

**DECLARACIÓN DE INTERÉS
PROGRAMA FORMATIVO BANKIA PARA TÉCNICOS FP-II**

Grupo Acreditado/ Unidad Mixta Integrada/ Plataforma: Grupo Acreditado de Investigación en Hematología

Responsable: Dr. Miguel Ángel Sanz Alonso

ESPECIALIDAD/ES SOLICITADAS ACORDE CON LA NATURALEZA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL CUAL SE ADSCRIBIRÍA Y COLABORARÍA EL CONTRATADO

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Anatomía patológica-Citología | <input type="checkbox"/> Dietética |
| <input checked="" type="checkbox"/> Laboratorio de Diagnóstico Clínico | <input type="checkbox"/> Documentación Sanitaria |
| <input type="checkbox"/> Laboratorio (rama Química) | <input type="checkbox"/> Otros, especificar |

Proyecto de investigación en vigor al que se adscribirá el contratado (indique referencia y resumen)

Título: Estudio integrado de la enfermedad residual mínima en mieloma múltiple.

Referencia: 2016/0489.

El valor pronóstico de la enfermedad residual mínima (ERM) en el mieloma múltiple (MM) está ampliamente reconocido. Pese a ello, en la actualidad no existen estudios que integren y comparen la información obtenida mediante las nuevas técnicas de ERM por imagen y las realizadas en médula ósea.

Este estudio pretende analizar de forma integrada la ERM en pacientes con MM que van a recibir tratamiento con intención curativa, mediante las técnicas cuantitativas más novedosas: citometría de flujo de última generación (*next generation flow, NGF*), biología molecular (*next generation sequencing, NGS*) e imagen (*positron emission tomography, PET*; y resonancia magnética, RM).

A todos los pacientes se les realizarán al diagnóstico un estudio basal mediante las pruebas en médula ósea y las técnicas de imagen. Los sujetos que alcancen al menos una muy buena respuesta parcial (MBRP) se les efectuará el estudio de ERM por *NGF*, *NGS* e imagen. Por último, en los casos con ERM detectable mediante las técnicas de imagen e indetectable en las de médula ósea (*NGF* y *NGS*), se les realizará una biopsia ósea dirigida para descartar afectación parcheada del MM.

Posteriormente, se integrarán los resultados para valorar la aportación en conjunto e individual de cada técnica, para obtener la secuencia de estudio de la ERM en el MM más eficiente.

(Se podrán presentar dos declaraciones de interés, como máximo por grupo y en formularios separados)

PROGRAMA FORMATIVO A REALIZAR POR EL CONTRATADO

Describir el proyecto de investigación, haciendo especial énfasis en los aspectos formativos y las tareas a realizar por el contratado FP-II (Este apartado se publicará junto con las bases de la convocatoria con el fin de que el candidato FP-II pueda seleccionar el proyecto que más le interese)

Introducción

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica de células B en la que las células plasmáticas tumorales se acumulan en la médula ósea y en otros tejidos produciendo cantidades excesivas de proteína monoclonal (componente monoclonal, CM). El MM representa el 1% de todas las neoplasias y alrededor del 10% de las neoplasias hematológicas.⁽¹⁾ El tratamiento del MM ha avanzado notablemente en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos fármacos y, aunque se sigue considerando una enfermedad incurable, ha aumentado la tasa y duración de las respuestas completas con mejoría de la expectativa de vida.⁽²⁾ No obstante, muchos pacientes siguen recayendo debido probablemente a células tumorales residuales no detectadas con las técnicas convencionales. En este sentido, la evaluación de la enfermedad residual mínima (ERM) en el MM tiene cada vez mayor importancia debido a su demostrado valor predictivo de la supervivencia libre de progresión y de la supervivencia global.⁽³⁻⁵⁾ Esta información podría ayudar a individualizar la terapia, evitando el sobretratamiento en los casos de ERM no detectable o intensificando los esquemas de tratamiento farmacológico en los grupos con carga tumoral residual. La ERM puede abordarse fundamentalmente con tres métodos cuantitativos: citometría de flujo multiparamétrica (CFM), biología molecular (ambas realizadas en médula ósea) y las técnicas de imagen basadas en la tomografía por emisión de positrones (PET) y en la resonancia magnética (RM). La sensibilidad de cada técnica es diferente y, hasta ahora, no existen estudios que hayan integrado y comparado estos tres tipos de análisis.

La CFM constituye el método más utilizado para el análisis de la ERM en MM. La detección de células tumorales con CFM ha demostrado ser un factor de mal pronóstico,⁽³⁾ que ha permitido la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo, como se refiere en los estudios del Grupo Español de Mieloma Múltiple (GEM2000, GEM2005 y GEM2010mas65). Con las técnicas de CFM de tercera generación o *next generation flow* (NGF), el límite de la detección de la técnica es cercano a 10^{-6} (1 célula mielomatosa por cada 1.000.000 de células).⁽⁶⁾

La experiencia con los estudios moleculares es más limitada. Técnicas cuantitativas basadas en la RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*), como las ASO-PCR (*allele-specific oligonucleotide PCR*), necesitan ser individualizadas para cada paciente por lo que la aplicabilidad es baja, aunque presentan una sensibilidad similar a la CFM. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares como las NGS (*next generation sequencing*) o HTS (*high-throughput sequencing*) muestran una mayor sensibilidad que la CFM actual, superando los inconvenientes de la ASO-PCR y alcanzando un nivel de sensibilidad de 10^{-6} , aunque es necesaria mayor estandarización de la metodología y el desarrollo de estudios prospectivos para confirmar su valor clínico.⁽⁷⁻¹⁰⁾

Más recientemente, se ha propuesto la aplicación de las técnicas de imagen tomográficas para el estudio de la ERM del MM. La RM y la PET-TC se consideran las más sensibles para la detección de la afectación ósea y extraósea, y tienen un papel más importante en la estadificación inicial y en el seguimiento de la enfermedad. Además, han demostrado tener una alta relevancia en la predicción de la supervivencia de los pacientes con MM por lo que algunos grupos recomiendan su inclusión en el seguimiento,⁽¹¹⁻¹³⁾ modificando

su clásico papel “cualitativo” o “semicuantitativo” en “cuantitativo”. Esto debe permitir la detección y evaluación de la carga tumoral de ERM de localización ósea y extraósea, integrando la información con la del resto de estudios.^(9-10, 14) La estimación del SUVmax (*standardized uptake value*) hace que la PET-TC se considere una técnica cuantitativa que posibilita, en comparación con la RM, una evaluación más precoz de la carga tumoral tras el tratamiento, así como la detección de recaída o progresión. Sin embargo, existen nuevas aplicaciones de RM integradas dentro del concepto de imágenes cuantitativas de biomarcadores que tratan de evaluar características *in vivo* en función de las propiedades de los tejidos y las lesiones observadas por imagen.⁽¹¹⁾

Aunque trabajos recientes han comparado las técnicas de *NGF* y *NGS*,⁽⁶⁾ en nuestro conocimiento no existe ningún estudio que evalúe los tres métodos simultáneamente.

En la actualidad en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, el Servicio de Hematología y Hemoterapia y el Área de Imagen Médica (englobando a los Servicios de Radiología y Medicina Nuclear) han iniciado conjuntamente la validación de estas tres pruebas.

Bibliografía:

1. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2014;89(10):999-1009.
2. Bladé J, Rosiñol L, Fernández de Larrea C. How I treat relapsed myeloma. *Blood.* 2015;125(10):1532-40.
3. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact and outcomes in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol.* 2013;31(20):2540-7.
4. Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepín F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood.* 2014;123(20):3073-9.
5. Rawstron AC, Gregory WM, De Tute RM, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* 2015;125(12):1932-5.
6. Flores-Montero J, Sanoja-Flores, Paiva B, et al. Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017 Mar;10. doi: 10.1038/leu.2017.29 [Epub ahead of print].
7. Paiva B, Cedena MT, Puig N, et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling using second generation flow cytometry in elderly multiple myeloma. *Blood.* 2016;127(25):3165-74.
8. Rawstron AC, Paiva B, Stetler-Stevenson M. Assessment of minimal residual disease in myeloma and the need for a consensus approach. *Cytometry Part B.* 2015;90(1):21-5.
9. Nishihori T, Song J, Shain KH. Minimal residual disease assessment in the context of multiple myeloma treatment. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016;11(2):118-26.
10. Sherrod AM, Hari P, Mosse CA, et al. Minimal residual disease testing after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(1):2-12.
11. Martí-Bonmatí L, Ramirez-Fuentes C, Alberich-Bayarri Á, et al. State-of-the-art of bone marrow imaging in multiple myeloma. *Curr Opin Oncol.* 2015;27(6):540-50.
12. Dammacco F, Rubini G, Ferrari C, et al. F-FDG PET/CT: a review of diagnostic and prognostic features in multiple myeloma and related disorders. *Clin Exp Med.* 2015 Feb;15(1):1-18.



13. Sachpekidis C, Mai EK, Goldschmidt H, et al. F-FDG dynamic PET/CT in patients with multiple myeloma: patterns of tracer uptake and correlation with bone marrow plasma cell infiltration rate. Clin Nucl Med. 2015 Jun;40(6):e300-7.
14. Paiva B, Van Dongen JJM, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. Blood. 2015 May;125(20):3059-68.

Objetivos

Objetivo principal: correlacionar la ERM determinada mediante *NGF*, *NGS* y técnicas de imagen.

Objetivos secundarios:

- Establecer el papel de cada metodología en el estudio de la ERM: uso eficiente de las técnicas en la ERM del MM.
- Evaluar la aplicabilidad y rentabilidad de la biopsia ósea dirigida en los casos de ERM indetectable mediante las técnicas *NGF* y *NGS*, pero detectable por imagen.
- Establecer la secuencia más eficiente de estudio de la ERM en MM.

Metodología

Pacientes

Criterios de inclusión:

- Edad ≥ 18 años.
- Pacientes con diagnóstico de MM según los criterios del *International Myeloma Working Group*.
- Pacientes que se encuentren en cualquier línea terapéutica con intención de obtener una respuesta de calidad.
- Pacientes que alcancen al menos una muy buena respuesta parcial (MBRP) durante el periodo de tratamiento.

Criterios de exclusión:

- Pacientes refractarios al tratamiento convencional.
- Pacientes en tratamiento paliativo.
- Pacientes que no alcance una MBRP.

Se incluirán de forma prospectiva aproximadamente un mínimo de 50 pacientes. El proyecto se desarrollará de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, protección de datos y bioética. Para la inclusión del paciente será necesario la firma del consentimiento informado por parte del paciente, familiar o representante legal si estuviera indicado. Dado que este estudio no contempla la administración de ningún fármaco no se remitirá a la Agencia Española del Medicamento. El trabajo ha sido remitido y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

Circuito de estudio del paciente

A todos los pacientes con diagnóstico de MM se les realizará, a parte de los estudios de rutina en sangre periférica, orina y médula ósea, (incluido el estudio de *NGF* y *NGS*) las dos pruebas de imagen (PET-TC y RM), como estudio basal para poder compararlo con la evaluación post-tratamiento. Las pruebas deberán hacerse antes de completar la primera semana de tratamiento. El tiempo entre la realización de la punción de médula ósea y las técnicas de imagen no podrá ser superior a una semana.

Los pacientes que durante el seguimiento obtengan al menos una MBRP al tratamiento administrado serán subsidiarios del estudio de ERM y, por tanto, se incluirán en el análisis posterior del proyecto. Se define como MBRP:

- Reducción del CM en sangre >90% o detectable solo por inmunofijación.
- CM en orina <100 mg/24h o detectable solo por inmunofijación.
- Reducción >90% de la cadena ligera libre implicada en casos de MM de cadenas ligeras.
- Reducción >90% de los plasmocitomas, en caso de existir al diagnóstico.

En los pacientes que cumplan los criterios de respuesta previamente descritos, se procederá al examen citológico de médula ósea. A diferencia del estudio al diagnóstico o recaída, en este caso se solicitará el aspirado de médula ósea y las pruebas de imagen al mismo tiempo. Se extraerán un mínimo de 5 mL de material medular distribuidos en 2 tubos anticoagulados con etildiaminotetraacético (EDTA) con al menos 2 mL por tubo y en un tercer tubo anticoagulado con heparina de litio con al menos 1 mL de volumen. Se realizará el estudio citomorfológico habitual y, en caso de presentar <5% de células plasmáticas, se procederá a la detección de ERM mediante *NGF*, *NGS* y pruebas de imagen. Al igual que sucede al diagnóstico, no podrá superarse un periodo de una semana entre la punción de médula ósea y las técnicas radiológicas.

Por último, en los casos en que la ERM determinada en médula ósea sea indetectable por *NGF* y *NGS*, pero exista positividad en las pruebas de imagen, se efectuará una biopsia ósea dirigida sobre la lesión, siempre que sea accesible y el riesgo del procedimiento sea bajo. Se informará adecuadamente al paciente sobre el procedimiento a realizar, así como los riesgos y beneficios esperados.

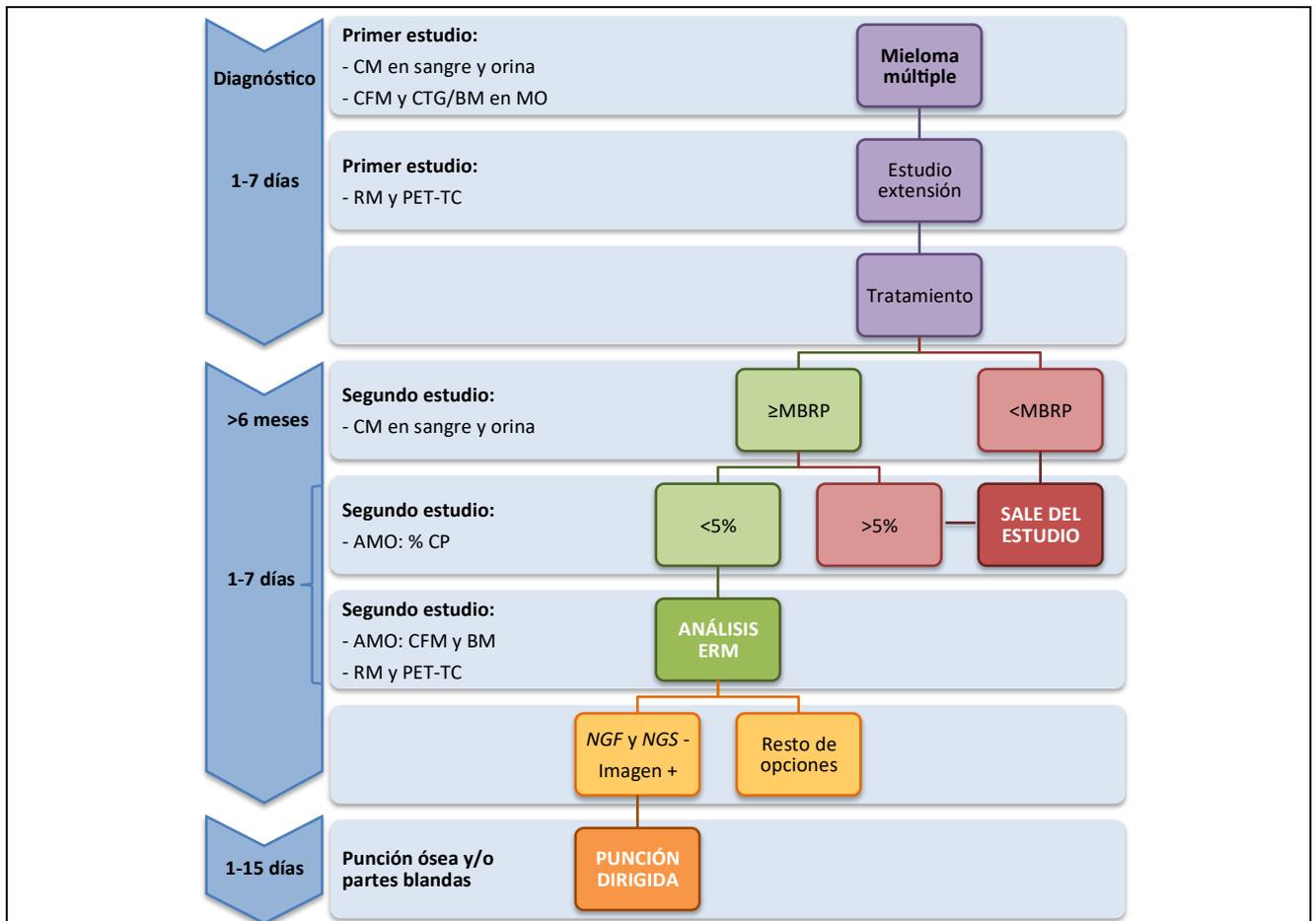


Figura 1. Resumen del circuito de estudio del paciente.

Técnicas para la determinación de la ERM

Metodología NGF

El estudio inmunofenotípico se realizará siguiendo las recomendaciones del Grupo de estandarización *EuroFlow*, utilizando 2 combinaciones de 8 anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con fluorocromos (Tabla 1) con las modificaciones adaptadas por el GEM. Las células se procesarán en tres citómetros FASCCanto-II (Becton Dickinson) disponibles en el Laboratorio de Citometría de Flujo. Asumiendo que la media de *debris* en las muestras procesadas es del 12%, se adquirirán un mínimo de 11 millones de eventos para los estudios de ERM, de tal forma que sean analizables 10 millones de células nucleadas, lo que permitirá alcanzar una sensibilidad cercana a 10^{-6} (límite de sensibilidad 20 células patológicas en 10 millones de células nucleadas). Para ello, se extraerá al menos 2 mL de material medular anticoagulado con EDTA en el primer tubo del aspirado y, en el caso en que no se pueda obtenerse una cantidad suficiente de eventos, se intentará recuperar parte de la muestra remitida a biología molecular y/o biobanco, si existiera material sobrante. La muestra se procesará en las primeras 24 horas (excepcionalmente 36 horas) tras la extracción siguiendo el protocolo de *bulk lysis* del Grupo *EuroFlow*, pasado este tiempo, se considerará inviable y la muestra no será subsidiaria de estudio. Posteriormente, se realizará el análisis de los datos mediante el programa *Infinicyt™* versión 1.8, utilizando una estrategia de selección secuencial. Los resultados se expresarán en porcentaje de células plasmáticas sobre celularidad nucleada total y porcentaje de expresión de cada uno de los antígenos analizados. Se valorará la calidad de la muestra mediante el



análisis de las diferentes poblaciones celulares de médula ósea, según las recomendaciones del Grupo *EuroFlow* (serie roja nucleada, mastocitos, precursores mieloides CD117+ y linfoides B tanto CD27+ como CD27-). En caso de que la muestra no cumpla las características de calidad necesarias para la evaluación de la ERM, se deberá efectuar una nueva punción.

Tabla 1. Tubos propuesto por el GEM (modificado de *EuroFlow*) para el estudio de ERM en MM.

Fluorocromo	BV-421	BV-510	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-C750
Tubo 1	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
Tubo 2	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	cylgKappa	cylgLambda

BV: Brilliant Violet, FITC: Fluorescein Isothiocyanate, PE: R-Phycoerythrin, PerCP-Cy5.5: Peridin Chlorophyll protein-cyanine 5.5, PE-Cy7: tándem R-Phycoerythrin-Cyanine7, APC: Allophycocyanin, APC-C750: tándem Allophycocyanin-C750.

Metodología NGS

La secuenciación masiva dirigida del gen de las inmunoglobulinas se realizará siguiendo el método de *Sequentia LymphoSIGHT™*. En primer lugar se extraerá el DNA de la médula ósea y será ampliado usando sets de *primers* locus-específicos para el locus completo de la inmunoglobulina de cadena pesada (IgH-VDJ_H) e incompleto (IgH-DJ_H) y para el locus de la inmunoglobulina kappa (IgK). Posteriormente, el producto amplificado será secuenciado y se obtendrán las secuencias y frecuencias de los diferentes clonotipos. Los reordenamientos de los genes del MM serán identificados usando el método de Fahan M, *et al*. Los pacientes en los cuales no se identificara una alta frecuencia de clonas mielomatosas (>5%) serán excluidos del análisis. En el resto, la ERM se obtendrá usando los métodos de IgH-VDJ_H e IgK o IgH-VDJ_H, IgH-DJ_H e IgK. Una vez determinado el número absoluto de moléculas derivadas de la neoplasia en la muestra, la ERM final será calculada, en función del número de células mielomatosas por millón de células equivalentes. En el caso de existir 2 o más clonas, la de mayor valor de ERM será la reportada.

Estudios de imagen

En la Plataforma de Radiología Experimental se realizará el estudio de cuerpo completo de RM incluyendo las secuencias IVIM-DW (6 estaciones, 5 valores b: 0-50-200-500-1000) y TSE-T2 en el plano transversal; y las potenciaciones convencionales T1 (Eco de Gradiente con desplazamiento químico) y T2 (TSE-STIR) en el plano coronal (cuerpo entero) y sagital (columna cervico-tóraco-lumbar). En el Servicio de Medicina Nuclear se realizará la exploración de PET-TC de cuerpo entero con 18F-FDG. Ambas exploraciones se analizarán por facultativos especialistas de cada técnica con al menos 3 años de experiencia.

Aspectos formativos y tareas a realizar por el contratado FP-II

El técnico FP-II solicitado se adscribirá al proyecto de investigación en curso descrito anteriormente. Las funciones del candidato en relación a este proyecto consistirá en la realización de los estudios inmunofenotípicos de ERM en MM mediante NGF, empleando el método de lisis en bloque (*bulk lysis*), propuesto por el grupo de estandarización EuroFlow, que permite alcanzar una profundidad en la sensibilidad entre 10^{-5} y 10^{-6} . El método incluye una serie de fases consecutivas de manipulación de la muestra con una duración media estimada de 3 horas desde el inicio del proceso hasta la completa adquisición de la muestra en el citómetro de flujo, lo que hace necesario disponer de un técnico con formación específica para ello. Todos los estudios se realizarán de forma estandarizada siguiendo los procedimientos operativos recomendados por el Grupo EuroFlow (control de calidad y calibración de los equipos, procesamiento y adquisición de las muestras de los pacientes).

Aspectos formativos fundamentales para el candidato FP-II:

- Adquirir los fundamentos básicos sobre la metodología de citometría de flujo multiparamétrica.
- Aprender el procedimiento completo de preparación y procesamiento de muestras para estudio inmunofenotípico: recepción, marcaje, adquisición y análisis preliminar (evaluación de calidad de la muestra).
- Obtener habilidad en el manejo del citómetro de flujo: calibración y configuración de los citómetros de flujo para adquisición y análisis de las muestras.
- Controles de calidad y estandarización de la citometría de flujo aplicada al diagnóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas.

Tareas específicas a realizar por el técnico FP-II:

- Controles de calidad diarios internos de los citómetros de flujo utilizando las microesferas CS&T para comprobar la linealidad de los equipos.
- Controles de calidad semanales internos empleando las microesferas Rainbow para comprobar la dispersión de los valores diana obtenidos con respecto a los valores diana establecidos en la estandarización de cada equipo.
- Controles de calidad trimestrales externos en los diferentes citómetros de flujo.
- Realización de la calibración específica de las muestras de MM siguiendo los procedimientos operativos estándar del Grupo EuroFlow.
- Procesamiento de las muestras al diagnóstico y durante el seguimiento de los pacientes mediante la técnica de lisis en bloque (*bulk lysis*).
- Adquisición de las muestras en los citómetros de flujo con evaluación preliminar de la calidad de las poblaciones celulares y el control de los paneles multicolor.
- Estandarización de la técnica realizada en el proyecto en todos los equipos disponibles en el laboratorio (3 citómetros de flujo FACSCanto-II).

El proyecto al que se adscribirá el candidato FP-II está relacionado con diversas ayudas obtenidas por el Grupo Acreditado de Investigación en Hematología en los últimos años:

- Mieloma Múltiple: grupos de riesgo basados en nuevos biomarcadores y evaluación de intervenciones terapéuticas con intención curativa con técnicas de ERM de alta sensibilidad (Ref. FIS P112/01569, ISCIII)
- Estudio de la enfermedad residual mínima en pacientes con mieloma múltiple en muy buena respuesta parcial o completa convencional mediante citometría de flujo de alta sensibilidad (Ref. 2015/0052).
- Proyecto de desarrollo de entornos tridimensionales biomiméticos para el cultivo de células de mieloma, BIO3D (Ref. 2015/0426). Proyecto realizado en colaboración con la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).
- Médula ósea artificial para personalizar el tratamiento de pacientes con cánceres de sangre, TISSUEMieloma (Ref. PROMETEO/2016/063). Proyecto realizado en colaboración con la UPV.

La realización de este proyecto posibilitará la aplicación de estas técnicas en un futuro inmediato al diagnóstico y seguimiento de la ERM de otras neoplasias hematológicas, fundamentalmente las leucemias agudas y los síndromes linfoproliferativos, de los que nuestro hospital es centro de referencia tanto para pacientes adultos como pediátricos y en la que nos encontramos involucrados en proyectos tanto a de investigación traslacional como asistencial.