

DECLARACIÓN DE INTERÉS PARA RECIBIR PROFESIONALES FP-II EN CONTRATOS DE PRÁCTICAS

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

☐ Anatomía patológica-Citología

☐ Dietética

☒ Laboratorio de Diagnóstico Clínico

☐ Documentación Sanitaria

☐ Laboratorio (rama Química)

☐ Otros, especificar

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

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

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 (referencia 2015/0052)

En la actualidad, el tratamiento del mieloma múltiple (MM) se asocia a una alta tasa de respuestas completas, a pesar de lo cual la mayoría de los pacientes siguen recayendo, probablemente porque las técnicas de laboratorio convencionales no son lo suficientemente sensibles para detectar células tumorales residuales. En este sentido, la evaluación de enfermedad residual mínima (ERM) en MM se está demostrando especialmente relevante por el impacto que puede tener en las decisiones terapéuticas posteriores (intensificación o interrupción del tratamiento). Por ello, es necesario validar métodos que sean rápidos y que alcancen una alta sensibilidad en la detección de ERM.

El objetivo del presente estudio es analizar el valor pronóstico de la ERM medida por citometría de flujo multiparamétrica (CFM) con ocho fluorocromos en pacientes con MM que alcancen muy buena respuesta parcial o mejor después de tratamiento según los esquemas terapéuticos usados en la práctica clínica habitual y comparar la utilidad de la medición de la ERM por CFM con las técnicas de laboratorio serológicas habitualmente empleadas para evaluar la respuesta de la enfermedad.

Se trata de un estudio multicéntrico que abarca siete hospitales de la Comunidad Valenciana. El Hospital Universitario y Politécnico La Fe es uno de los centros participantes que además es centro de referencia de los hospitales Arnau de Vilanova, Manises, Xàtiva, La Ribera y el Instituto Valenciano de Oncología.

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*)

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B en la que las células plasmáticas tumorales se acumulan en la médula ósea produciendo cantidades excesivas de proteína monoclonal, normalmente una inmunoglobulina del tipo IgG o IgA, o cadenas ligeras libres en suero, orina o en ambos fluidos. Esta proteína monoclonal es la responsable de los síntomas de la enfermedad y el parámetro habitualmente empleado en la clínica para monitorizar la respuesta al tratamiento administrado. La investigación acerca de los mecanismos patogénicos en MM ha dado lugar a diversas innovaciones en el tratamiento, pero a pesar de los avances significativos en las terapias actuales, esta enfermedad continúa siendo incurable¹.

Hasta hace poco, sólo una minoría de los pacientes alcanzaba respuesta completa (RC), por lo que no tenía sentido realizar pruebas con elevada sensibilidad para estudiar la enfermedad residual mínima (ERM). Sin embargo, en la actualidad los tratamientos con nuevas combinaciones de fármacos y el autotrasplante están dando como resultado la obtención de un mayor número de RC (por encima del 40%) y la eliminación de un mayor número de células residuales de mieloma. La monitorización de ERM está adquiriendo una importancia creciente y exige el empleo de técnicas que permitan aumentar la sensibilidad en la detección de células neoplásicas post tratamiento que puedan ser aplicables a la monitorización la ERM de los pacientes con MM.

La ERM se define como la cantidad de células plasmáticas neoplásicas correspondientes al MM que persisten tras la administración de tratamiento quimioterápico. El criterio empleado para definir la RC (determinación de la proteína M en suero u orina) dista mucho de ser óptimo ya que puede no detectar la presencia de ERM medular responsable de las recaídas de estos enfermos^{2,3}. En cuanto a la detección de ERM en MM, el inmunofenotipo mediante CFM es un método cuantitativo más reproducible y objetivo que la morfología para evaluar la infiltración por células plasmáticas⁴. Por ello, el inmunofenotipo se plantea como una alternativa a las demás técnicas de detección de ERM en MM. A pesar de su uso tan extendido, la estandarización de los métodos y protocolos de CFM todavía sigue siendo un reto para muchos laboratorios.

La valoración de ERM es parte del manejo estándar de muchas neoplasias hematológicas. El empleo en los últimos años de la CFM con combinaciones de 8 anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos ha permitido alcanzar una sensibilidad similar a la de las técnicas moleculares (PCR)⁵. Los estudios existentes utilizando PCR o CMF han demostrado que el nivel de células plasmáticas clonales en médula ósea después del tratamiento se correlaciona con la duración de la respuesta alcanzada, sugiriendo que la información proporcionada por la ERM podría tener utilidad pronóstica. En el caso de la CFM, el uso de 8 fluorocromos mejora la capacidad para detectar células plasmáticas clonales, minimiza el riesgo de errores y supone un ahorro en costes de trabajo y reactivos⁶. En esta línea, el Grupo EuroFlow ha seleccionado combinaciones de 8 AcMo que permiten aumentar el grado de sensibilidad de esta técnica hasta hacerla prácticamente similar a la alcanzada con los métodos moleculares (10^{-5} - 10^{-6})^{7,8,9}. La sensibilidad alcanzada mediante CFM empleando estas combinaciones de AcMo en la cuantificación de la ERM en pacientes con MM, que obtengan muy buena respuesta parcial o mejor después de tratamiento, permite analizar el valor pronóstico de la ERM, evaluar la respuesta de la enfermedad a la terapia y ajustar el tratamiento en función de la presencia de células plasmáticas neoplásicas residuales.

Es necesario profundizar en la medición de la calidad de la respuesta alcanzada para intentar discriminar grupos de pacientes en los que exista ERM en médula ósea y por tanto, puedan requerir un tratamiento más prolongado. La CFM es una técnica de laboratorio muy sensible y rápida adecuada para la detección de ERM en muestras de médula ósea. Además, dado el nivel de estandarización actual, permite una fácil comparación entre diferentes laboratorios. Se trata de un procedimiento muy adecuado para la detección de células residuales pos tratamiento que posibilita la asociación de los resultados obtenidos a la evolución clínica de los pacientes. La CFM tiene una sensibilidad de 10^{-5} (permite detectar 1 célula de mieloma múltiple entre 100.000 células normales). Con los nuevos citómetros de flujo y el programa apropiado de análisis de los datos, existe una expectativa razonable de alcanzar 10^{-6} . El laboratorio de Citometría de Flujo de la Unidad de Diagnóstico Hematológico del Hospital Universitario y Politécnico La Fe dispone de la infraestructura y la experiencia necesarias para realizar los estudios de ERM. En los estudios clínicos del GEM GEM2000, GEM2005 y GEM2010mas65, se analizó la profundidad de la respuesta mediante CMF, observándose que la detección de ERM $>10^{-4}$ es un factor de mal pronóstico incluso en caso de RC^{10,11}. Estudios posteriores de este mismo grupo han vuelto a demostrar el impacto clínico de la monitorización de la ERM, incluyendo pacientes tratados con nuevos fármacos combinados o no con estrategias de autotrasplante, confirmados también por otros grupos cooperativos (MRC)¹², lo que ha estimulado el empleo generalizado de la CFM para evaluar ERM en pacientes con MM. Todo lo dicho, ha fundamentado la inclusión de la respuesta inmunofenotípica como uno de los nuevos criterios de respuesta en pacientes con MM.

En resumen, en este proyecto se pretende identificar qué grupos de pacientes con MM tratados según los esquemas de quimioterapia habitualmente empleados, alcanzan RC o MBRP con ERM negativa definida mediante CFM, cuáles son las características clínicas y biológicas que distinguen a estos enfermos y cuál es su curso evolutivo frente a aquellos pacientes que no alcancen RC o MBRP. Aunque se necesitan estudios adicionales, la determinación de ERM mediante CFM en pacientes con MM permite definir una RC de mayor calidad que la obtenida por los métodos convencionales (IF). Además, es una técnica cuantitativa más sencilla, rápida y aplicable a un mayor número de pacientes que las técnicas moleculares. En la actualidad disponemos de evidencia suficiente para utilizar la ERM mediante CMF en el seguimiento de los pacientes con MM que permita la toma de decisiones terapéuticas^{13,14}, aunque tal aproximación sólo podrá ser trasladada a la clínica si se demuestra su utilidad en estudios prospectivos.

El objetivo principal del proyecto es definir la ERM cuantificada por CFM empleando combinaciones de 8 anticuerpos monoclonales en pacientes con MM sintomático que alcancen respuesta completa o muy buena respuesta parcial con los esquemas de tratamiento administrados en la práctica clínica habitual.

Como objetivos secundarios se planteó a) establecer el valor clínico de la respuesta inmunofenotípica valorada como duración de la SLP y SG en relación a los criterios establecidos de RC; b) analizar el impacto de las estrategias terapéuticas habitualmente empleadas en la práctica clínica sobre la respuesta inmunofenotípica; c) establecer la relación entre factores pronósticos convencionales y respuesta inmunofenotípica.

El estudio es prospectivo y multicéntrico y se intentará estudiar un mínimo de 150 pacientes con mieloma múltiple que cumplan los criterios de inclusión y diagnosticados en los Centros de la Comunidad Valenciana participantes en el proyecto.

Criterios de inclusión:

- Edad >18 años.
- Pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple sintomático según criterios del IMWG en los centros de la Comunidad Valenciana que participan en el estudio.
- Pacientes que se encuentren en tratamiento activo de inducción en primera línea o en primera recaída con esquemas habitualmente empleados en la práctica clínica.
- Pacientes que alcancen respuesta completa (RC) o muy buena respuesta parcial (MBRP) durante el periodo de tratamiento.

Criterios de exclusión:

- Edad <18 años.
- Pacientes refractarios al tratamiento convencional.
- Pacientes en situación de segunda o posterior recaída.
- Pacientes que no alcancen, al menos MBRP con el tratamiento de inducción.
- Pacientes en tratamiento con agentes experimentales.

Una vez identificado un paciente con sospecha de MM susceptible de entrar en el estudio, tras la firma del consentimiento informado y antes de iniciar el tratamiento, se enviará una primera muestra de médula ósea a uno de los laboratorios de referencia para realizar el estudio inmunofenotípico de diagnóstico.

El tratamiento específico para su enfermedad se realizará en el hospital donde se encuentre el paciente. Las muestras de médula ósea para la realización de los estudios biológicos de ERM se realizarán a los 3 meses, 12 meses, 24 meses y siempre que se documente la RC o MBRP.

La médula ósea se enviará a uno de los laboratorios de citometría de flujo de los Centros de referencia donde vayan a realizarse los estudios de inmunofenotipo de modo que las muestras puedan procesarse durante las siguientes 24 horas tras su extracción.

El resto de estudios biológicos (séricos o urinarios) necesarios para determinar la situación de RC o MBRP de los pacientes se realizarán en el laboratorio local de cada uno de los Centros participantes.

Se obtendrán 8 mL de aspirado medular que se distribuirán como sigue:

- Realización de extensiones para estudio citológico convencional (laboratorio local).
- Citogenética y biología molecular (laboratorio local).
- Un tubo con etilendiaminotetracético (EDTA) con un volumen de 5 mL que será enviado a los laboratorios de referencia para el estudio inmunofenotípico mediante CMF.

El estudio inmunofenotípico para la detección de ERM por CMF se realizará utilizando las combinaciones de 8 AcMo conjugados con fluorocromos propuestas por el Grupo EuroFlow en un citómetro FACSCanto-II (Becton Dickinson).

Para los estudios al diagnóstico se extraerán al menos 5 mL de médula ósea, que se procesarán según el procedimiento operativo estándar de EuroFlow empleando la combinación de 8 AcMo conjugados con fluorocromos tal y como se detalla en la siguiente tabla. Al diagnóstico se identificarán las alteraciones antigénicas presentes en las células plasmáticas neoplásicas.

HV-450	HV-500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81

Se adquirirán 300.000 células al diagnóstico y un mínimo de $5 \cdot 10^6$ células en los estudios de ERM lo que permitirá alcanzar una sensibilidad de 10^{-5} . El análisis de los datos de citometría se realizará mediante el programa Infinicyt™ utilizando una estrategia de selección secuencial. Los resultados se obtendrán en porcentaje de células plasmáticas sobre celularidad total, porcentaje de células plasmáticas neoplásicas sobre células plasmáticas totales y porcentaje de expresión de cada uno de los antígenos analizados. Se valorará la calidad de la muestra mediante el análisis de la serie roja, la presencia de precursores linfoides B y población linfoide.

El técnico FPIL que se solicita se adscribirá al proyecto de investigación en curso descrito anteriormente (**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, referencia 2015/0052**). La labor del candidato en el marco de este proyecto consistirá en realizar los estudios de ERM en MM mediante CFM empleando el método de lisis en bloque (bulk lysis), de reciente estandarización por el Grupo EuroFlow, que permite alcanzar una sensibilidad de 10^{-5} (detección de 1 célula de mieloma múltiple entre 100.000 células normales). El procedimiento conlleva concentrar las células de médula ósea extraídas (10 millones) y marcarlas conjuntamente para conseguir analizar un mínimo de 5 millones de células por tubo, lo que permite alcanzar una sensibilidad de 10^{-5} . 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 estándar recomendados por el Grupo EuroFlow (control de calidad y calibración de los equipos, procesamiento y adquisición de las muestras de los pacientes).

Los aspectos formativos fundamentales del proyecto se describen a continuación:

- Conocer el proceso completo que sigue la muestra desde su recepción hasta su análisis.
- Aproximación / introducción al análisis e interpretación de los datos de citometría relativos al diagnóstico o seguimiento (ERM) de MM al análisis utilizando el programa Infinicyt.
- Conocer los procedimientos que permiten la estandarización de las técnicas de CFM.

Las tareas específicas a realizar por el técnico FPII serán:

- Control de calidad diario de los citómetros de flujo utilizando las microesferas CS&T para comprobar la linealidad de los equipos.
- Control de calidad semanal 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.
- Establecimiento de una calibración específica para los casos de MM siguiendo los procedimientos operativos estándar del Grupo EuroFlow.
- Procesamiento de las muestras al diagnóstico o durante el seguimiento de los pacientes mediante la técnica de lisis en bloque (bulk lysis) que supone una media de 3 horas de procedimiento por muestra (el procedimiento se encuentra disponible en www.euroflow.org).
- Adquisición de las muestras de MO en los citómetros de flujo.
- 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 FPII está relacionado con varias ayudas obtenidas por el Grupo Acreditado de Investigación en Hematología en los últimos años ("Estandarización de los protocolos de trabajo de citometría de flujo para la obtención de resultados reproducibles intra e interlaboratorio aplicando las guías del grupo EuroFlow", Periodo Sabático Intramural 2013, IISLaFe; "Implantación de un sistema de control de calidad y optimización de los recursos para la acreditación del Laboratorio de Citometría de Flujo", Periodo Sabático Intramural 2014, IISLaFe; "Desarrollo de un estudio multicéntrico para la estandarización del diagnóstico de las neoplasias hematológicas según el modelo EuroFlow con paneles multifuorescencia y tubos en formato desecado", proyecto propio; "Mieloma Múltiple: grupos de riesgo basados en nuevos biomarcadores y evaluación de intervenciones terapéuticas con intención curativa con técnicas para ERM de alta sensibilidad", FIS PI12/01569, ISCIII) y 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, de las 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.

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008; 111(6):2962-2972.
2. Pratt G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br J Haematol* 2008; 141: 413-422.
3. Durie BG, Harousseau JL, San Miguel J, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2007; 20: 1467-1473.
4. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23: 215-224.
5. Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002; 15: 197-222.
6. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008; 93: 431-438.
6. Derek K. Marsee, MD, PhD, Betty Li, MS, MT (ASCP), and david M. Dorfman, MD, PhD. *Am J*

ClinPathol 2010; 133: 694-699.

7. www.euroflow.org

8. EuroFlow™ antibody panels. Handout at 14th EHA congress, Berlín, DE. 4 June 2009.

9. JJM van Dongen, L Lhermitte, S Bottcher, J Almeida, VHJ van der Velden, J Flores-Montero, A Rawstron, V Asnafi, Q Lecrevisse, P Lucio, E Mejstrikova, T Szczepanski, T Kalina, R de Tute, M Bruggemann, L Sedek, M Cullen, AW Langerak, A Mendonca, E Macintyre, M Martin-Ayuso, O Hrusak, MB Vidriales and A Orfao on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). Leukemia (2012) 26, 1908–1975.

10. Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales MB, et al: Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. J Clin Oncol 29:1627-1633, 2011.

11. Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, et al: High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. Blood 119:687-691, 2012.

12. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al. Minimal Residual Disease Assessed by Multiparameter Flow Cytometry in Multiple Myeloma: Impact on Outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study J Clin Oncol 2013; 31:2540-2547.

13. Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. Blood. 2015 May 14; 125(20):3059-68.

14. Sherrod AM, Hari P, Mosse CA, Walker RC, Cornell RF. Minimal residual disease testing after stem cell transplantation for multiple myeloma. Bone Marrow Transplant. 2016 Jan; 51(1): 2-12.