



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 0390-6073

Volume 102
OCTOBER
2017 | **s4**

5.222€ y 6.090€, respectivamente por lo que, el ahorro por el coste total asociado al cuidador fue de 202.155€ (10.640€/paciente y 1.419€/ciclo). Por tanto, la AZA-UHD generó un ahorro total de 207.37€ (ahorro medio de 10.915€/paciente y 1.455€/ciclo) durante el periodo de estudio (Figura 1). De los 19 pacientes con AZA-UHD, 9 contestaron el cuestionario y todos preferían recibir el tratamiento en domicilio con un alto nivel de satisfacción.

Conclusiones: La administración de 5-AZA en pacientes de edad avanzada tiene gran impacto económico y social. El coste de la AZA-UHD es tres veces menor que la administrada en HD junto a una mejoría en la calidad de vida tanto de los pacientes, que no tienen que desplazarse al centro, como de sus cuidadores, que no pierden jornada laboral.

CO-050

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA Y FOSFOPROTEÓMICA INTEGRADA DE LAS CÉLULAS B TUMORALES DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS

Díez P.¹, Droste C.², Almeida J., González M.³, Orfao A., De La Rivas J.², Fuentes M.¹

¹Departamento de Medicina y Servicio General de Citometría-Nucleus. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC/CSIC/USAL/IBSAL), 37007 Salamanca, España/Unidad de Proteómica. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC/CSIC/USAL/IBSAL), 37007 Salamanca, España, ²Grupo de Bioinformática y Genómica Funcional. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC/CSIC/USAL/IBSAL), 37007 Salamanca, España, ³Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca (IBMCC/IBSAL), 37007 Salamanca, España

Introducción: La leucemia linfocítica crónica (LLC), caracterizada por una elevada heterogeneidad genómica, es el cáncer hematológico más común en los países occidentales. A pesar de que el genoma de la LLC ha sido analizado exhaustivamente, sus perfiles proteicos (incluyendo el estudio de las modificaciones post-traduccionales) aún no han sido completamente investigados hasta el momento. Esta caracterización es crítica para comprender la transformación maligna de las células LLC. En el presente estudio se propuso investigar, por primera vez, el fosfoproteoma cuantitativo completo de células B tumorales de pacientes con LLC y linfocitosis monoclonal de célula B (LMB) mediante el empleo de técnicas de alta resolución basadas en espectrometría de masas (MS).

Métodos: Las células B tumorales de 4 pacientes con LLC y un paciente con LMB fueron purificadas mediante citometría de flujo y procesadas para obtener su contenido proteico total. Dichas proteínas fueron digeridas con tripsina y los péptidos resultantes fueron analizados mediante una aproximación LC-MS/MS precedida del enriquecimiento en péptidos fosforilados a través del uso de esferas portadoras de un anticuerpo dirigido frente a motivos antifosfotirosinas. Los resultados fueron evaluados usando SEQUEST y la plataforma Core de la Universidad de Harvard.

Resultados: Se identificaron 2.970 proteínas y 327 fosfoproteínas (incluyendo 329 fosfopéptidos detectados por primera vez). En relación al proteoma, se observó un elevado solapamiento (73%) entre las muestras; sin embargo, los fosfoproteomas variaron significativamente. A pesar de esta heterogeneidad, las células tumorales estudiadas mostraron fosfoproteínas comunes entre las que destacan aquellas implicadas en la señalización del BCR, interacciones celulares y la ruta NF- κ B/STAT3. Cabe destacar que estos perfiles fosfoproteómicos eran independientes de las alteraciones citogenéticas y/o estado mutacional IGHV de las células tumorales. A pesar de la gran similitud observada entre células LLC y LMB, se detectaron, entre otros, niveles distintos de fosforilación de ARIH2 y PTPN11, proteínas implicadas en la apoptosis celular, lo que sugiere un papel importante de ambas moléculas en el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, se detectaron proteínas expresadas de forma única por muestras independientes (como DYNL1, RFWWD3, y PIK3R4). Además, y en relación a la señalización del BCR, se identificaron numerosas proteínas (LYN, SYK, PI3K, BTK, ZAP70, PLCG3, ERK, NFAT, CD19, PRKCB, NFKB, JNK y VAV) sugiriendo el importante papel que juega esta ruta en el mantenimiento/supervivencia de las células tumorales de LLC y LMB.

Conclusiones: El presente estudio ha proporcionado nuevas perspectivas en relación a los proteomas y fosfoproteomas de células LLC y LMB así como en relación a las rutas de señalización inmune implicadas en el desarrollo y progresión de dichos tumores.

Financiación: ISCIII (PI12/00905, PI14/01538, PT13/0001). Fondos

FEDER (EU) y Junta Castilla-León (BIO/SA07/15, JCYL-EDU/346/2013). Fundación Solórzano (FS23/2015).

CO-051

NUOVO MODELO PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA IN VITRO DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS EN HEMOPATÍAS MALIGNAS

Primo D.¹, Martínez Cuadrón D.², Montesinos P.², De la Serna J.³, Ribera J.M.⁴, Vives S.⁴, Bergua J.⁵, Pérez de Oteyza J.⁶, Serrano J.⁷, Gorrochategui J.¹, Vicente M.¹, Gómez C.¹, Martínez López J.³, Hernández P.¹, Ballesteros J.¹

¹Vivia Biotech, Madrid, ²Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia, ³Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, ⁴Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, ⁵Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, ⁶Hospital Universitario Sanchinarro, Madrid, ⁷Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba

Introducción: La plataforma automatizada de citometría de flujo (CMF) PharmaFlow ha logrado una correlación clínica del 85% en LMA. Recientemente, se están utilizando nuevos anticuerpos biespecíficos (AcBs) o construcciones análogas como inmunoterapia, que actúan mediante la formación de una sinapsis inmunológica entre células T (CD3) y un antígeno de superficie asociado a tumor (TAA) provocando la activación de células T y la lisis en serie de células tumorales. El objetivo de este estudio es desarrollar un ensayo *in vitro* que incorpore múltiples variables para cuantificar mejor la actividad de los AcBs y capturar la variabilidad entre pacientes.

Métodos: Se han analizado 31 muestras de LMA con el AcBs CD123xCD3 (Creative Biolabs), 7 LLC y 3 LLA-B con Blinatumomab (CD3xCD19) utilizando 8 concentraciones diferentes del AcBs correspondiente y ensayando distintos tiempos de incubación (24h a 144h). La cuantificación basal del TAA se realizó mediante CMF. La plataforma PharmaFlow cuenta eficientemente el número de células tumorales que mueren por cada célula T activada, concepto que denominamos "Effective E:T ratio", donde el efector (E) es la célula T CD25+ activada y la diana (T; target) es la célula tumoral. Para evaluar la potencia y la eficacia se calculó tanto la EC₅₀ como la Emax en los distintos tiempos medidos.

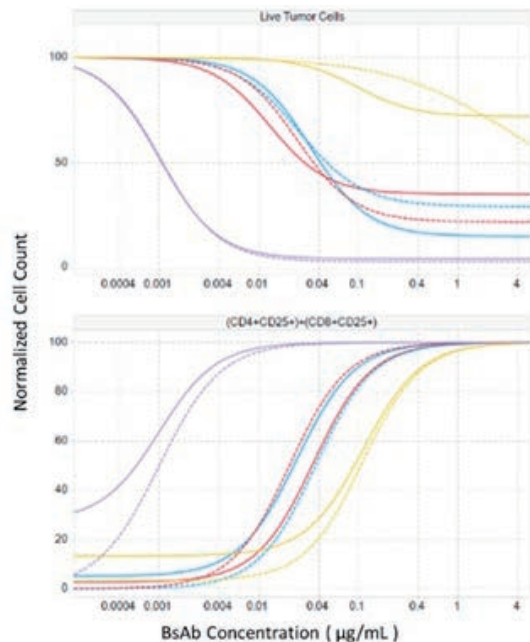


Figura 1. Las células T activadas (CD25+) tras la exposición al AcBs (panel inferior) conducen a la depleción de las células tumorales (panel superior).

Resultados: Tras exposición a los AcBs, la mayoría de las muestras presentan tanto activación de células T (CD25+) como depleción de las células tumorales de una manera dependiente del tiempo y de la dosis (Figura 1), incluso comenzando con ratios E:T basales (a tiempo 0h) bajos

(<1: 100). Para LMA, la cuantificación basal de CD123 por CMF no refleja una correlación con la respuesta in vitro. Por el contrario, se observaron diferencias tanto en la citotoxicidad de las células T como en la inmunoresistencia leucémica entre las muestras en términos de EC₅₀ o Emax, más marcadas entre las muestras de LLC. La integración del “efectivo E:T ratio” junto con la EC₅₀, la Emax y la cinética nos permite generar un modelo de respuesta in vitro para seleccionar aquellas muestras con mayor citotoxicidad de células T. Curiosamente, en la mayoría de las muestras queda una proporción significativa de células leucémicas vivas, incluso a concentraciones de AcBs más altas o con una notable expansión de las células T activadas. Estos datos sugieren el uso conjunto de inhibidores de punto control inmunitario para eliminar esas células tumorales inmunoresistentes.

Conclusiones: Hemos desarrollado un ensayo mediante CMF para el screening de AcBs que mantiene intactos tanto el ratio E:T basal como el microambiente nativo utilizando muestras de sangre o MO enteras. La integración de múltiples parámetros tanto biológicos como farmacológicos en la cuantificación de la actividad, nos permite identificar los mejores candidatos para inmunoterapia antitumoral adoptiva con AcBs. Además, dada la alta capacidad de la plataforma PharmaFlow, se podrían ensayar otras construcciones de anticuerpos, tanto solas como en combinación con agentes inmunomoduladores, para identificar a los mejores agentes o combinaciones inmunoterapéuticas en enfermedades hematológicas.

Linfomas

CO-052

HNRNPK, NUEVO ONCOGEN “DRIVER” DE LINFOMAS MEDIANTE LA REGULACION DE C-MYC

Gallardo M.¹, Ruiz Ortiz A.¹, Hornbaker M.², Zhang X.², Martínez Lopez J.¹, Post S.²

¹H12O-CNIO Unidad de investigación de neoplasias hematológicas, CNIO, Madrid 28029, España., ²Departamento de Leucemia, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Introducción: HNRNPK es una molécula versátil que regula numerosos procesos celulares como la transcripción o la traducción. Recientemente hemos demostrado que alteraciones en la expresión de HNRNPK pueden conducir a neoplasias hematológicas. Adicionalmente, hemos utilizado análisis de *arrays* de proteínas (RPPA) y hemos descubierto que la sobreexpresión de HNRNPK se correlaciona con los aumentos de expresión de c-MYC y moléculas reguladoras de su vía en pacientes con neoplasias hematológicas. Así mismo, los análisis de RT-PCR del gen *HNRNPK* han mostrado una sobreexpresión en pacientes con linfoma. Estos hallazgos pueden explicar un mecanismo alternativo de la fisiopatogenia del linfoma en pacientes con sobreexpresión pero ausente de alteraciones genéticas en c-MYC.

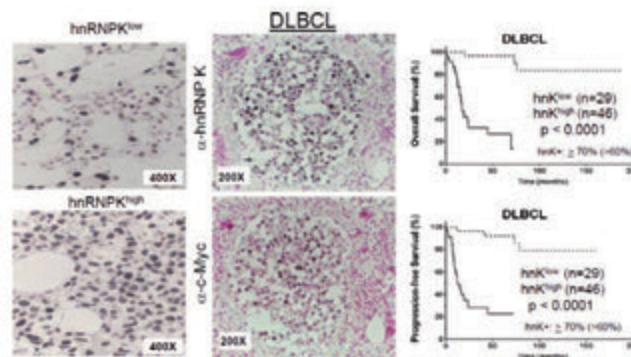


Figura 1. Izda: IHQ de la proteína hnRNP K de dos casos de linfoma difuso de células b grandes (arriba, baja expresión, abajo alta expresión). Centro: IHQ de la proteína hnRNP K y c-Myc en una muestra de linfoma difuso de células b grandes. Dcha: Curva de supervivencia (arriba) y supervivencia libre de evento (abajo) de los pacientes analizados por IHQ

Métodos: Para examinar el impacto de la sobreexpresión de *Hnrnpk* en la linfomagenesis, hemos generado un ratón transgénico que sobreexpresa *Hnrnpk* en las células B (E μ -*Hnrnpk*). El fenotipo fue caracterizado mediante análisis de sangre, citocinas, citometría de flujo y patología de la médula ósea, bazo, hígado, timo y nodos linfáticos. Se evaluaron los niveles de expresión génica y proteico mediante RT-PCR, IHQ y WB. Se validó el mecanismo molecular a través de ChIP y RIP. Así mismo se analizó el potencial terapéutico como diana farmacológica de la vía HNRNPK/c-MYC utilizando inhibidores de bromodominio.

Resultados: Se analizó una cohorte de 75 pacientes con linfoma difuso de células B grandes mediante IHQ y se observó que la sobreexpresión de HNRNPK producía una disminución significativa en la supervivencia (Figura 1). Así mismo, observamos una correlación entre la sobreexpresión de HNRNPK y c-MYC (Figura 1). Para confirmar el rol de HNRNPK en la linfomagenesis, se generó el ratón E μ -*Hnrnpk*, que sobreexpresa *Hnrnpk* en las células B produciendo linfomas con alta penetrabilidad. Se observó una reducción de la supervivencia, esplenomegalia y hepatomegalia, y aparición de nódulos linfomatosos (Figura 2A). Las células B de este ratón eran trasplantables y generaban procesos linfomatosos en los ratones receptores (Figura 2B). Estos resultados demuestran que *Hnrnpk* es un oncogén cuando está sobreexpresado. También observamos una correlación entre sobreexpresión de *Hnrnpk* y c-Myc (Figura 2 D). Los análisis de RIP demuestran que existe una interacción entre *Hnrnpk* y el transcrito de *c-Myc*. Aunque c-Myc es una diana no *druggable* se han descubierto inhibidores indirectos de c-Myc como los inhibidores de bro-