



PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ESTUDIOS GERMINALES EN NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE PREDISPOSICIÓN GERMINAL A EN ADULTOS

1. MARCO DEL CONSENSO Y OBJETIVOS

Este documento representa un consenso del Grupo Cooperativo Andaluz de Neoplasias Hematológicas de Predisposición Germinal (GANHPG). Su objetivo es homogeneizar el procedimiento de obtención de muestras y procesamiento para el estudio genético confirmatorio de pacientes adultos con sospecha de predisposición germinal a neoplasias hematológicas, facilitando la homogeneidad y la comparabilidad entre centros. El protocolo es aplicable tanto en el diagnóstico inicial como durante la evolución.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Pacientes pertenecientes a centros de nuestra comunidad Andaluza con diagnóstico de Neoplasias Hematológicas mieloides (SMD, SMD/NMP, NMP Phi negativas, LMA), Linfoides, síndrome de fallo medular y Citopenias persistentes (>6 meses) de etiología no filiada, con especial énfasis en pacientes candidatos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

3. POBLACIÓN DIANA PARA ESTUDIO DE NHPG:

- Detección en panel somático-germinal ampliado de variantes en genes potencialmente germinales en pacientes con Neoplasias Hematológicas.
- Estudio dirigido a familiares de primer grado de portadores de variante germinal patogénica o probablemente patogénica.

1. INTRODUCCIÓN

En pacientes con neoplasias hematológicas, las células sanguíneas pueden contener mutaciones somáticas adquiridas que no forman parte del genoma constitucional. La presencia de estas variantes en muestras hematopoyéticas puede inducir errores en la interpretación genética, particularmente cuando se analizan genes implicados en predisposición germinal a neoplasias hematológicas.

La frecuencia alélica variante (*Variant Allele Frequency*, VAF) constituye un parámetro fundamental en la evaluación del origen de una variante genética. Las variantes germinales en heterocigosis suelen presentar VAF cercanos al 50%, reflejando su presencia en una de las dos copias génicas en todas las células nucleadas del organismo.

Sin embargo, en el contexto hematológico esta interpretación debe realizarse con cautela. Aunque los procesos de hematopoyesis clonal suelen asociarse a VAF inferiores al 50%, existen situaciones en las que una variante somática puede aproximarse a este valor, lo que dificulta la distinción entre origen germinal y adquirido. Entre estos escenarios se incluyen la expansión de un clon dominante, la pérdida de heterocigosidad somática o alteraciones en progenitores hematopoyéticos tempranos.

De acuerdo con las recomendaciones de las guías SEHH Germinales 2024, una VAF $\geq 30\%$ supone un criterio de sospecha de NHPG, si bien, no es suficiente por sí sola para confirmar el origen germinal de una variante cuando la muestra procede de sangre periférica o médula ósea, siendo necesaria la validación en tejidos no hematopoyéticos para una interpretación concluyente.

Es por ello que la identificación y confirmación de variantes genéticas de origen germinal en el contexto de predisposición familiar a neoplasias hematológicas representa un reto diagnóstico específico, principalmente debido a la posibilidad de contaminación de las muestras por células hematopoyéticas portadoras de alteraciones somáticas adquiridas. A diferencia de otras áreas de la genética clínica, en hematología no siempre es posible asumir que las fuentes convencionales de ADN reflejen fielmente el genoma constitucional del individuo, lo que obliga a una selección cuidadosa del tipo de muestra.

La distinción entre variantes germinales y somáticas es esencial tanto para el diagnóstico del paciente como para la evaluación del riesgo en familiares, la selección de donantes y la toma de decisiones terapéuticas. Por este motivo, la obtención de ADN a partir de tejidos no hematopoyéticos adquiere un papel central en protocolos de estudio de predisposición genética.

2. FUENTES DE ADN Y SUS LIMITACIONES

La selección de la fuente de ADN es un paso crítico en estudios de predisposición germinal en neoplasias hematológicas. Debe considerarse la pureza germinal de la muestra, la facilidad de obtención, la tolerancia del paciente y la calidad y cantidad de ADN obtenida.

A continuación, se describen las principales fuentes utilizadas en la práctica clínica y sus limitaciones.

A) Sangre periférica

La sangre periférica es la fuente más utilizada de ADN en genética clínica por su accesibilidad, facilidad de obtención y alto rendimiento de material genético. Sin embargo, presenta limitaciones importantes en pacientes con neoplasias hematológicas:

- Puede contener células hematopoyéticas mutados, que reflejan procesos somáticos y no germinales.
- Aunque se detecte una VAF cercana al 50%, que normalmente sugiere heterocigosidad germinal, esta puede corresponder a clones dominantes somáticos.

- La interpretación puede complicarse aún más debido a mutaciones tempranas en progenitores comunes.

Hay que tener en cuenta que en pacientes que alcanzan remisión completa morfológica (RCM) con enfermedad mínima residual (EMR) negativa tras tratamiento de leucemia aguda, suelen desaparecer las mutaciones somáticas previamente detectadas en sangre. Si, en este contexto, persiste una variante con VAF cercana a 50% en un gen sospechoso de predisposición germinal, esto pone sobre la pista de una neoplasia germinal, sugiriendo que la alteración no se originó en la célula tumoral sino que es constitucional. Esta observación refuerza la importancia de considerar el origen germinal de la variante incluso cuando la muestra hematopoyética parece libre de enfermedad activa.

En resumen, la sangre periférica puede aportar información valiosa en casos de remisión completa, pero sigue siendo necesario validar cualquier variante sospechosa en tejidos no hematopoyéticos para confirmar su origen germinal.

B) Linfocitos T CD3⁺ purificados

Para reducir la interferencia de mutaciones somáticas provenientes de clones mieloides, se ha utilizado la purificación de linfocitos T CD3⁺ a partir de sangre periférica. Esta estrategia busca enriquecer células linfoides no afectadas por la neoplasia mieloides, disminuyendo la posibilidad de que las variantes detectadas sean somáticas. Los métodos de purificación más comunes son la separación mediante microesferas magnéticas (MACS) y la Citometría de flujo y sorting celular (FACS).

- **Ventajas:**

- Enriquecen células de línea linfoides, reduciendo la presencia de mutaciones somáticas mieloides.
- Procedimiento relativamente no invasivo.

- **Limitaciones:**

- No elimina completamente las mutaciones clonales presentes en progenitores hematopoyéticos tempranos.
- En ocasiones, los linajes linfoides también pueden estar afectados por clones mutados, sobre todo en neoplasias mieloides con alteraciones tempranas en progenitores comunes.
- No sustituye la necesidad de confirmar variantes germinales en tejidos no hematopoyéticos.

Por tanto, la selección de linfocitos CD3⁺ puede ser útil como complemento en estudios de validación o cuando otras fuentes no son accesibles, pero no constituye una fuente definitiva para confirmación de variantes germinales.

C) Saliva y mucosa oral

La saliva y la mucosa oral recogida mediante hisopo, son métodos no invasivos y fáciles de recoger, lo que los hace atractivos para estudios de predisposición genética en contextos no hematológicos. La mayor parte del ADN proviene de células epiteliales descamadas, pero también se detectan leucocitos infiltrantes que provienen de la circulación sanguínea.

Limitaciones clínicas y técnicas:

- Los leucocitos infiltrantes pueden portar mutaciones somáticas adquiridas, generando falsos positivos o confundiendo la interpretación sobre el origen germinal.
- La cantidad de ADN obtenido puede ser variable y depende de la calidad de la recogida de la muestra.
- Aunque se han desarrollado técnicas para enriquecer células epiteliales y reducir leucocitos (centrifugación diferencial, lisis selectiva, separación inmunomagnética), estos métodos no están estandarizados en laboratorios clínicos y no eliminan completamente la contaminación hematopoyética.

En resumen, la saliva y la muestra de mucosa bucal no son una fuente fiable para la confirmación de variantes germinales en pacientes con neoplasias hematológicas, aunque pueden ser útiles para estudios exploratorios o en contextos de bajo riesgo.

D) Cultivo de fibroblastos dérmicos

El cultivo de fibroblastos a partir de biopsias cutáneas ha sido tradicionalmente considerado el estándar de referencia para la obtención de ADN germinal puro. Las células dérmicas derivan de tejido no hematopoyético, lo que minimiza la posibilidad de contaminación por clones somáticos hematopoyéticos, asegurando que las variantes detectadas correspondan al genoma constitucional del paciente. Sin embargo, existen limitaciones importantes a tener en cuenta:

- Procedimiento invasivo: habitualmente se propone un punch cutáneo de 2–3 mm de espesor, que puede proporcionar suficiente tejido para iniciar el cultivo; no obstante, en algunos laboratorios esta cantidad resulta insuficiente, por lo que se recurre a biopsias cutáneas de mayor tamaño (hasta de 2x2cm en nuestro caso), generalmente realizadas en quirófano. En estos casos, el procedimiento puede complicarse en pacientes inmunodeprimidos (heridas que no cicatrizan correctamente o se infectan) o en pacientes con trombocitopenia, aumentando el riesgo de sangrado.
- Tiempo prolongado de cultivo: se requiere un periodo mínimo de **tres semanas** para obtener un número adecuado de fibroblastos, lo que hace que el procedimiento sea lento y más complejo que otras fuentes de ADN, con posibilidad de fallo en el crecimiento celular.
- Infraestructura necesaria: el cultivo de fibroblastos requiere laboratorios especializados y personal entrenado.

Por estas razones, el cultivo de fibroblastos debe reservarse para **casos seleccionados**, por ejemplo, en pacientes que han sido sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos y en los que es necesario confirmar una variante germinal, pero no **es posible acceder a muestras de folículos pilosos** porque el cabello se ha perdido o está debilitado. En estos escenarios, los fibroblastos constituyen una alternativa de gran fiabilidad para la obtención de ADN germinal. (Duncavage et al., PubMed 2019) (Duncavage et al., PubMed 2019)

E) Folículos pilosos con bulbo

La obtención de ADN a partir de folículos pilosos con raíz representa actualmente la fuente preferida en la práctica clínica para la confirmación de variantes germinales en neoplasias hematológicas:

- **Ventajas:**

- Procedimiento mínimamente invasivo, bien tolerado por los pacientes.
- ADN derivado de células **no hematopoyéticas**, con mínimo riesgo de contaminación por clones somáticos.
- Extracción rápida y reproducible, con cantidad suficiente de ADN para estudios moleculares.

- **Limitaciones:**

- Requiere manipulación cuidadosa para preservar el bulbo y evitar contaminación externa.
- Puede ser necesario obtener múltiples unidades de folículos para asegurar la cantidad de ADN suficiente.

En situaciones de pérdida de cabello o bulbos debilitados, puede ser necesario recurrir a otras fuentes de tejido no hematopoyético.

En conclusión, los folículos pilosos son una fuente óptima para estudios de confirmación de variantes germinales, combinando rapidez, seguridad y calidad de ADN, y actualmente considerada una buena primera opción en protocolos de laboratorio clínico.

✓ **PROTOCOLO PARA TOMA DE MUESTRA DE FOLÍCULO PILOSO DE CABELLO:**

1. Objetivo:

Descripción del procedimiento a seguir para la toma de muestras de cabello de pacientes, destinadas a la extracción de ADN a partir de los folículos pilosos.

2. Material:

- Bata
- Gorro
- Gafas de laboratorio
- Pinzas
- Papel de aluminio
- Tubo cónico de 50 ml

3. Procedimiento:

3.1. Precauciones para la persona que realiza la extracción:

- Cubrir los cabellos con un gorro.
- Cubrir los brazos con bata de manga larga.
- Llevar gafas de laboratorio o gafas propias.
- Cubrir el rostro con mascarilla si se tiene barba.

3.2. Extracción de cabellos y obtención de folículos pilosos:

- Utilizar pinzas para arrancar los cabellos de raíz.
- Se necesita un mínimo de 25 cabellos con bulbo.
- Los cabellos pueden provenir de la cabeza, cejas, barba, brazos o piernas; seleccionar los más fuertes.
- Depositar los cabellos en papel de aluminio.
- Guardar el papel de aluminio dentro de un tubo cónico de 50 ml, identificado con el número de petición del paciente.

3.3. Criterios de rechazo:

- Cabellos cortados, sin folículo piloso.
- Muestra identificada incorrectamente.

✓ PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN MANUAL DE ADN A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE FOLÍCULO PILOSO:

La extracción de ADN se lleva a cabo utilizando el kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), un sistema diseñado para aislar ADN genómico de forma rápida y reproducible a partir de diversas fuentes biológicas, incluidas células de cultivo, sangre, médula ósea y tejidos como los folículos pilosos. El método se basa en una serie de pasos secuenciales que permiten lisar las células, capturar el ADN y separar las impurezas mediante un proceso de unión selectiva, lavado y elución, sin necesidad de emplear solventes orgánicos ni pasos de precipitación complejos. El ADN obtenido está libre de proteínas, nucleasas y otros inhibidores que puedan interferir en reacciones posteriores, por lo que está listo para su uso en PCR u otras técnicas de biología molecular.

1. Material, Instrumentos y Reactivos:

▪ Material:

- Bata
- Guantes
- Gorro
- Gafas de laboratorio
- Tijeras
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Pipetas de 100µl y 1000µl
- *Kit QIAamp DNA Mini Kit* (51304, Qiagen), que contiene:
 - *Spin Columns* con filtro
 - *Collection Tubes* (tubos de recogida de 2ml)

▪ Instrumentos:

- Termobloque con agitador para tubos de 1,5ml
- Microcentrífuga
- Vórtex

- **Reactivos**

- *Kit QIAamp DNA Mini Kit* (51304, Qiagen), que contiene:

- Tampon ATL
 - Proteinasa K
 - Tampon AL
 - Tampon AW1
 - Tampon AW2
 - Tampon AE (se puede sustituir por agua de biología molecular)

- Etanol 100%

2. Procedimiento:

- **Precauciones para la persona que realiza la extracción:** Para evitar la contaminación de la muestra con cabellos externos, la persona encargada de la extracción debe cubrirse adecuadamente. Es necesario usar un gorro que cubra completamente el cabello, vestir bata de manga larga, y proteger los ojos con gafas de laboratorio o gafas propias. En caso de tener barba, se debe cubrir el rostro con una mascarilla. Estas medidas ayudan a garantizar la pureza de la muestra y la fiabilidad del ADN obtenido.

- **Extracción:**

- *Todas las centrifugaciones se realizarán a temperatura ambiente.*

1. Con unas pinzas y tijeras previamente desinfectadas con lejía al 10%, cortar los cabellos a una longitud aproximada de 1 cm y transferir la porción que contiene el bulbo a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Si no es posible cortar los cabellos por estar ya cortos o porque se observan pocos bulbos, se debe introducir la totalidad de los cabellos previamente almacenados en papel de aluminio directamente en el tubo de 1,5 ml.

2. Anadir 300 µL de tampón ATL al tubo con los cabellos

3. Anadir 20 µL de proteinasa K

4. Vórtex 15s

5. Agitar 1 h a 56 °C en el termobloque con agitador

6. *Spin* en microcentrífuga para recolectar todo el líquido en el fondo del tubo.

7. Anadir 300 µL de tampón AL

8. Anadir 300 µL de Etanol 100% ⇒ vórtex ⇒ *spin* breve

9. Transferir 600 µL de la muestra a una *spin column* ⇒ centrifugar 1 min a 6.000 xg

10. Cambiar el tubo de recogida por un nuevo

11. Transferir el resto de la muestra (~300 µL) a la *spin column* ⇒ centrifugar 1 min a 6.000 xg

12. Cambiar el tubo de recogida por un nuevo

13. Anadir 500 µL de tampón AW1 a la columna sin tocar el filtro ⇒ centrifugar 1 min a 6.000 xg

14. Cambiar el tubo de recogida por un nuevo

15. Anadir 500 µL de tampón AW2 a la columna sin tocar el filtro ⇒ centrifugar 3 min a máxima velocidad

16. Cambiar el tubo de recogida por un nuevo

17. Centrifugar 1 min a máxima velocidad

18. Transferir la *spin column* al tubo final de recogida del DNA (tubo eppendorf de 1,5ml)
19. Anadir 25 μ L de tampón AE o agua de biología molecular
20. Incubar 1 min a temperatura ambiente
21. Centrifugar 1 min a 6.000 xg
22. Transferir el eluido de nuevo a la misma *spin column*
23. Incubar 1 min a temperatura ambiente
24. Centrifugar **1 min a 6.000 xg**
25. Identificar completamente el tubo final de la muestra
26. Podemos hacer un paso adicional: añadir otros 25 μ L de tampón AE a la *spin column* colocada sobre un nuevo tubo eppendorf de 1,5ml. Incubar 1 min a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 6.000 xg. Este segundo eluido permite arrastrar el ADN residual retenido en la columna, incrementando el rendimiento total de la extracción.

3. Control de calidad/verificación del procedimiento

Para comprobar que la extracción se ha realizado correctamente y que se ha obtenido ADN de calidad y en cantidad suficiente, las muestras se analizan mediante *Nanodrop*, un equipo de cuantificación y medición espectrofotométrica de ácidos nucleicos. La concentración de ADN se determina en ng/ μ L, considerando adecuadas aquellas muestras con valores superiores a 10 ng/ μ L.

La calidad del ADN purificado se evalúa mediante los ratios de absorbancia A260/A280 y A260/230. Los valores recomendados para A260/A280 se encuentran entre 1,8 y 2,0, y para A260/230 entre 1,6 y 2,4, lo que indica ausencia de contaminantes proteicos y de sales u otros inhibidores.

Si el ADN se va a emplear en técnicas de secuenciación masiva, se recomienda realizar una cuantificación adicional mediante método fluorimétrico (*Qubit*, Thermo Fisher), considerando igualmente adecuadas concentraciones superiores a 10 ng/ μ L.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016 Oct 6;128(14):1800-1813. doi: 10.1182/blood-2016-05-670240. Epub 2016 Jul 28. PMID: 27471235; PMCID: PMC5813725.
2. Padron E, Ball MC, Teer JK, Painter JS, Yoder SJ, Zhang C, Zhang L, Moscinski LC, Rollison DE, Gore SD, Bejar R, Walter MJ, Sekeres MA, Komrokji RS, Epling-Burnette PK. Germ line tissues for optimal detection of somatic variants in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2018 May 24;131(21):2402-2405. doi: 10.1182/blood-2018-01-827881. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29661788; PMCID: PMC5969383.
3. Trottier, A. M., & Godley, L. A. (2021). Inherited predisposition to haematopoietic malignancies: overcoming barriers and exploring opportunities. *British Journal of Haematology*, 194(4), 663-676.
4. Baliakas P, Tesi B, Wartiovaara-Kautto U, Stray-Pedersen AR, Friis LS, Dybedal I, et al. Nordic Guidelines for germline predisposition to myeloid neoplasms in adults: Recommendations for genetic diagnosis, clinical management and follow-up. *Hemasphere* (2019) 3:e321. doi: 10.1097/HS9.0000000000000321
5. Schlegelberger B, Mecucci C, Wlodarski M. Review of guidelines for the identification and clinical care of patients with genetic predisposition for hematological malignancies. *Familial Cancer* (2021) 20:295–303. doi: 10.1007/s10689-021-00263-z
6. Kraft IL, Godley LA. Identifying potential germline variants from sequencing hematopoietic malignancies. *Blood* (2020) 136:2498–506. doi: 10.1182/blood.2020006910.
7. Feurstein S, Drazer M, Godley LA. Germline predisposition to hematopoietic malignancies. *Hum Mol Genet* (2021) 30:R225–35. doi: 10.1093/hmg/ddab141