



EUROPEAN
HEMATOLOGY
ASSOCIATION

haematologica

Journal of the European Hematology Association
Published by the Ferrata Storti Foundation

**LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española
de Hematología y Hemoterapia
Málaga, 26-28 octubre 2017**

ABSTRACT BOOK

ISSN 0390-6072

Volume 102
OCTOBER
2017 | **s4**

gopatía fue más frecuente en LAP con síntomas hemorrágicos ($p=0.05$), con una mayor frecuencia de trombopenia severa ($p=0.01$), fibrinógeno alterado ($p=0.03$) y mayor infiltración blástica tanto en MO como en SP ($p\leq 0.003$). La expresión de marcadores de línea de basófilo (CD203c y/o CD22) se asocia a una mayor frecuencia y severidad de la diátesis hemorrágica al diagnóstico y tras tratamiento. Así, los pacientes con sangrado leve y severo vs LAP sin rasgos hemorrágicos muestran con mayor frecuencia blastos CD203c+, tanto al diagnóstico (25% y 87% vs 13%; $p<0.001$) como tras iniciar el tratamiento (20% y 80% vs 18%; $p<0.001$) junto a la (co)expresión aberrante de CD7 y CD34+CD7+ ($p\leq 0.009$) y ausencia de expresión de CD71, particularmente en LAP con sangrado tras tratamiento ($p=0.008$). Asimismo, la proporción de blastos CD203c+ aumenta significativamente tanto en MO como en SP de pacientes con hemorragia severa y leve al diagnóstico ($p<0.001$) y tras tratamiento ($p\leq 0.007$). Destaca que la presencia de blastos CD203c+ (en MO y SP; $p\leq 0.001$) y CD22+ ($p=0.005$), leucocitosis e infiltración blástica ($>30\times 10^9/L$; $p\leq 0.001$) y edad avanzada (>70 años; $p=0.005$) se asoció a una supervivencia libre de sangrado severo significativamente inferior, mientras la presencia de blastos CD203c+ ($p=0.007$), leucocitosis y elevada infiltración blástica ($p\leq 0.03$), edad avanzada ($p=0.01$), fibrinógeno e INR alterados ($p\leq 0.02$), co-expresión de CD56+CD7+ y trombopenia severa ($p=0.04$), se asoció a una supervivencia inferior. El análisis multivariante refleja que la expresión de CD203c ($HR=26.4$) y edad avanzada ($HR=5.4$) son los parámetros con mayor valor predictivo para sangrado severo tras tratamiento.

Conclusiones: La presencia de rasgos de diferenciación a basófilo en blastos de LAP se asocia a sangrado severo, probablemente por liberación de mediadores vasoactivos por parte de estas células.

CO-107

DETECCION DE LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL (EMR) EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA MEDIANTE SECUENCIACION DE ALTA PROFUNDIDAD

Onecha De La Fuente E.¹, Rapado I.¹, Cedena T.¹, Llopos M.², Ruiz Heredia Y.¹, Garcia Vela J.A.³, Perez Oteyza J.⁴, Figuera Á.⁵, Peñalver F.J.⁶, Barragan E.⁷, Gallardo M.¹, Martinez Lopez J.¹, Ayala R.¹

¹Hematología traslacional, Hospital 12 de Octubre, Madrid. ²Haematological Malignancies Clinical Research Unit, CNIO, Madrid, ³Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, ⁴Hospital Universitario de Getafe, Madrid, ⁵Hospital Universitario HM Sanchinarro, Madrid, ⁶Hospital de la Princesa, Madrid, ⁷Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid, ⁸Clinical Pathology Service, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia

Introducción: La detección de la Enfermedad Mínima Residual (EMR) mediante marcadores moleculares en Leucemia Mieloide Aguda (LMA) podría mejorar el pronóstico de recaída durante la remisión. Métodos tradicionales para medir EMR, PCR a tiempo real o citometría de flujo, están condicionados a gran complejidad técnica y baja aplicabilidad. Además, pacientes que alcanzan negatividad en la EMR (EMR-) recaen posteriormente, y gran cantidad de pacientes con EMR positiva (EMR+) presentan una larga supervivencia, indicando que la sensibilidad y especificidad de técnicas tradicionales deberían ser contrastadas o sustituidas por otras de nueva generación.

Objetivos: Estudio de la secuenciación de alta profundidad como una nueva técnica altamente precisa y reproducible para la detección de EMR durante el seguimiento en pacientes con LMA.

Métodos: Se seleccionaron 134 muestras en remisión completa (post-inducción, post-primer consolidación, post-segunda consolidación) de 80 pacientes con LMA tratados según protocolos clínicos PETHEMA han sido estudiadas. Las muestras al diagnóstico de los 30 casos fueron secuenciadas mediante Ion Torrent (Thermo Fisher System), usando un panel propio de 32 genes: ASXL1, CBL, DNMT3A, EPOR, ETV6, EZH2, FLT3, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, KDM6A, KIT, KRAS, LNK, MLL, MPL, NRAS, PHF6, PRPF40B, PTEN, RUNX1, SF1, SF3A1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF35, VHL, ZRSR2 y CALR. Además FLT3-ITD fue detectado por GENSCAN y NPM1 por PCR. Se usaron primers específicos para amplificar regiones concretas en las muestras de seguimiento que abarcan 4 de las alteraciones más frecuentes al diagnóstico: FLT3 no-ITD ($n=2$), NPM1 ($n=62$), IDH2 ($n=9$) e IDH1 ($n=7$). La anotación de variantes al diagnóstico, se realizó con *RUBioSeq* y con un pipeline bioinformático personal para las muestras de seguimiento. El análisis estadístico de 54 de las 134 muestras totales (resto pendiente de análisis) se realizó con *IBM SPSS Statistics*.

Resultados: La sensibilidad de la técnica para detectar variantes alélicas en términos de frecuencia alélica fue de 10-4 para mutaciones puntuales y 10-5 para InDels (calibración con curvas de sensibilidad/especificidad). De esta manera el estudio de la frecuencia alélica mediante curva ROC, sensibilidad=0,5 y especificidad=0,92 en Supervivencia Libre de Evento (SLE); sensibilidad=0,57 y especificidad=0,89 en Supervivencia Global (SG); nos permite establecer el punto de corte de frecuencia alélica en 0,0017 donde valores superiores a 0,0017 definen muestras EMR+ y valores inferiores EMR-. Los casos EMR+ se comportan como marcadores independientes tanto para SLE ($p=0,002$) como para SG ($p=0,002$) donde la supervivencia se acorta en el grupo EMR+ respecto al grupo EMR-, Figura 1.

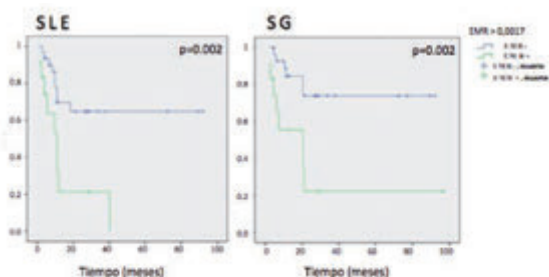


Figura 1. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para Supervivencia Libre de Evento (SLE; $p=0.002$; $HR=0.33$; 95% CI: 1.60-33.31), y Supervivencia Global (SG; $p=0.002$; $HR= 8.33$; 95% CI: 1.87-37.15) en pacientes con EMR positiva ($EMR > 0.0017$).

Figura 1.

Conclusiones: La secuenciación de alta profundidad es una técnica que ofrece la capacidad de identificar y medir el nivel de expresión de EMR; puesto que la evaluación de EMR por esta tecnología presenta una mejor predicción de SLE y SO que otros métodos tradicionales. Apoyando así el papel de la evaluación de EMR mediante NGS dentro del contexto de la Biología Molecular. La implementación de la NGS en la práctica asistencial para detectar y cuantificar EMR podría ser útil para predecir la progresión de la enfermedad, anticiparse a la recaída y planificar el tratamiento óptimo.

CO-108

ENSAYO CLÍNICO OBSERVACIONAL PARA LA VALIDACIÓN DE UN TEST DE MEDICINA DE PRECISIÓN EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Montesinos P.¹, Ballesteros J.², Martínez Cuadrón D.¹, Martínez López J.³, Bergua J.⁴, Serrano J.⁵, Pérez de Oteyza J.⁶, Tormo M.⁷, Fernández P.⁸, Vidriales B.⁹, Vives S.¹⁰, Rodríguez Macías G.¹¹, Herrera P.¹², García R.¹³, Fernández M.¹⁴, Lavilla E.¹⁵, Pérez Simón J.A.¹⁶, Jiménez S.¹⁷, Simiele A.¹⁸, González A.¹⁹, González B.²⁰, Burgaleta C.²¹, Hernández Rivas J.A.²², Colorado M.²³, Sanz M.¹

¹Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, ²Vivia Biotech, Madrid, ³Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, ⁴Hospital San Pedro de Alcántara, ⁵Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, ⁶Hospital Universitario Sanchinarro, Madrid, ⁷Hospital Clínico Universitario de Valencia, ⁸Hospital General Universitario de Alicante, ⁹Hospital Clínico Universitario de Salamanca, ¹⁰Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, ¹¹Hospital Gregorio Marañón, Madrid, ¹²Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, ¹³Hospital General Universitario de Castellón, ¹⁴Hospital Xeral Cies, Vigo, ¹⁵Hospital Lucus Augusti, Lugo, ¹⁶Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, ¹⁷Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, ¹⁸Hospital Povisa, Vigo, ¹⁹Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, ²⁰Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, ²¹Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, ²²Hospital Infanta Leonor, Madrid, ²³Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander

Introducción: El esquema de inducción "3+7", combinando una antra-ciclina con citarabina, es el estándar terapéutico para la leucemia mie-loide aguda (LMA). Sin embargo, existen unos 45 tratamientos validados entre las guías clínicas internacionales, actuales o pasadas, y los ensayos clínicos publicados. El objetivo de nuestro trabajo es proporcionar datos factibles para mejorar el manejo de la enfermedad y alcanzar remisión completa con los tratamientos existentes, mediante un test de medicina de precisión que guíe al hematólogo entre todos los tratamientos posibles para cada paciente individual.

Métodos: Las muestras de médula ósea de pacientes adultos con LMA se recibieron en el laboratorio 24h después de la extracción y se incubaron durante 48h en placas de 96 pocillos con los fármacos individuales o en combinación, representando hasta 45 tratamientos diferentes. El análisis se realizó mediante citometría de flujo en la plataforma automatizada PharmaFlow. Las respuestas farmacológicas ex vivo se calcularon utilizando modelos farmacocinéticos poblacionales. Los pacientes que alcanzaron RC/RCi fueron clasificados como respondedores y los restantes como resistentes, excluyendo muertes tempranas. El score final y la clasificación de los tratamientos se basa en un algoritmo terapéutico que integra la actividad ex vivo, midiendo por un lado la potencia y eficacia de cada fármaco individual e integrando estos valores en un único valor, que corresponde a la medida de la superficie situada bajo la curva de dosis-respuesta (AUC), y por otro lado midiendo el sinergismo entre fármacos mediante un ajuste a modelos de superficie de interacción. El test de MP intenta identificar al menos un tratamiento, entre todas las alternativas evaluadas, para el cual las células del paciente sean quimiosensibles.

Resultados: El método del score que utiliza el test de MP se testó utilizando los resultados ex vivo de 123 pacientes con LMA de novo, que recibieron tratamiento de inducción estándar 3+7 con Idarubicina y Citarabina (IDA-CIT). El score predice con un 90% de exactitud a los pacientes sensibles a este tratamiento. Esta precisión puede compararse con la obtenida en un estudio de correlación clínica independiente donde se identificó a los pacientes sensibles con un 92% de exactitud, representando el nuevo score una versión simplificada de este algoritmo de correlación clínica. Mientras que la correlación sólo es válida para IDA-CIT, el test de MP puede ser aplicado hasta a 45 tratamientos diferentes. Este test de MP puede proporcionar una información valiosa a los hematólogos sugiriendo el tratamiento más sensible para cada paciente en particular (Figura 1A, 1B) o bien derivar al paciente a un ensayo clínico con nuevos fármacos cuando presente resistencia a todos los tratamientos ensayados (Figura 1C).

Colado Varela E.³, Berkovits A.¹, Martín Martín L.¹, Van der Velden V.⁴, Barrera S.¹, López A.¹, Van Dongen J.⁵, Orfao A.¹

¹Servicio de Citometría (NUCLEUS), Departamento de Medicina. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC), ²Hospital Universitario de Getafe. Madrid, ³Hospital Central de Asturias, ⁴Department of Immunology, Erasmus MC. Rotterdam. Holanda, ⁵Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden. Holanda

Introducción: El importante desarrollo de la citometría de flujo (CMF) ha aportado un conocimiento preciso de los patrones de diferenciación y maduración hematopoyética normal en médula ósea (MO). No obstante, la persistencia de alteraciones fenotípicas (multilineales), junto con la relativa frecuencia de monocitosis en la regeneración hematopoyética tras tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) dificulta notablemente el estudio de enfermedad residual (EMR) en LMA monoclonal/monocítica (LMMA) mediante CMF convencional. La CMF de "alto rendimiento" mediante el empleo de bases de datos de maduración normal proporciona una elevada sensibilidad en la detección de alteraciones fenotípicas y bloqueos madurativos de la hematopoyesis (potencialmente) clonal mediante un análisis comparativo objetivo, automático y multiparamétrico. En este trabajo cuantificamos y evaluamos por primera vez las alteraciones presentes en blastos y células monocíticas en regeneración durante el seguimiento de pacientes con LMMA y su asociación con la recaída de la enfermedad.

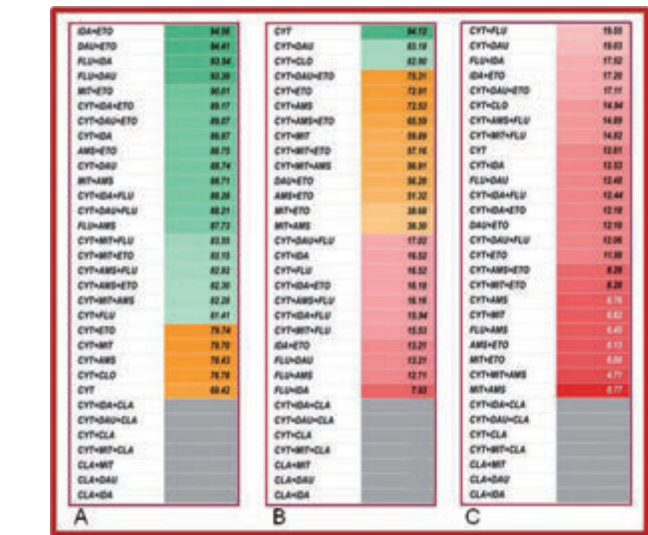


Figura 1. Clasificación de los tratamientos según el score del test de MP en tres pacientes representativos. El score está codificado por una escala de color según los colores de un semáforo.

Conclusiones: El nuevo test ex vivo de MP incluye 45 tratamientos validados para la terapia de inducción en pacientes con LMA y puede guiar al hematólogo a seleccionar el tratamiento más adecuado para lograr RC en pacientes individuales. Este test se evaluará en un ensayo clínico intervencional en pacientes en recaída o refractarios, que se espera que comience en el segundo semestre del año, en colaboración con el grupo PETHEMA.

CO-109

MONITORIZACIÓN DE ALTERACIONES MONOCÍTICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE ALTO RENDIMIENTO DURANTE EL SEGUIMIENTO Y RECAÍDA DE LA LEUCEMIA AGUDA MONOBLÁSTICA/MONOCÍTICA

Matarráz S.¹, Leoz P.¹, Fernandez C.¹, Lecrevisse Q.¹, Yeguas Bermejo A.²,

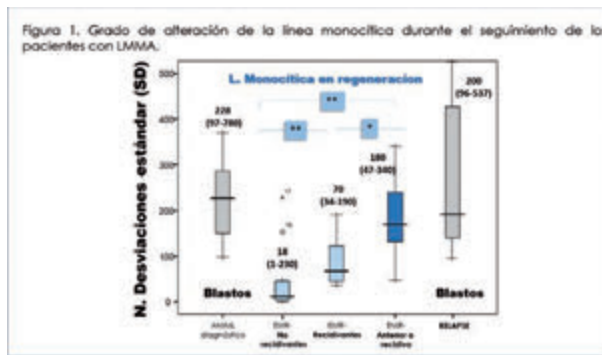


Figura 1.

Métodos: Estudiamos retrospectivamente 70 muestras de MO pertenecientes al diagnóstico (n=18) y seguimiento (n=52) de pacientes con LMMA mediante un único tubo dirigido al estudio de la maduración monocítica (EuroFlow). De acuerdo a PETHEMA, 10/18 pacientes mostraron remisión completa y EMR- en los distintos puntos del seguimiento, mientras 8/10 recidivaron. En total, se recogieron 25/52 muestras con EMR- (por CMF convencional) y 27/52 en recaída. Todos los estudios fenotípicos fueron reevaluados vs una base de datos de maduración monocítica normal construida a partir de (n=94) MO de donantes sanos e integrada en el Software Infinicyt (Cytognos). En todas las muestras, la evaluación del grado de alteración monocítica se realizó mediante el recuento de desviaciones estándar (SD) vs la base de datos para cada parámetro estudiado (intervalo de confianza del 95%). La mediana de seguimiento fue de 5.7 meses.

Resultados: Todas las LMMA (100%) mostraron alteraciones fenotípicas, tanto en blastos como en la línea monocítica en regeneración (EMR-). Previsiblemente, la población de blastos mostró múltiples alteraciones fenotípicas vs la base de referencia, tanto al diagnóstico como en la recaída de la enfermedad (mediana: 228 y 200 SD, respectivamente). Sin embargo, al diagnóstico se observó una tendencia a un mayor número de alteraciones en blastos de pacientes recidivantes vs aquellos con EMR- tras tratamiento (280 vs 189 SD; p>0.05). Cabe destacar que la frecuencia de alteraciones en células monocíticas en regeneración (EMR-) de casos posteriormente recidivantes fueron significativamente superiores vs aquellos con EMR- en todos los puntos del seguimiento (70 vs 18 SD; p<0.001). Además, los casos recidivantes mostraron un número máximo de alteraciones en los estudios (EMR-) inmediatamente anteriores a la recaída de la enfermedad (180 vs 70 SD; p=0.04).

Conclusiones: La CMF de alto rendimiento podría ser relevante en el seguimiento de las LMA mediante la detección de alteraciones asociadas a la recaída de la enfermedad previas a la expansión tumoral.