del grupo de Brian Walker (9) que incluye > 5000 sondas para identificar SNV e indels de aproximadamente 250 genes, así como sondas distribuidas a lo largo de todo el genoma para CNVs. Además, incluye > 8000 sondas que permitirá poder identificar traslocaciones y reordenamientos que involucran *IGH*, *IGL*, *IGK* y *MYC*. Se empleará un panel de normales como control, procedentes de la secuenciación de sangre periférica de donantes sanos. El ADN de partido necesario será 100 ng. La secuenciación se realizará en un NextSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA).

DISEÑO.

El **primer objetivo** está enfocado al estudio de NGS, incluye los siguientes puntos:

- Se partirá del DNA de cadena larga extraído del objetivo anterior.
- Cuantificación del DNA para asegurar conseguir el material de partida requerido de 100 ng.
- Preparación de librerías según protocolo estandarizado que incluye, además de la fragmentación, ligación, unión de adaptadores e index, así como amplificación.
- Control de calidad para confirmar calidad y tamaño de las librerías mediante el aparato TapeStation (Agilent) y Qubit 4.0 (ThermoFisher).
- Secuenciación de las librerías en la plataforma de Illumina NextSeq 2000.
- Análisis de resultados mediante una *pipeline* propia que incluye demultiplexado con bcl2fastq, alineamiento al genoma de referencia GRCh38/hg38 con BWA, llamado de variantes con Strelka, filtrado con pfilter, normalización y comparación con el panel de normales.

El **segundo objetivo** contempla un análisis comparativo entre las alteraciones genéticas identificadas mediante las dos técnicas de análisis genómico mencionadas, NGS y OGM:

- Las alteraciones identificadas por cada una de las técnicas serán recogidas en plantillas de Excel diseñadas para tal efecto.
- En primer lugar, se hará un análisis descriptivo con el número total de alteraciones identificadas por cada técnica, tipos de alteraciones que incluirán CNAs, variantes estructurales, y en el caso de la NGS también mutaciones puntuales.
- Para evaluar la concordancia se aplicará el índice de concordancia (Cohen's Kappa) o el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según se trate de variables discretas o continuas.
- Las diferencias entre las técnicas en términos de número, tipo o distribución de alteraciones se evaluarán mediante las pruebas T de student, Mann-Whitney, Chi cuadrado, Test de Fisher y anova.
- La validación de las alteraciones citogenómicas analizadas en la práctica clínica habitual se llevará a cabo mediante FISH.



El **tercer objetivo** pretende evaluar la capacidad de la NGS de detectar las alteraciones genéticas incluidas en la práctica clínica habitual, para lo cual se calculará para cada alteración:

- El valor predictivo positivo (VPP): proporción de resultados positivos por NGS que fueron confirmados como positivos por FISH.
- El valor predictivo negativo (VPN): proporción de resultados negativos por NGS que fueron confirmados como negativos por FISH.
- Cálculo de la sensibilidad y especificidad.

SUJETOS DEL ESTUDIO.

El estudio se llevará a cabo en células plasmáticas de médula ósea extraída de los pacientes con diagnóstico de MM procedentes de dos hospitales de la Comunidad, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y Complejo Asistencial de Ávila en los que se realizó el estudio de OGM con la financiación del proyecto concedido en la anterior convocatoria. El DNA de cadena larga sobrante, extraído para el OGM y guardado posteriormente a -20°C , se podrá fragmentar y ser utilizado para la preparación de librerías y posterior secuenciación. Está previsto incluir los mismos 15 pacientes en los que se realizó OGM para poder comparar resultados.

VARIABLES.

Alteraciones genéticas de los pacientes diagnósticos de MM identificadas mediante NGS, OGM y FISH: inserciones, deleciones, translocaciones balanceadas y no balanceadas, alteraciones en el número de copias y mutaciones puntuales.

Como características clínicas se dispondrá de datos demográficos (sexo, edad) y momento evolutivo de la muestra (diagnóstico o recaída).

ANÁLISIS DE DATOS.

El **análisis de los archivos de secuenciación obtenidos mediante el panel de NGS** se realizará empleando la *pipeline* mencionada previamente. La visualización de todas las variantes identificadas se llevará a cabo empleando el software Tarpan, desarrollado por el grupo de Brian Walker (11).

Respecto a los informes emitidos con las alteraciones citogenéticas encontradas, todavía no hay guías consenso dado que su implementación en los laboratorios está en proceso. Sin embargo, dichos informes deberán incluir las variantes ya validadas como clínicamente relevantes, así como otras nuevas que puedan tener impacto en el pronóstico o ser dianas terapéuticas tomando como referencias los trabajos publicados. A partir de los resultados que se generen con este proyecto, se trabajará de forma conjunta con otros centros para recopilar nuevos datos que puedan añadir un valor adicional a los actuales índices pronósticos en el MM.

Por otra parte, el análisis estadístico de los datos clínicos se realizará con el programa SPSS (SPSS Inc., IL, USA) y mediante RStudio utilizando un entorno de R (versión 4.3.0).

La visualización de los resultados se llevará a cabo mediante gráficos tipo “circos plot” para las translocaciones, así como gráficos para las alteraciones en el número de copias.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

La principal limitación del estudio es el número de pacientes que será limitado debido al coste elevado de las técnicas empleadas. Aunque el panel de NGS que se va a emplear supone un coste superior al panel de FISH empleado como metodología de referencia en la práctica clínica asistencial, el precio sería comparable al generado por la combinación de estudios de FISH y el panel de NGS dirigido al análisis de *TP53*. A pesar de lo cual, se considera que este estudio puede aportar información relevante para valorar la utilidad específica de cada metodología, disponibles ambas en nuestro centro, y aspirar a utilizar la estrategia más informativa con el menor coste posible.

La NGS tiene una alta sensibilidad para detectar mutaciones, sin embargo presenta limitaciones en la identificación de alteraciones estructurales complejas cuando se utilizan paneles dirigidos debido por un lado a que la cobertura está limitada a las regiones incluidas en el panel; y por otro lado, a que empleamos la metodología de secuenciación de cadena corta lo que dificulta la identificación de grandes reordenamientos.

Estas limitaciones podrían resolverse mediante el cambio a una secuenciación de genoma completo, aunque encarecería todo el proceso y sería inviable su incorporación en la práctica clínica; y mediante el uso de plataformas de secuenciación de cadena larga que todavía están en proceso de mejora de la tasa de errores y estandarización para su inclusión en la rutina asistencial. No obstante, como se menciona en la introducción, el panel que se ha seleccionado para este trabajo es amplio y ya ha sido validado y publicado (11).



PLAN DE TRABAJO (Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador, incluyendo los proyectos en los que participe cada uno de sus integrantes Indicar también el lugar de realización del proyecto) (Máximo 2 página)

Actividad 1. Fragmentación de DNA del alto peso molecular para NGS.

- Distribución de tareas: IRI, EARR, SCV
- Lugar de realización: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Actividad 2: Preparación de librerías para el panel de NGS.

- Distribución de tareas: AMH, SCV, IRI
- Lugar de realización: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Actividad 3. Control de calidad y secuenciación de las librerías mediante el instrumento NextSeq.

- Distribución de tareas: AMH, SCV, EARR
- Lugar de realización: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Actividad 4. Visualización de resultados, filtrado y comprobación de variantes y emisión de informes.

- Distribución de tareas: CRS, NCGG, AMH, DBR, JDV
- Lugar de realización: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Actividad 5. Preparación de bases de datos común con los resultados obtenidos con las distintas metodologías.

- Distribución de tareas: FLP, BRB, EARR
- Lugar de realización: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Actividad 6. Comparación de ambas técnicas mediante análisis estadísticos.

- Distribución de tareas: JDV, DBC, CRS, NCGG
- Lugar de realización: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, y Complejo Asistencial de Ávila.

Actividad 7. Escritura de resultados y divulgación.

- Distribución de tareas: Todos los investigadores.
- Lugar de realización: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Centro de Investigación del Cáncer, y Complejo Asistencial Universitario de Ávila.



EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR (Máximo 1 página)

La investigadora principal del proyecto, **Cristina de Ramón Sánchez (CRS)**, es facultativo especialista de área de Hematología en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA), forma parte del grupo de investigación "Biología molecular y celular de hemopatías" (Grupo CANC-05) integrado en el Área de Cáncer del IBSAL. Su actividad clínica asistencial la desarrolla en los Laboratorios de Citogenética y Biología Molecular del Servicio de Hematología del CAUSA. Como parte de su labor investigadora, ha colaborado en diferentes proyectos de investigación; y ha participado en 13 publicaciones en revistas internacionales. Además, forma parte activa del grupo de OGM del Grupo Español de Citogenética de la Sociedad Española de Hematología. El resto del equipo investigador está compuesto por:

Beatriz Rey Bua (BRB): médico adjunto del departamento de Hematología en el CAUSA. Su labor clínica está centrada en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con MM, participando en numerosos ensayos clínicos. Además, forma parte de la unidad de citomorfología diagnóstica, donde realiza los estudios de médula ósea para el diagnóstico del MM.

Alejandro Medina Herrera (AMH): graduado en Biología por la Universidad de Salamanca, con Máster en Biología y Clínica del Cáncer, y tesis doctoral centrada en el estudio molecular de pacientes con MM, en concreto enfermedad mínima residual. Actualmente trabaja en numerosos proyectos enfocados en el estudio genómico del MM. Además, forma parte del Grupo Español de Mieloma y de Biología Molecular.

Julio Dávila Valls (JDV): médico adjunto del departamento de Hematología en el Complejo Asistencial de Ávila, donde realiza su actividad asistencial en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con MM. Su actividad investigadora, se centra en el estudio del MM. Participa activamente en las propuestas que surgen en el seno de la Sociedad Castellano-Leonesa de Hematología y Hemoterapia.

Norma C Gutiérrez Gutiérrez (NCGG): médico adjunto del departamento de Hematología. Su labor clínica está centrada en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con neoplasias linfoides. Es la responsable de los estudios citogenéticos del MM y otras gammapatías monoclonales en el Grupo Español de MM (GEM). Además, su investigación se centra en la genética del MM.

David Becerro Recio (DBR): graduado en Biotecnología y máster en Biología Celular y Molecular, en Análisis Bioinformático Avanzado y Machine Learning. Su actividad se centra en análisis bioinformáticos y técnicas de análisis masivo (*ómicas*). Actualmente está centrado en el desarrollo de *pipelines* para el análisis de estudios genéticos del MM en el Laboratorio de Biología Molecular del CAUSA.

Elizabetha de los A. Rojas Ricardo (EARR), es licenciada en Bioquímica y doctorada en Biología y Clínica del Cáncer por la Universidad de Salamanca. Actualmente es investigadora postdoctoral en el Centro de Investigación del Cáncer, y su línea de investigación se centra en el estudio de las alteraciones genéticas en la patogenia del MM. Domina numerosas técnicas de análisis molecular y celular.

Irene Rodríguez Iglesias (IRI): es Técnico Especialista de Laboratorio (2005). Trabaja en el grupo de citogenética molecular en oncohematología en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Su actividad laboral se centra en el procesamiento de muestras, separación de poblaciones celulares, extracción y cuantificación de DNA y RNA, así como técnicas de FISH, PCR, y secuenciación.

Fernando Lorenz Prieto (FLP): licenciado en Medicina por la Universidad de Ciudad Real. Se encuentra en el tercer año de residencia de la especialidad de Hematología y Hemoterapia del CAUSA. Durante su periodo formativo ha adquirido la experiencia en el manejo de pacientes con MM, tanto hospitalizados como en consulta externa.

Sara Cristóbal Vargas (SCV): graduada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, y Máster en Biología y Clínica del Cáncer por la Universidad de Salamanca. Su principal línea de investigación actual y tema de tesis doctoral se basa en el estudio de las alteraciones genéticas en el MM, así como en la búsqueda de genes sintético-letales en células de MM.



UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN RELACIÓN CON LA SALUD (ajustarse al espacio disponible)

El mieloma múltiple es la segunda neoplasia hematológica más frecuente. Se caracteriza por una gran inestabilidad genómica que se traduce en la presencia de alteraciones citogenómicas en hasta el 90% de los pacientes, la mayoría de ellas con valor pronóstico. Buena parte de estas alteraciones no son detectadas con las técnicas utilizadas en la asistencia clínica. Las tecnologías que se emplearán en el presente proyecto (OGM y NGA) tienen la capacidad de detectar un número de alteraciones significativamente mayor que los estudios tradicionales de FISH, pudiendo llegar a sustituir a los múltiples análisis de FISH realizados en la actualidad, con lo que se ampliará el conocimiento del perfil cromosómico/genético de los pacientes con MM. A nivel asistencial la implantación de esta metodología supondrá no solo disponer de una información citogenética más amplia, sino también un ahorro económico. Además, estos datos podrán ser analizados con el fin de buscar nuevos factores pronósticos para avanzar hacia una medicina más personalizada, lo que constituye una clara vía de transferencia clínica de los resultados.

El Complejo Asistencial Universitario de Salamanca sería pionero en la implementación de esta tecnología para el análisis de muestras de MM en la Comunidad de Castilla y León, lo que no solo posiciona al centro como referente regional, sino que abre la puerta a colaboraciones estratégicas con centros nacionales e internacionales especializados en citogenética y secuenciación genómica.

El carácter innovador del estudio y la ausencia de datos publicados que comparen ambas técnicas en el contexto del MM suponen una oportunidad relevante para generar resultados originales.

MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO (ajustarse al espacio disponible)

Los estudios se realizarán en los laboratorios del departamento de Hematología (Complejo Asistencial Universitario de Salamanca) y en el Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de la Universidad de Salamanca.

Laboratorio de Hematología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca: dispone de dos separadores celulares AutoMACS y equipos necesarios para la hibridación *in situ* fluorescente. Además, equipo de secuenciación directa y GeneScanning (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer y ABI PRISM 7900 Sequence Detection System); un pirosecuenciador PyroMark Q24 MD (Qiagen) y cuatro equipos de secuenciación, MiniSeq (1), MiSeq (1) y **NextSeq** (2) (Illumina), así como 2 robots para la automatización de librerías (Magnis y Avenio). Cuenta con dos equipos de PCR cuantitativa (Step One Plus Real Time PCR System) y varios termocicladores. Se dispone del equipo de nanoimmunoensayo capilar (sistema de "Western" automatizado) para la cuantificación de proteínas. Además, posee una colección de muestras de MM (pertenecientes a la colección C.0003878) procedentes de los pacientes registrados en los ensayos clínicos del "Grupo español de mieloma (GEM)" desde el 2005.

Laboratorios del Centro de Investigación del Cáncer: Instrumento Saphyr junto con servidor informático con acceso a plataforma Bionano Access (este equipo es el fundamental para el desarrollo del proyecto). Además, proporcionan los siguientes servicios: Agilent 2100 Analyzer (Agilent Palo Alto, CA) para medir la calidad y la concentración del ARN, y tecnología de microarrays (Affymetrix).



JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LA AYUDA SOLICITADA (Máximo 2 páginas)

- Reactivos para la preparación de librerías, así como el cartucho de secuenciación. Se ajustará el número de muestras por cartucho con el fin de optimizar costes, de tal manera que el coste por muestra asciende a un coste de 425 euros. Como vamos a analizar 14 muestras, supondría un total de 6000 euros.
- Los estudios de OGM se realizarán con la financiación concedida en la convocatoria del pasado año.
- Los estudios de FISH se realizarán por parte de los laboratorios de Citogenética del CAUSA, ya que forman parte del estudio de rutina para el diagnóstico de MM en la práctica clínica habitual.

El coste actual de los estudios genéticos que exigen las guías clínicas ante el diagnóstico del MM, incluye el panel amplio de FISH (5 sondas) junto con el estudio de mutaciones de *TP53* por secuenciación; y sería equivalente al precio del panel de NGS dirigido que se propone en el presente trabajo, con la ventaja que se obtendría más información. Sin embargo, es necesario realizar este tipo de estudios comparativos para evaluar la técnica que ofrece más información de forma coste-efectiva.