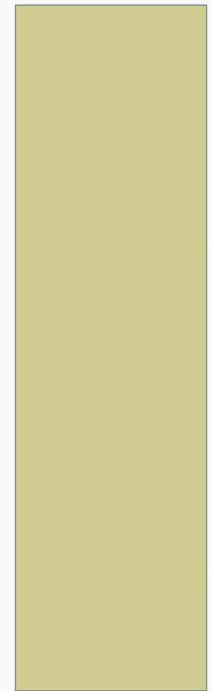


MODELO CLÍNICO A USAR EN LMA  
BASADO EN EL LABORATORIO.  
PROYECTO ASH - ICAL

EDUARDO REGO  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



# LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA EN LOS PAÍSES EN DESARROLLO

	Tipo de Estudio	N	Taja de remisión (%)	Mediana de supervivencia global	Taja de supervivencia global
Asharafi et al., 2013	retrospectivo	95	58,9	13 meses	26% em 2 años
Souto Filho et al., 2011*	retrospectivo	65	57,1	112 días	22% em 5 años
Benicio et al., 2011	retrospectivo	197	72,2	7.6 meses	18% em 5 años

**Burnett et al.  
(AML12), 2010**

**prospectivo**

**1193**

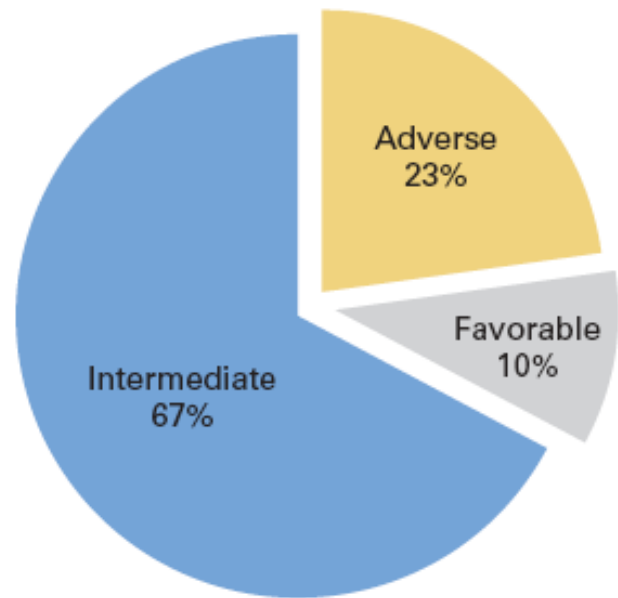
**68% CR +  
11% CRi**

**38% em 8  
años**

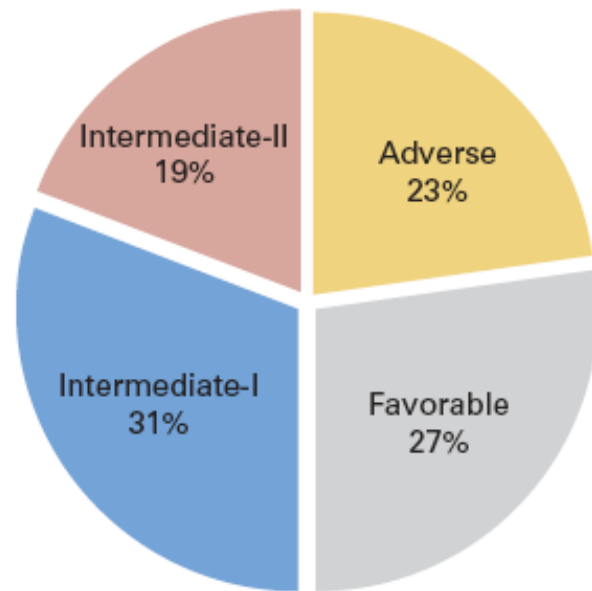
# LIMITACIONES PARA OBTENER MEJORES RESULTADOS

- El retraso en el diagnóstico
  - Lins et al. 2012: tiempo mediano hasta dx fue de 31 días, 55% de los casos retraso
- Dificultad de acceso a los métodos de estratificación del riesgo – mala definición de opciones de tratamiento

# FRECUÊNCIA DE LOS GRUPOS DE RIESGO

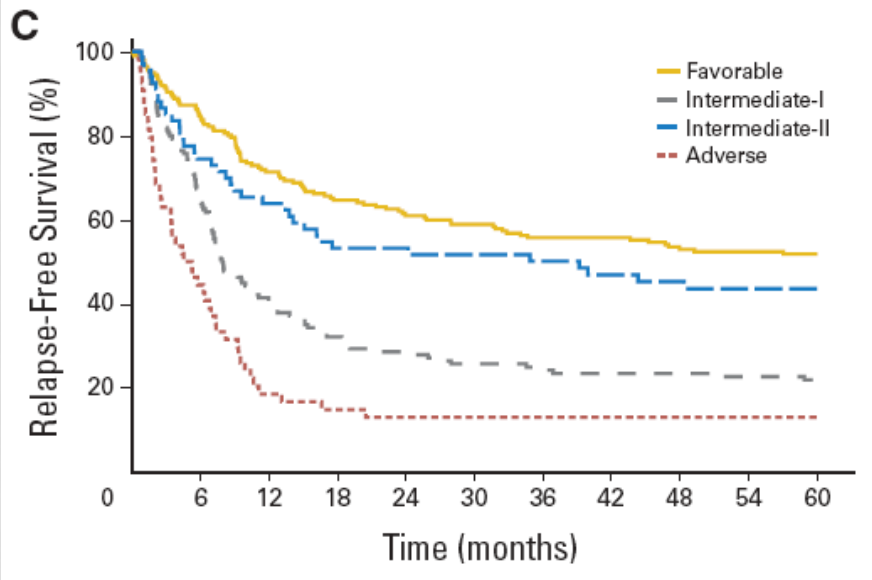


**Classificación según  
MRC**

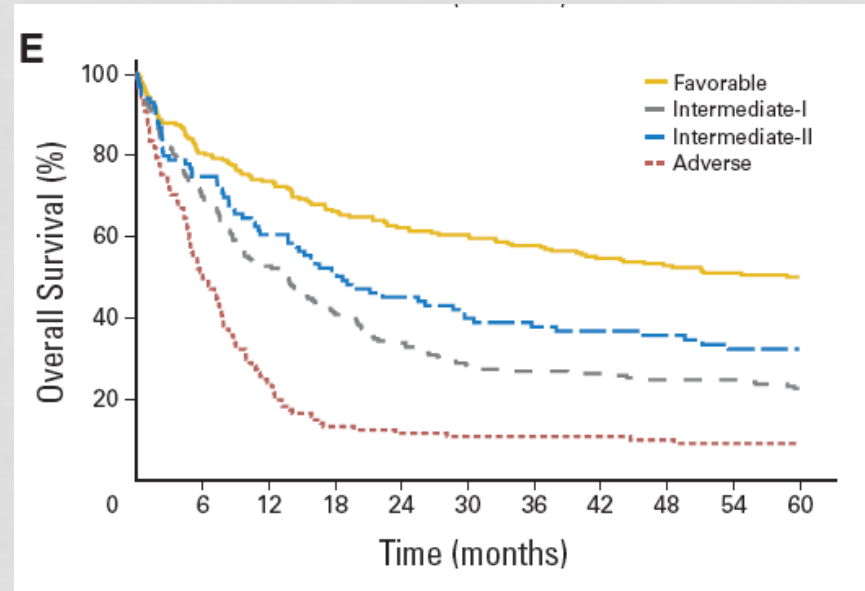


**Classificación según  
ELN**

# RESULTADOS: ENFERMOS ADULTOS JOVENES ( $\leq 60$ AÑOS)



Supervivencia libre de enfermedad (DFS)



Supervivencia global (OS)

# COMPARACIÓN ENTRE LOS ENFERMOS SOMETIDOS A TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS ( HSCT) O QUIMIOTERAPIA

	Supervivencia libre de recaídas		Supervivencia global	
	HSCT	Quimio	HSCT	Quimio
<b>Favorable</b>	<b>NR</b>	<b>66.1 m</b>	<b>NR</b>	<b>63.6m (10.7 to 116.6)</b>
<b>Interm. I</b>	<b>94.0</b>	<b>7.9 m (6.0 to 9.8)</b>	<b>NR</b>	<b>13.6m (9.8 to 17.4)</b>
<b>Interm. II</b>	<b>104.8m (11.8 to 197.8)</b>	<b>39.1 m (8.4 to 70.0)</b>	<b>109.2m (24.3 to 194.1)</b>	<b>18.7m (9.6 to 27.7)</b>
<b>Desfavorable</b>	<b>9.0m (2.0 to 16.1)</b>	<b>4.5 m (1.8 to 7.2)</b>	<b>12.2m (4.9 to 19.4)</b>	<b>6.0m (4.2 to 7.8)</b>

# LIMITACIONES PARA OBTENER MEJORES RESULTADOS

- El retraso en el diagnóstico
  - Lins et al. 2012: tiempo mediano hasta dx fue de 31 días, 55% de los casos retraso
- Dificultad de acceso a los métodos de estratificación del riesgo – mala definición de opciones de tratamiento
- alta mortalidad en la inducción y consolidación principalmente asociados con complicaciones infecciosas

# LA INCIDENCIA ACUMULADA DE INFECCIONES INVASIVAS

**TABLE 3. Cumulative incidence (1-year) of invasive fungal diseases by underlying condition**

	Allogeneic HCT	Autologous HCT	AML/MDS	Total (%)
Fusariosis*	5.2 (%)	0.6 (%)	3.8 (%)	
Aspergillosis**	2.3	–	13.4	
Candidiasis	2.4	0.6	1.7	
Mucormycosis		–	–	
All IFD	11.3	1.9	18.7	8.7

HCT, haematopoietic cell transplantation; AML, acute myeloid leukaemia; MDS, myelodysplasia; IFD, invasive fungal disease.  
\*p 0.01; \*\*p <0.001.

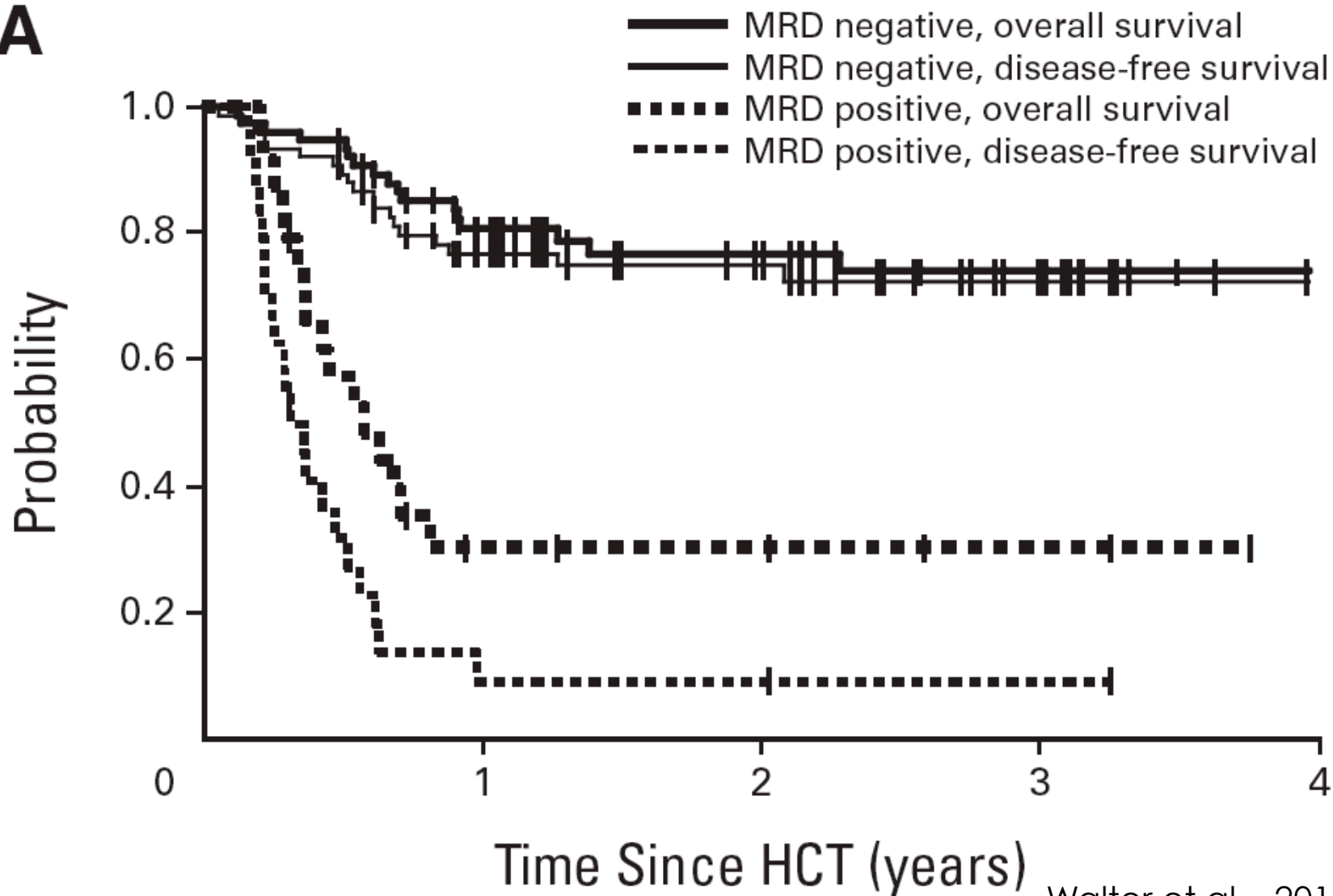


# LIMITACIONES PARA OBTENER MEJORES RESULTADOS

- El retraso en el diagnóstico
  - Lins et al. 2012: tiempo mediano hasta dx fue de 31 días, 55% de los casos retraso
- Dificultad de acceso a los métodos de estratificación del riesgo – mala definición de opciones del tratamiento
- alta mortalidad en la inducción y consolidación principalmente asociados con complicaciones infecciosas
- Difícil acceso a los métodos de evaluación de respuesta al tratamiento

## EVALUACIÓN DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE FLUJO

- Walter et al. reportó el análisis de 99 enfermos , de los cuales 88 alcanzaron la remisión y 24 tenían estudio para MRD antes del trasplante . Panel con 10 colores
- Cualquier número de células con fenotipo que " se apartase del normal " se consideró MRD + ( < 0,01 % en 2 enfermos, entre 0,01% y 0,1 % en 8, y > 0,1 % en 14
- Después de todas las correcciones para los factores de riesgo (incluyendo la citogenética ) HR = 8:49 ( IC del 95 % , 3,67-19,65 ; p < 0,001 ) entre DRM + / DRM

**A**

# LIMITACIONES PARA OBTENER MEJORES RESULTADOS

- El retraso en el diagnóstico
- Dificultad de acceso a los métodos de estratificación del riesgo – mala definición de opciones de tratamiento
- alta mortalidad en la inducción y consolidación principalmente asociados con complicaciones infecciosas
- Difícil acceso a los métodos de evaluación de respuesta al tratamiento
- Falta de grupos cooperativos (adultos) que realicen estudios prospectivos y estudios iniciados por investigador (limitado los recursos financieros y humanos)
- Falta de bancos de muestras de leucemias agudas con análisis genéticas y datos clínicos de buena calidad

# ICAML 2015

ESTUDIO DE VIABILIDAD DEL USO DE DOSIS INTERMEDIAS DE CITARABINA ASOCIADAS CON TRANSPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS AUTÓLOGAS COMO TRATAMIENTO DE CONSOLIDACIÓN EN ADULTOS CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DE NOVO DE RIESGO BAJO O INTERMEDIO

INTERNATIONAL CONSORTIUM ON ACUTE LEUKEMIAS

# CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

- Estudio de viabilidad
- Tipo registro, prospectivo , multicéntrico , no aleatorizado
  - La elección entre quimioterapia o trasplante autólogo se hará de antemano por el centro
- Tamaño de la muestra : 522 pacientes

# OBJETIVO PRIMARIO

Crear una red de instituciones en países en vías de desarrollo que llevará a cabo el diagnóstico de LMA, la clasificación de riesgo, el tratamiento, los cuidados de soporte y la evaluación del seguimiento de acuerdo con un protocolo común y registrará los datos mediante formularios comunes de investigación clínica (FIC) en una sola base de datos y disponible en internet.

# OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Usando los Laboratorios Nacionales de Referencia, proporcionar métodos citogenéticos y moleculares para todas las instituciones participantes en la red, permitiendo por tanto un rápido diagnóstico y estratificación de riesgo de los casos de LMA según la estructura de la *European Leukemia Net*



# OBJETIVOS SECUNDARIOS

2. Comparar la supervivencia global de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) de riesgos bajo e intermedio de acuerdo a la *European Leukemia Net* en primera remisión completa (RC1) tratados con dos ciclos de citarabina en dosis intermedias frente a un ciclo de citarabina en las mismas dosis seguido de trasplante autólogo de células madre como consolidación

# OBJETIVOS SECUNDARIOS

3. Desarrollar un método de evaluación de la enfermedad residual mínima basado en citometría de flujo adaptada a los recursos locales y capaz de guiar decisiones terapéutica

# *CRITERIOS DE INCLUSIÓN:*

- LMA clasificada como de riesgo bajo o de riesgo intermedio de ELN. Los pacientes clasificados en el grupo de riesgo intermedio deben ser enrolados SÓLO SI UN DONANTE HLA COMPATIBLE NO FUE IDENTIFICADO;
- LMA no tratada previamente, incluyendo: LMA de novo o secundaria a síndromes mielodisplásicos;
- Ausencia de t(15;17), o reordenamiento PML-RARA y sus variantes;
- Edad mayor o igual a 18 años o menor o igual a 60 años;
- Estatus funcional ECOG de 0 a 2;
- Firmar el consentimiento informado ;
- Se capaz de seguir los procedimientos del protocolo;
- Estar dispuesto a utilizar métodos anticonceptivos;
- Función renal y hepática adecuadas:
  - Bilirubina  $\leq 1,5$  veces el límite superior de la normalidad
  - AST and ALT  $\leq 2,5$  el límite superior de la normalidad
  - Creatinina  $\leq 2,5$  mg/dl
- Adecuada función cardíaca: fracción de eyección ventricular izquierda  $\geq 40\%$ .

# PROCEDIMIENTOS ESTÁNDAR DE DIAGNÓSTICO

- Obtener el consentimiento informado
- Una muestra de médula ósea ( MO ) en EDTA para el análisis molecular y biobancos
- Dos muestras de MO en heparina para el análisis de citometría de flujo y para citogenética
- Una muestra de sangre periférica en EDTA
- Envío de las muestras al Laboratorio Central Nacional. Transportadas a temperatura ambiente o con gel frío (temperatura de 2 hasta 25 ° C), no deje que la muestra en contacto directo con el hielo ; nunca use hielo seco. Tiempo de transporte: 24h
- Datos de CRF en redcap

# REGISTRO REDCAP


Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo

## Feasibility Study of the Use of Intermediate Doses of Cytarabine Associated with Autologous Hematopoietic Stem Cells as Consolidation Treatment of Adults with Low- or Intermediate-risk de Novo Acute Myeloid Leukemia

Project Setup

Online Designer


Data Dictionary












 [VIDEO: How to use this page](#)

The Online Designer will allow you to make project modifications to fields and data collection instruments very easily using only your web browser. NOTE: While in development status, all field changes will take effect immediately in real time.

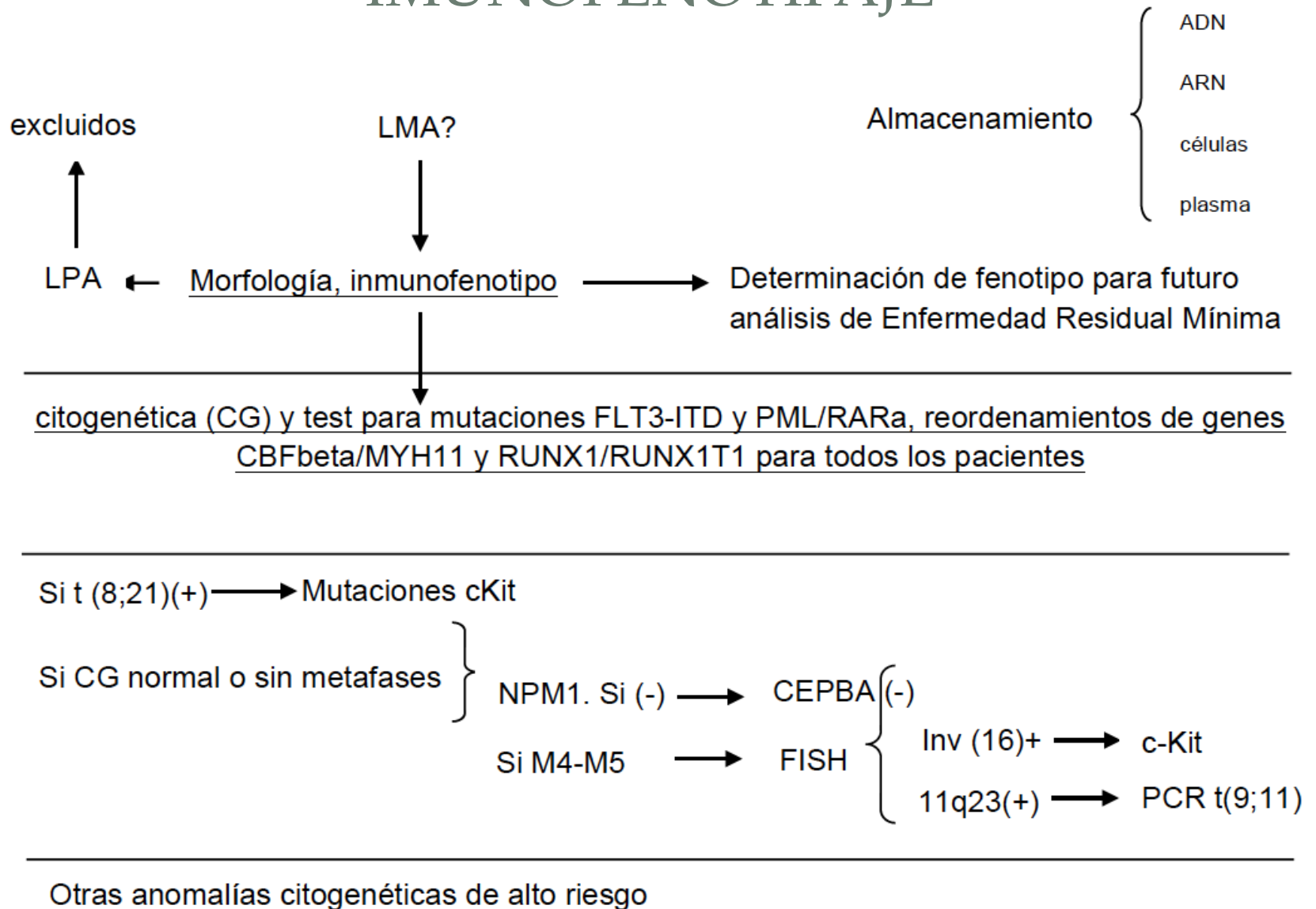
**Data Collection Instruments**

Survey options: [Survey Queue](#) [Survey Login](#) [Survey Notifications](#)

Add new instrument: [Create](#) a new instrument from scratch [Download](#) a new instrument from the REDCap Shared Library 

Instrument name	Fields	View PDF	Enabled as survey	Instrument actions	Survey-related options
Form to be filled at diagnosis (first form)	73		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Form D28 post induction	39		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Form post first consolidation	34		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Form stem cell collection	5		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Central Lab Information: Minimal residual disease form after first consolidation	5		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Form post second consolidation chemo or transplant	32		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Central Lab Information: MRD form after second consolidation	5		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Form post third consolidation	31		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Follow-up visits (after treatment)	7		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Lab evaluation after treatment	3		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	
Central lab evaluation FU after treatment	5		<a href="#">Enable</a>	<a href="#">Rename</a> <a href="#">Delete</a>	

# ANÁLISIS CITOGENÉTICA, MOLECULAR Y IMUNOFENOTIPAJE



# CARIOTIPO NORMAL (BRAZIL)

Cariotipo normal o número de metaphasis insuficiente

Skyline AML profiler

t(8;21), t(15;17), inv(16), NPM1 A, B and D types, CEBPA duplo mutantes. niveles expresiones EVI1 y BAALC



Pero los reordenamientos RUNX1/RUNX1T1, CBFbeta/MYH11, PML/RARA y las mutaciones en el gen NPM1 – RT-PCR  
CEBPA exige se  
c-kit – RT-PCR

# HALLAZGOS CITOGENÉTICOS EN LMA Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO

Pronóstico	Citogenética
Favorable	t(8;21), inv(16), t(16,16)
Intermedio	normal, +8, +21, +22,, del(9q), t(9;11)
Alto	-5/del(5q), -7/del(7q), abn(3q), 20q, 21q, 17p, t(6;9), t(v,11)(v;q23), abnl((17p) cariotipos complejos con al menos 3 ( $\geq 3$ ) anormalidades



# *GRUPO DE BAJO RIESGO*

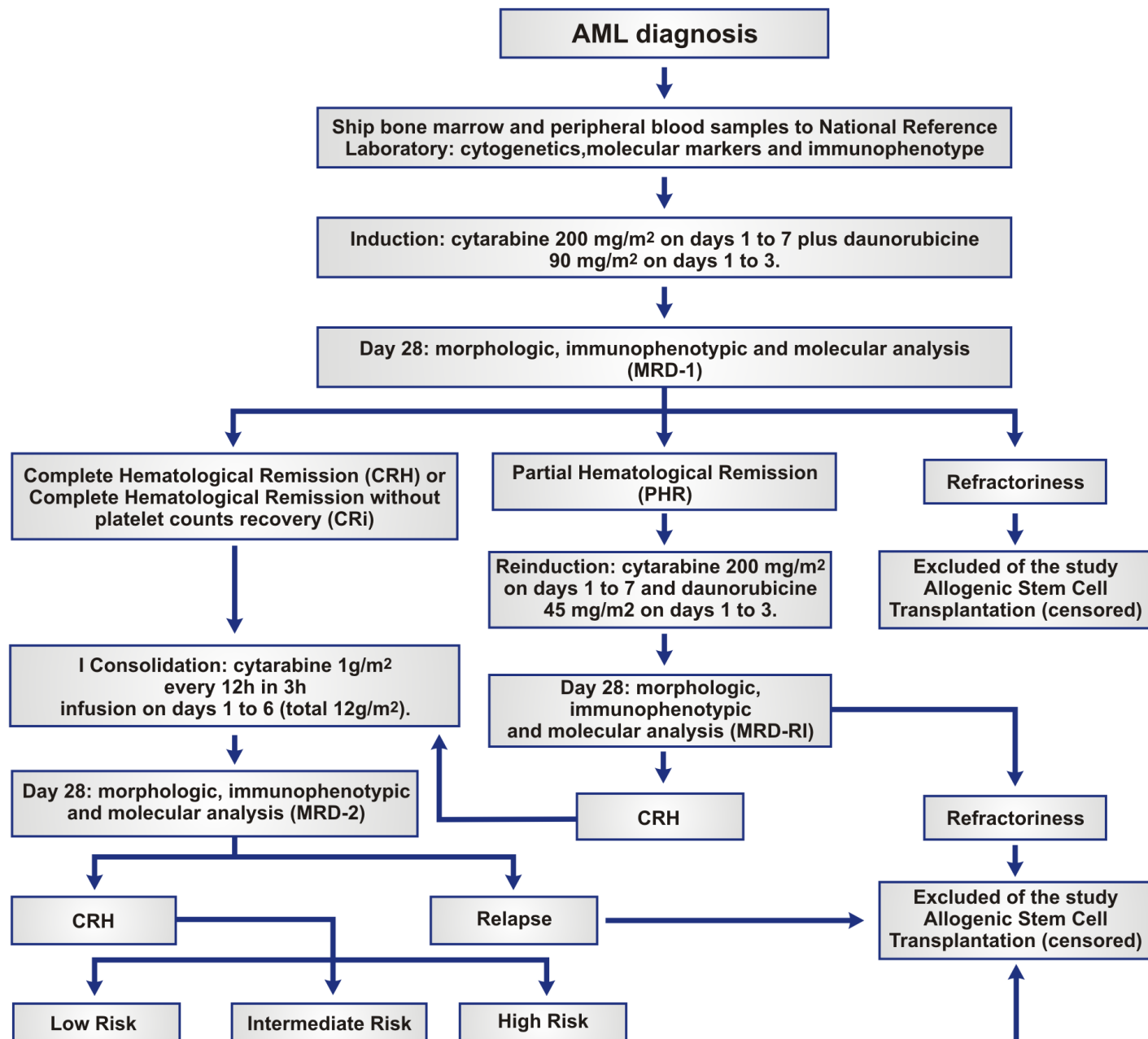
- - LMA con inv(16) o t(16; 16) o reordenamiento correspondiente (CBF  $\beta$  /MYH11), y que ha llegado a la remisión completa en el primer ciclo de inducción
- - LMA con t(8; 21) o reordenamiento molecular correspondiente (RUNX1/RUNX1T1), y ha alcanzado una remisión completa en el primer ciclo de inducción
- - Mutaciones NPM1 con cariotipo normal en ausencia de mutaciones de FLT3 u otros factores de mal pronóstico.
- - Mutaciones bialélicas del CEBP  $\alpha$  en ausencia de mutaciones FLT3 u otros factores de mal pronóstico, con cariotipo normal.

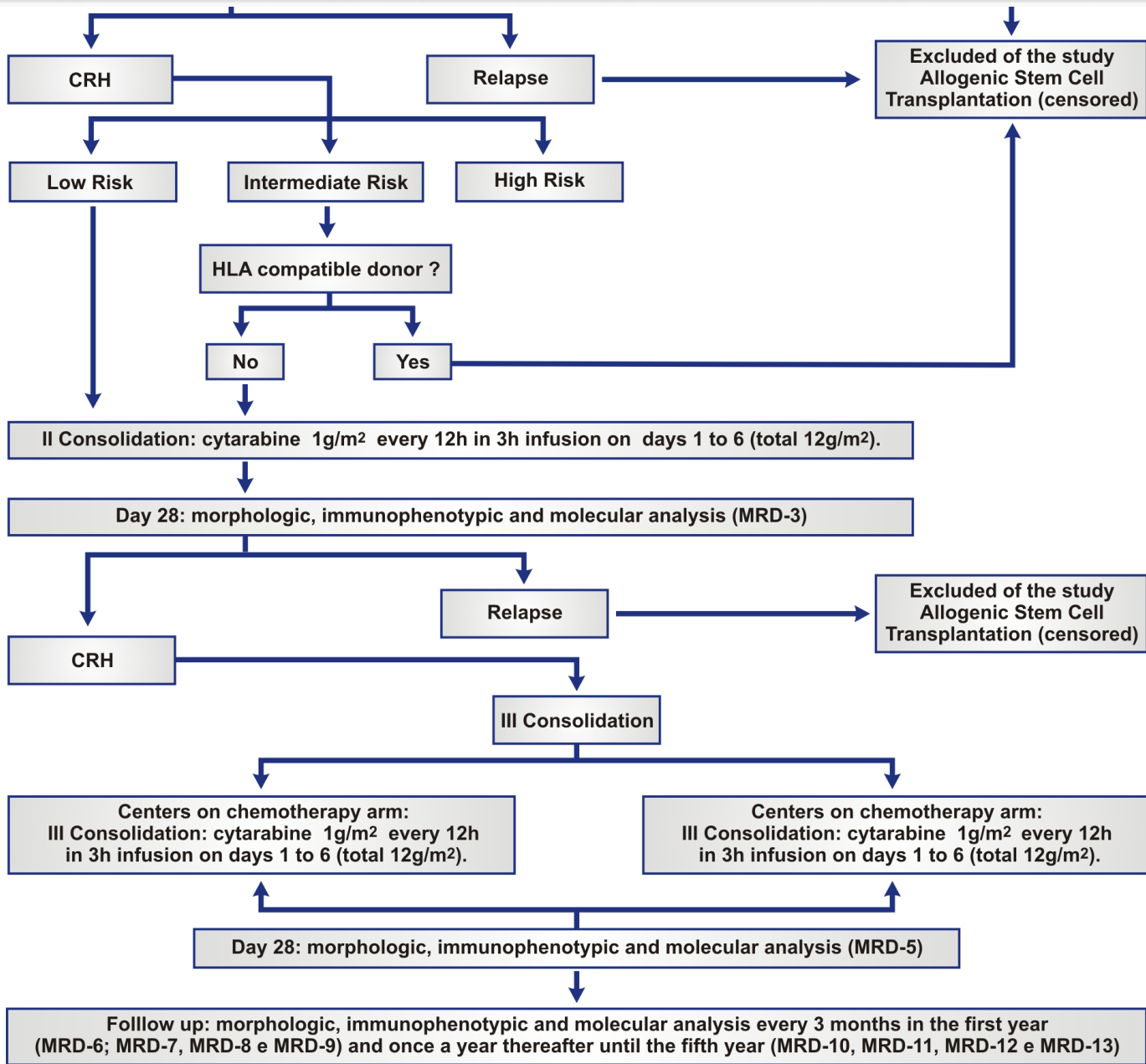
# *GRUPO DE RIESGO INTERMEDIO*

- Intermedio-I :
  - NPM1 mutado y FLT3-ITD con cariotipo normal;
  - NPM1 y FLT3-ITD con cariotipo normal;
- Intermedio II: t (9; 11) (p22; q23); MLLT3-MLL, alteraciones citogenéticas no clasificadas con riesgo favorable o alto.

# *GRUPO DE ALTO RIESGO*

- Los pacientes considerados de alto riesgo son aquellos que no presentan  $inv(16)$  ni  $t(16;16)$ , y reordenamientos  $CBF\beta /MYH11$  o  $RUNX1/RUNX1T1$  y presentan al menos uno de los siguientes criterios:
- Alteraciones genéticas de alto riesgo;
- Duplicación en tandem FLT3 con cariotipo anormal;
- Más de 100,000 leucocitos al diagnóstico





# CITOMETRIA DE FLUJO - ICAL

- método sencillo pero sensible y fácilmente aplicado a clínica
- costo relativamente bajo
- adaptado al trabajo en red
- permita la lectura de archivos por expertos a distancia

Painel sugerido por Dr Dario Campana

fluorochrome	FITC	PE	PerCP	APC	PECy7	APCH7
1	IgG2a	IgG1	34	117	33	45
2	38	HLA-Dr	34	117	33	45
3	7	11b	34	117	33	45
4	4	56	34	117	33	45
5	13	19	34	117	33	45
6	15	133	34	117	33	45
7	41	NG2	34	117	33	45

# CONTROL DE CALIDAD

## CUIDADO EN COLECCIÓN:

- Obtener 2 a 5ml en la primera aspiración de la médula (evitar dilución de la muestra.)
- Muestras en tubo con heparina. (EDTA interfiere con la calidad del Fycoll y causas degranulación de los neutrófilos)
- En heparina la muestra puede esperar más que 24h a temperatura del medio ambiente sin perder calidad.

## PRE ANALYSIS

- Para el estudio ERM es necesario tener un banco de muestras de médula ósea normal con al menos 6 muestras de M.O. sana y 4 muestra de M.O. en recuperación.
- Muestras de PBMC separadas utilizando un solo donante y para controlar la intensidad de la señal de los láseres.
- En el primer día de cada semana, descongelar alícuotas de la muestra PBMC y se las marca con un Ac-fluorocromo de cada color . Fijar con  $600 \mu\text{L}$  de formaldehído por 2 horas.
- Todos los días, después de pasar las beads de compensación, adquirir 10.000 eventos en cada color usando las muestras de PBMC y registrar la fluorescencia.

# EJEMPLO DE LA IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN DE LA ERM

VOLUME 31 · NUMBER 31 · NOVEMBER 1 2013

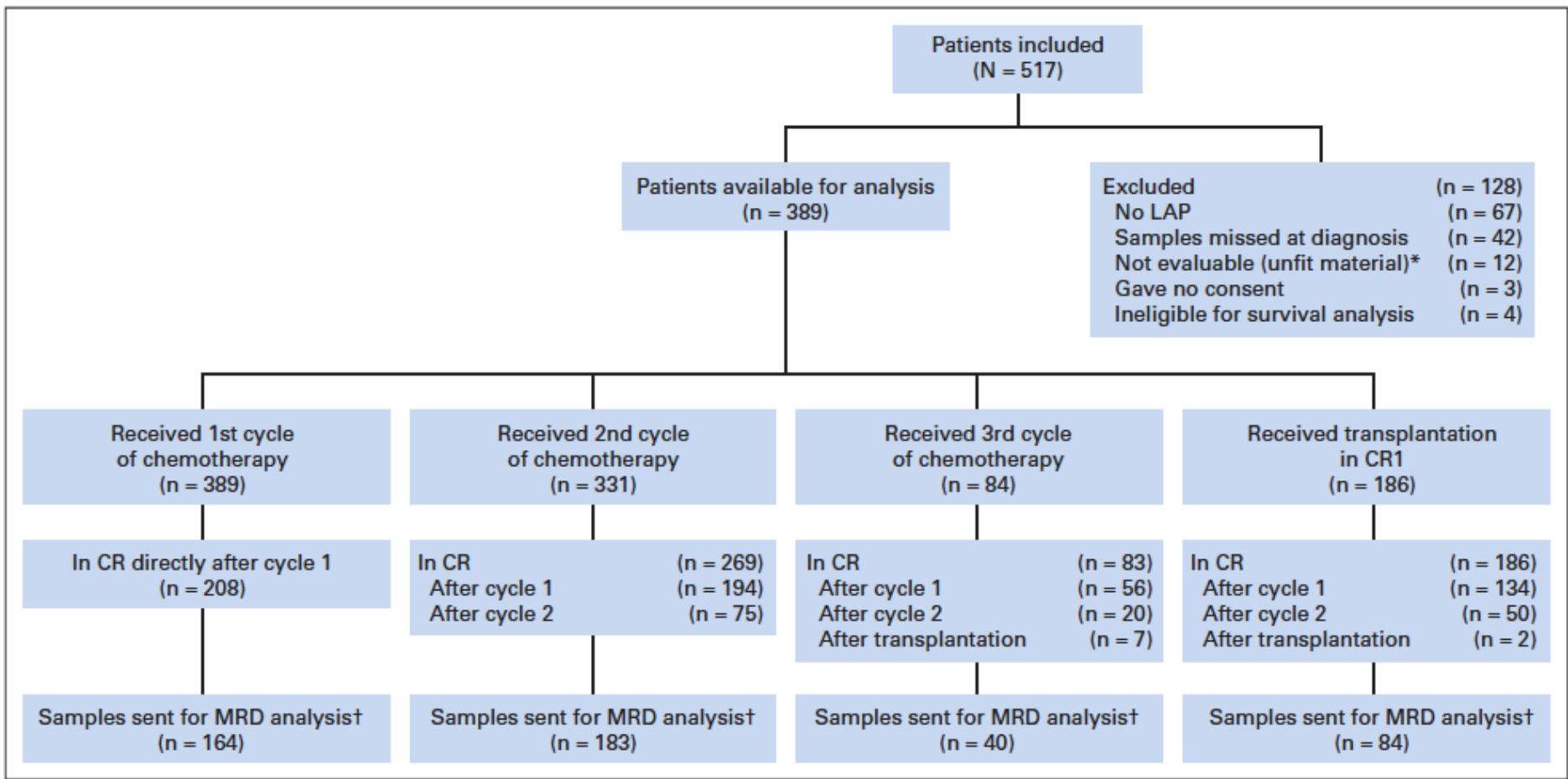
JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

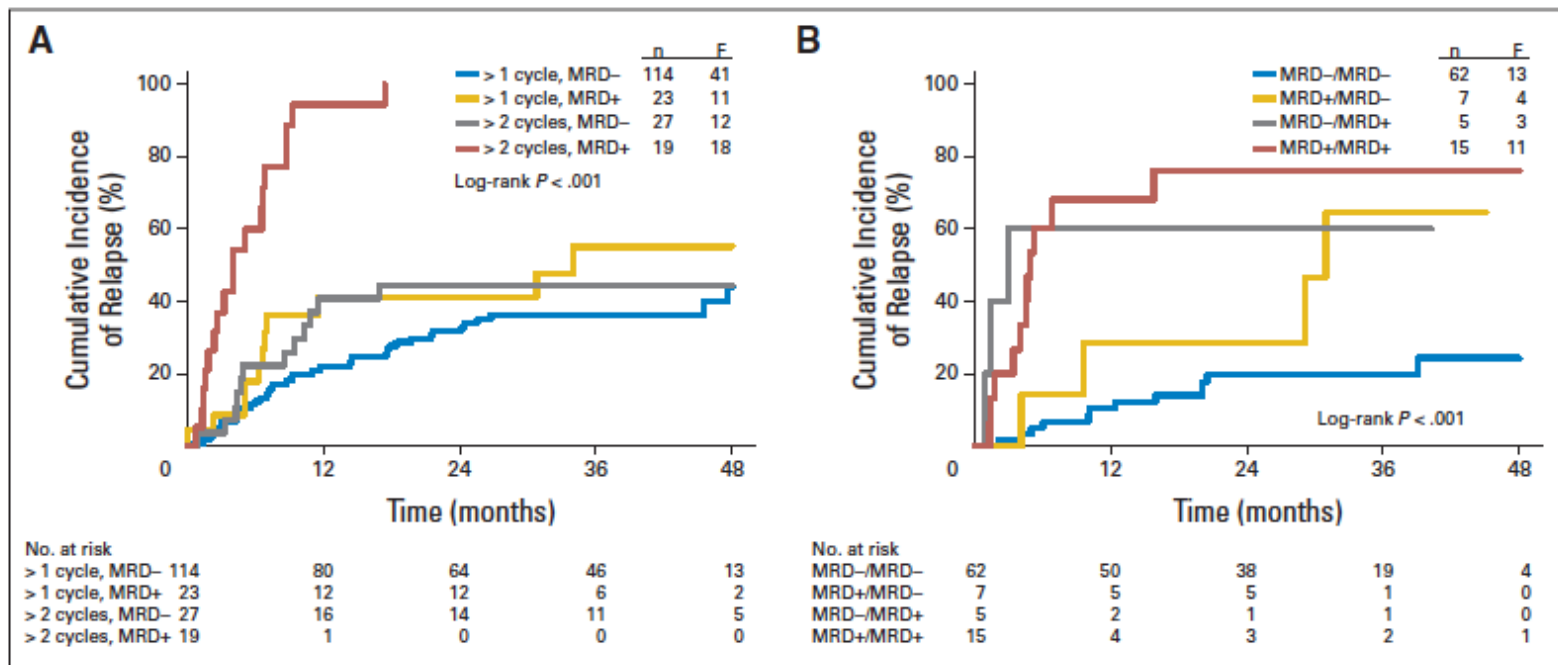
ORIGINAL REPORT

## High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study

*Monique Terwijn, Wim L.J. van Putten, Angèle Kelder, Vincent H.J. van der Velden, Rik A. Brooimans, Thomas Pabst, Johan Maertens, Nancy Boeckx, Georgine E. de Greef, Peter J.M. Valk, Frank W.M.B. Preijers, Peter C. Huijgens, Angelika M. Dräger, Urs Schanz, Mojca Jongen-Lavrecic, Bart J. Biemond, Jakob R. Passweg, Michel van Gelder, Pierre Wijermans, Carlos Graux, Mario Bargetzi, Marie-Cecile Legdeur, Jurgen Kuball, Okke de Weerd, Yves Chalandon, Urs Hess, Leo F. Verdonck, Jan W. Gratama, Yvonne J.M. Oussoren, Willemijn J. Scholten, Jennita Slomp, Alexander N. Snel, Marie-Christiane Vekemans, Bob Löwenberg, Gert J. Ossenkoppele, and Gerrit J. Schuurhuis*







**Fig 4.** Relapse incidence by minimal residual disease (MRD). (A) After cycle 2, split by complete response reached after cycle 1 or 2 and combined with MRD status after cycle 2. (B) After consolidation treatment, split by MRD status after induction cycle 2. F, failure; MRD-, MRD  $\leq$  0.1%; MRD+, MRD  $>$  0.1%.

# RETOS DEL PROTOCOL

- Formación de Red y definición de laboratorios nacionales de referencia
- Tiempo de transporte / costo de transporte
- Entrenamiento del equipo en todos países
- Reactivos estandarización y titulación
- Control de calidad – interno y externo