CD16FITC/CD14PE/HLA-DR PerCP-Cy5/CD2PE-Cy7/CD64APC/CD45 APC-H7, lisis, 2 lavados). En todas las muestras se adquirieron >500.000 eventos en un único citómetro (FACSCanto II, BDB). El análisis del protocolo francés se hizo con el programa DIVA (BDB) y la secuencia de ventanas de sus autores. Para el análisis del protocolo habitual se usó el programa Infinicyt (Cytognos). El porcentaje de monocitos clásicos (Moc,CD14+/CD16-) se refirió al total de monocitos. El análisis estadístico aplicó la curva (ROC) en cada estudio y evaluó la sensibilidad y especificidad de varios puntos de corte de Moc. El coeficiente de correlación intraclase (CCI) evaluó el acuerdo entre los 2 protocolos.

Resultados: La mediana de edad fue de 80 años (rango intercuartil, IR 71-87) en la LMMC y 76,5 años (IR 64,3-86,5) en los demás pacientes. La mediana de monocitos fue similar (1.600 vs 1.650/mm^3). El análisis de Moc se realizó en 38 pacientes (90,5%). El área bajo la curva (ABC) del protocolo francés fue 0,81 (IC95%; 0,675-0,953; p=0,001) frente a 0,84 (IC95%; 0,708-0,976; p<0,001) del protocolo habitual (Figura 1). El CCI entre ambos protocolos fue de 0,92 (p<0,001). En el gráfico de Bland-Altman todos los valores salvo 3, se distribuyeron +/-2 veces alrededor de la media (IC95%) (Figura 2). La sensibilidad/especificidad del punto de corte de 94%Moc fue 55,5%/85% con el protocolo francés y 72,5%/75% con el nacional. Aplicando 90%Moc, la sensibilidad/especificidad del estudio francés fue 72%/70% frente a 94%/65% del estudio nacional.

Conclusiones: La capacidad diagnóstica del protocolo francés queda validada externamente con nuestro protocolo habitual (ABC similares). Sin embargo, ninguno reproduce los valores de sensibilidad y especificidad publicados. En la práctica clínica, un 90%Moc permitirá seleccionar monocitosis puntuales con alta sospecha de LMMc que requerirán de seguimiento posterior.

PO-094

DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN MONOCÍTICA CLÁSICA EN LA LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA (LMMC) Y EN LA MONOCITOSIS REACTIVA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO. ANÁLISIS DEL PUNTO DE CORTE ENTRE AMBAS ENTIDADES EN NUESTRO CENTRO

Fernández-Caldas González P[1], Lemes Castellano MA[1], Fiallo Suárez D[1], De la Nuez Melián H[1], Pérez Ortiz L[1], Gonzálvez Fernández JA[1], Borrero Borrego A[1], López Rodríguez JF[1], Acosta Fleitas C[1], González Pinedo L[1], Molero Labarta T[1]

[1]Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín

Introducción: La Leucemia Mielomonocítica crónica es el Síndrome Mielodisplásico/ Mieloproliferativo más frecuente. Se trata de una entidad cuyo criterio indispensable para el diagnóstico es la monocitosis > 1x10^9 durante al menos 3 meses. En algunas situaciones, resulta difícil diferenciar esta entidad de las monocitosis reactivas. Estudios recientes sugieren que el análisis de sangre periférica de la distribución de las distintas poblaciones monocíticas mediante citometría de flujo en los paciente con monocitosis > 1x10^9, puede contribuir al diagnóstico y seguimiento de la LMMC. Se han diferenciado tres poblaciones monocíticas según la expresión de los marcadores CD14 y CD16 estableciéndose una población clásica o tipo I CD14+/CD16-, una tipo II CD14+/CD16+ y tipo III CD14low/CD16+. La proporción de tipo I está incrementada en pacientes con LMMC, mientras que se encuentra disminuida en aquellos con monocitosis reactiva. El objetivo de este trabajo ha sido comparar las poblaciones monocíticas de pacientes con LMMC y monocitosis reactivas para determinar el valor de nuestro punto de corte así como la sensibilidad y especificidad del estudio.

Métodos: Siguiendo con trabajos previos ya realizados, se han recopilado nuevos pacientes, la mayoría de ellos con clonalidad establecida con mutacion SRFS2 obteniendo finalmente un total 26 pacientes de 2 centros distintos. De ellos 7 eran mujeres y 19 varones comparándolos con 25 controles siendo 12 mujeres y 13 varones. Se recolectaron los datos de citometría de flujo, biología molecular, FISH y citogenética de ambos grupos. En ambos grupos se estudió la distribución mediante citometría de flujo de CD14+/CD16-, CD14+/CD16+ y CD14low/-/CD16+, siguiendo la siguiente combinación de monoclonales: CD15FITC/CD64PE/CD33PerCP/CD16PECy7/CD14APC/CD38APC H7/HLA-DRV450/CD45V500. Las muestras fueron marcadas siguiendo los procedimientos estandarizados de Euroflow. Se adquirieron en un FACSCANTO (BD) los eventos necesarios para la adquisición de al menos 500000 eventos en el gate de CD64.

Resultados: Mediante la realización de la Curva ROC se estableció el punto de corte para la población monocítica tipo I o clásica de 97,4% con una sensibilidad de 81% y una especificidad 88%. Siendo el punto de corte el mismo (97,5%) que en nuestro estudio previo pero mejorando ligeramente la sensibilidad y especificidad (77,8% y 85% respectivamente). El valor predictivo positivo de la muestra fue 0.875 mientras que el valor predictivo negativo fue 0.81.

Conclusiones: El estudio de subpoblaciones monocíticas por citometría de flujo puede ser una herramienta válida en el diagnóstico diferencial de monocitosis reactiva versus LMMC. En este estudio, con el incremento de pacientes y controles hemos mejorado nuestra sensibilidad y especificidad de la prueba. Consideramos que este hecho no solo es debido al incremento de la n muestral sino también se vería influenciado por la certeza del diagnóstico de LMMC establecido por la clonalidad molecular.

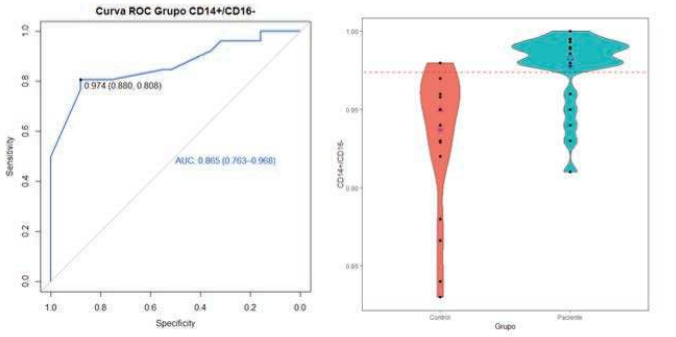

Figura 1.

PO-095

SOBREEXPRESIÓN DE BCL2 EN LA LMC

Sánchez Sosa S[1], López Rodríguez JF[2], Florido Ortega Y[2], Stuckey R[2], González San Miguel JD[3], Tapia M[4], Saez Perdomo MN[5], González Pérez E[2], Segura Díaz A[6], Molero Labarta MT[5], Bilbao Sieyro C[6], Gómez Casares MT[5]

[1]Hospital Universitario de GC DR. Negrín/ULPGC; [2]Hospital Universitario de GC Dr Negrín; [3]Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil; [4]Hospital General de La Palma; [5]Hospital Universitario de GC Dr Negrín/ULPGC; [6]Hospital Universitario de GC Dr Negrín/ULPGC

Introducción: La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa de las células madre hematopoyéticas que se caracteriza por la traslocación t(9;22)(q34;q11) que da origen al cromosoma Filadelfia (Ph) y al gen de fusión BCR/ABL1. Los fármacos inhibidores tirosina-kinasa (ITK) han demostrado su eficacia en el control de la enfermedad en fase crónica, pero en pacientes con crisis blástica (CB) o en Fase Acelerada (FA) la efectividad es muy inferior con una supervivencia media de sólo 6 meses. Las opciones terapéuticas en FA y CB son muy limitadas y por tanto se requieren nuevas terapias dirigidas para el tratamiento de estos pacientes.

Objetivos: Analizar el perfil de expresión de ARNm de *BCL2* en una serie de pacientes con CB o FA.

Métodos: Se analizaron muestras de un total de 31 pacientes diagnosticados entre 1998-2015, incluyendo: 14 CB o FA (mediana de edad, 63 años, rango 27-81); 14 LMC al diagnóstico en fase crónica, de ellos, 11 se estudiaron también cuando alcanzaron la respuesta molecular profunda (RMP) tras tratamiento con ITK, además se incluyeron 3 pacientes más en RMP para equiparar series (mediana de edad, 60,5 años, rango 50-85). Los niveles de expresión de *BCL2* se determinaron por RT-PCR en un LightCycler 480 II (Roche) utilizando *ABL* como gen control. Los resultados fueron normalizados con un pool de ARNm obtenido a partir de sangre periférica (SP) de 12 donantes sanos.

Resultados: Con respecto al pool de controles sanos, al que se le asignó un valor de referencia de expresión de *BCL2* igual a 1, se observó una media de expresión de 2.1 en los pacientes en RMP, de 5.41 en las CB/FA y de 6.61 en las LMC en fase crónica al diagnóstico.

Conclusión: Los niveles de expresión de *BCL2* en los pacientes con LMC en fase crónica al diagnóstico y en crisis blástica/fase acelerada fueron similares y muy superiores con respecto a los pacientes en RMP y al pool de donantes sanos. Se sabe que la progresión a CB está caracterizada por un aumento de la proliferación y detención de la diferenciación celular y de la apoptosis. Nuestros datos sugieren que la expresión del gen antiapoptótico *BCL2* no puede ser un biomarcador de la progresión en pacientes con LMC puesto que sus niveles no se ven aumentados en la transformación a Leucemia Aguda, a diferencia de lo que pasa con la LMA, pero sí se puede emplear como marcador de respuesta molecular, ya que en estos casos, existe un claro descenso de expresión en pacientes con RMP.

PO-096

UTILIDAD DE UN PANEL DE NGS MIELOIDE EN LA TROMBOCITEMIA ESENCIAL TRIPLE NEGATIVA (TE-TN)

López Muñoz N[1], Gutiérrez López de Ocáriz X[1], Carreño Gómez-Tarragona G[1], De Nicolás Sol R[1], Tejero F[1], Ayala Díaz R[1], Rapado I[1], Vera Guerrero E[1], Hidalgo Soto M[1], Buendía Ureña B[1], Poza Santaella M[1], Zamanillo Herreros I[1], Iñiguez García R[1], Martínez López J[1]

[1]Hospital Universitario[1 2] de Octubre

Introducción: El diagnóstico de la trombocitemia esencial supone en ocasiones un reto diagnóstico no solamente por la gran cantidad de trombocitosis secundarias sino por la existencia de las TE triples negativas (TE-TN) para las mutaciones canónicas de JAK2, MPL y CALR. La clasificación de la WHO de 2016 exige en los casos de TE-TN la ausencia de una causa reactiva o la identificación de un marcador clonal por lo que los paneles de genes mieloides por NGS podrían ser de gran utilidad. Presentamos la experiencia de nuestro centro en el uso de un panel mieloide para la identificación de marcadores clonales en TE-TN que pudieran ser útiles en el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes.

Métodos: Se incluyó una cohorte de 35 pacientes con TE en la que no se identificaron mutaciones en JAK2 V617F (RT-PCR), mutaciones canónicas tipo 1 y 2 de CALR (GENESCAN) ni mutaciones en el codón 515 (W515K y W515L) de MPL (RT-PCR). Las características de los pacientes aparecen representados en la Tabla 1. Realizamos una secuenciación de genes dirigida por NGS (Ion Torrent S5XL System-Thermofisher Scientific) utilizando un panel de 33 (antes de marzo de 2018) o 43 genes (después de marzo de 2018) implicados en el pronóstico de la leucemia mieloide aguda.

Resultados: Se identificaron mutaciones en 20 pacientes (57.1%) con una mediana de 2 mutaciones por paciente. Las mutaciones más frecuentemente identificadas fueron: TET2 (5; 14.3%), JAK2 (4; 11.4%) ETV6 (3; 8.6%) y KMT2A (3; 8.6%). El resto de genes sólo fueron identificados en una ocasión (2.9% cada uno) Figura 1. Se identificaron mutaciones no canónicas en genes driver en 6 pacientes (17.1%). Un paciente tenía dos mutaciones en MPL S505C y W515R, ya descritas en la literatura. Otra presentaba CALR K385del (en vez de la típica inserción). Por último un paciente tenía la mutación JAK2 Leu393Val (de significado incierto) y tres pacientes (hermanos) la mutación JAK2 Arg683Gly, descrita previamente en LLA pero no en NMPc ni trombocitosis familiares. Con una mediana de seguimiento de 4,44 años (0.02-25.48) la media de supervivencia global estimada fue 22.4 años sin alcanzarse la mediana (sólo dos pacientes habían fallecido). En cuanto el tiempo a evento este fue de 19.9 años (dos transformaciones a leucemia aguda, una progresión a mielofibrosis y un evento trombótico) sin alcanzarse la mediana. No se observaron diferencias en la supervivencia global o libre de evento entre los presentaban mutaciones y los que no (p=0.187 y p=0.514 respectivamente) aunque si una tendencia a una mayor supervivencia (Figura 2).Tampoco se identificó peor supervivencia en aquellos que acumulaban mayor número de mutaciones (p=0.343) ni diferencias entre la presencia o ausencia de mutaciones en genes driver (p=0.216).

Conclusión: Nuestro panel mieloide ha sido capaz de identificar clonalidad hasta en más de un 50% de los pacientes con TE-TN, permitiendo el diagnóstico de trombocitemia esencial. Aunque no hay diferencias significativas en cuanto a supervivencia global o libre de evento sí se observa una tendencia a una menor supervivencia en el grupo con clonalidad. Se necesitan cohortes más grandes para definir las características de estos pacientes así como el papel de las distintas mutaciones no driver en el pronóstico de estas enfermedades.

Tabla 1. Características clínicas, analíticas y tratamiento utilizado.

Características de los pacientes	
Media de edad	50.54
Sexo masculino (%)	31.4/68,6%
Factores de riesgo cardiovascular (%)	44
Hemograma al diagnóstico, media	
Hemoglobina (g/dl)	14.1
Plaquetas (x10^9/L)	824
Leucocitos (x10^9/L)	9.29
Anamnesis al diagnóstico	
Trombosis previa (%)	4.3
Hemorragia previa (%)	8.3
Clínica	
Evento hemorrágico (%)	4.3
Clínica microvascular (%)	16.7
Prurito (%)	4.3
Tratamiento	
Hidroxiurea (%)	65
Anagrelide (%)	16
Sin tratamiento citorreductor (%)	35
Aspirina (%)	100

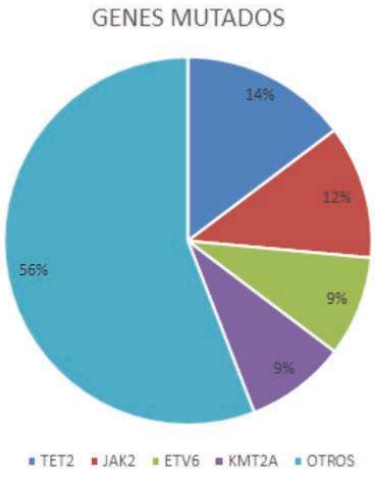

Figura 1. En esta grafica aparecen representados los genes en los que se han identificado mutaciones; así como el porcentaje de las mismas. En el grupo "otros" se incluyen los siguientes genes: VHL, WT1, SF3A1, DNMT3A, TP53, EPAS1, CBL, IDH1, TPHO, RUNX1, KIT, ASXL1, CALR, MPL, SF3B1, IDH2, SH2B3, EPOR, KRAS

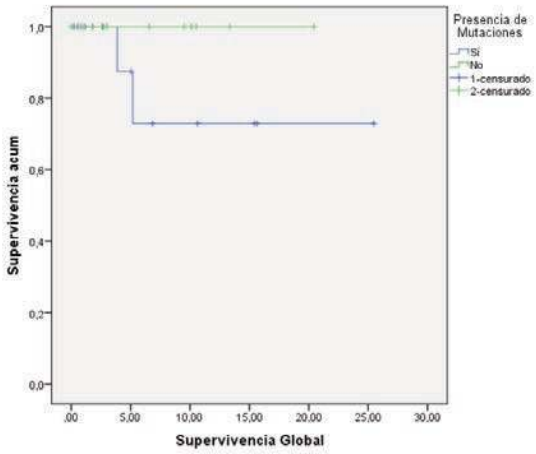

Figura 2. En esta grafica aparece representada la supervivencia global de los pacientes con TE, observándose como existe una tendencia a una mayor supervivencia en el grupo de pacientes que no presenta mutaciones aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.