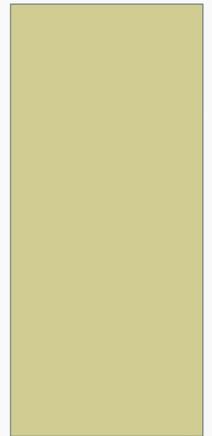


EXPERIENCIA BRASILEIRA CON LABORATORIOS EN RED. MODELO USADO EN LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA

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





INTERNATIONAL MEMBERS COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY

Decembre 2004



Misión : Promover la interacción entre clínicos y investigadores de países en desarrollo , con el objetivo de mejorar los resultados del tratamiento y la creación de una infraestructura nacional de ensayos clínicos y de investigación

LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA COMO MODELO

- **Enfermedad rápidamente mortal si no tratada, pero altamente curable si el acceso al diagnóstico es rápido y la atención especializada está disponible**
- **La terapia se basa en medicamentos relativamente baratos**
- **Retos científicos relevantes**

VENTAJAS DEL ENFOQUE DE RED

- **Cambio de informaciones entre expertos**
- **Estandarización de metodología de diagnóstico y seguimiento**
- **Estandarización de la terapia (incluso de soporte)**
- **Control de calidad**
- **Número de enfermos permitiendo evaluación sistemática y análisis estadística**
- **Apoyo internacional para hacer frente a las dificultades en infraestructura**

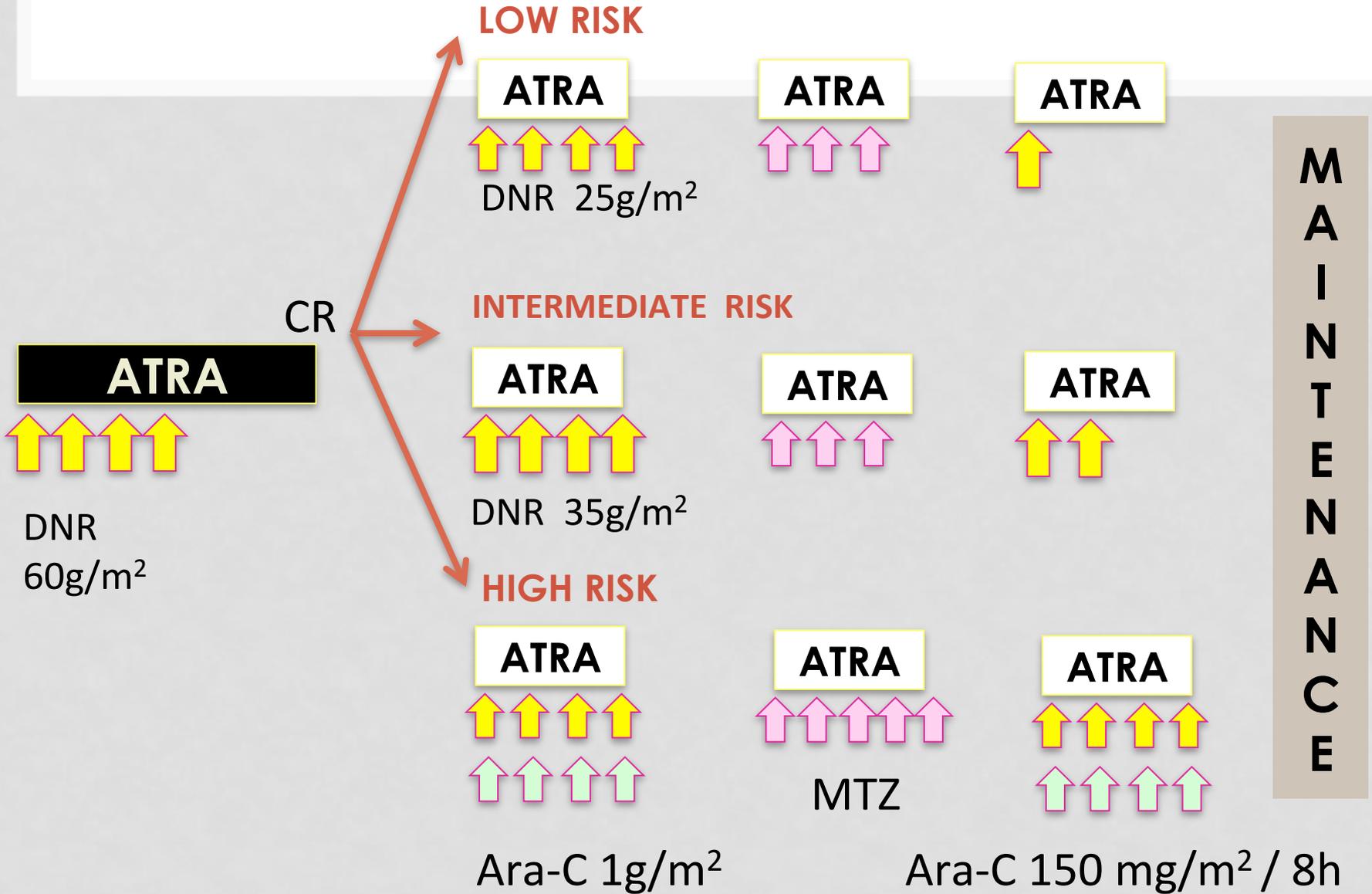
DIFERENCIAS ENTRE ICAL Y ESTUDIOS PATROCINADOS POR LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

- **Organización de red local (a nivel nacional)**
- **Infraestructura permanente**
- **Programa educacional médico**
- **Propiedad intelectual**

EXIGENCIAS DE LA RED ICAL

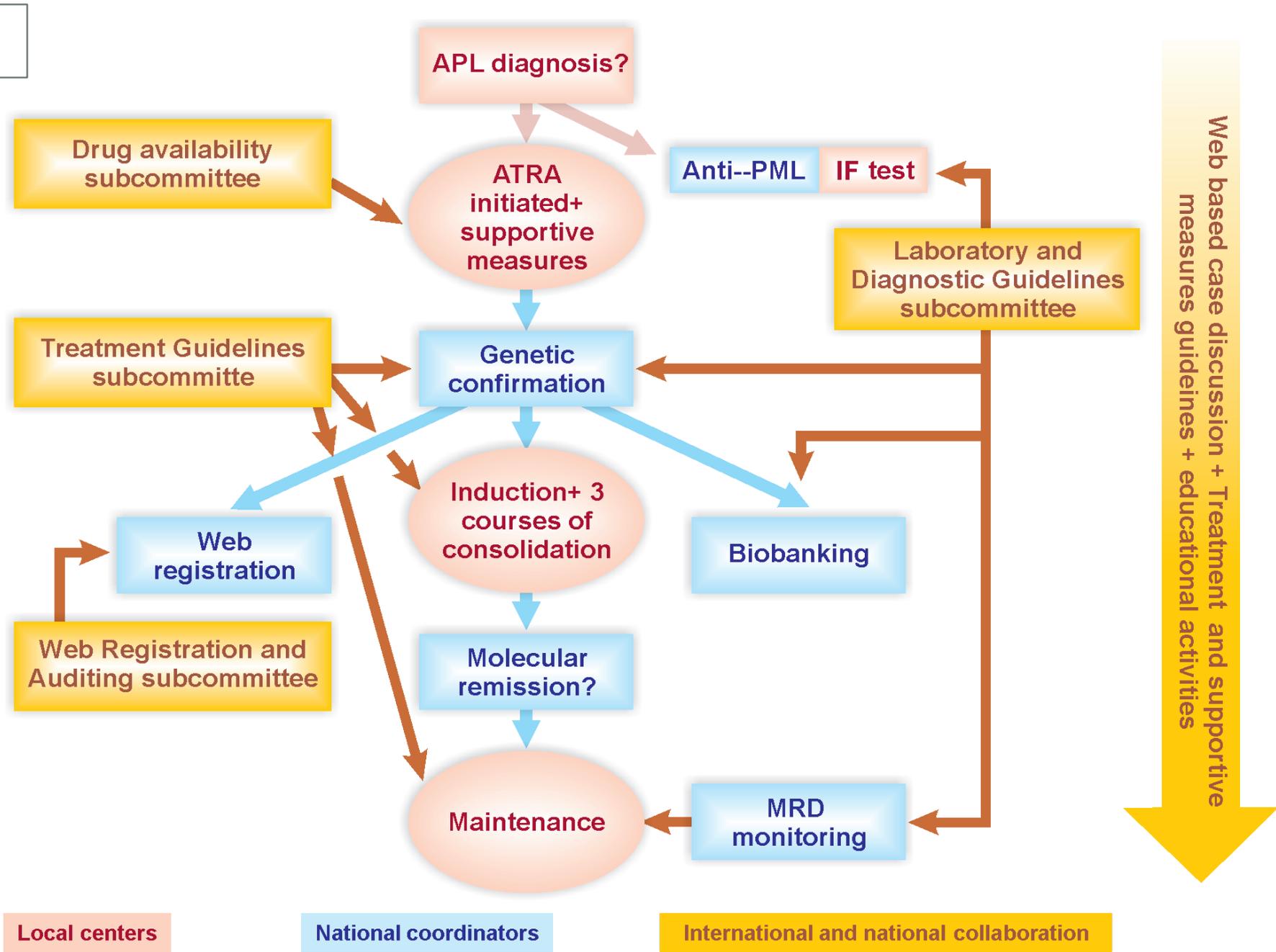
- **Protocolo de diagnóstico y tratamiento adecuado para los pacientes con estatus socioeconómico bajo**
- **El diagnóstico rápido = tratamiento temprano**
- **La disponibilidad de anticuerpos anti- PML (PG- M3)**
- **Biobancos**
- **Un control eficaz de la respuesta molecular al tratamiento (PML / RARA)**
- **Gestión de datos basada en Internet**
- **Programa educativo a través de videoconferencia y reuniones locales / internacionales**

PROTOCOLLO GEMELO AL PETHEMA 2005



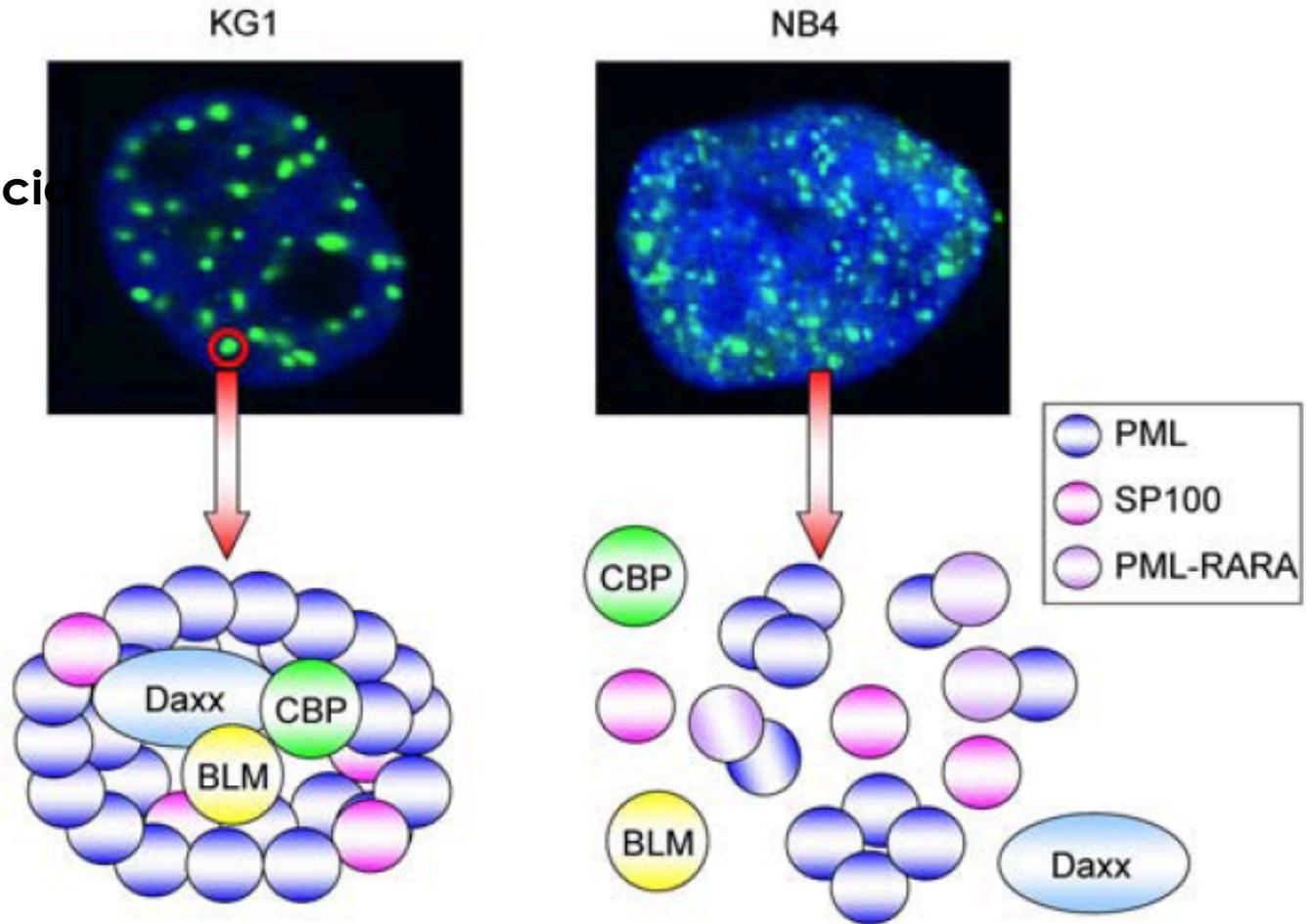
EJEMPLO DEL MANUSEO DE UN CASO

- **Sospechas morfológica de LPA : recoger la médula ósea y comenzar ATRA**
- **Se procesaron muestras :**
- **Localmente : morfología, IF con PGM3 , pruebas de coagulación**
- **En el laboratorio central nacional : IF con PGM3 , confirmación genética (RT-PCR)**
- **Amuestras almacenadas en el laboratorio central**
- **Transfusión para mantener recuentos de plaquetas > 30.000 / l y fibrinógeno > 150 mg / dl**
- **Después de la confirmación genética (24h) - Iniciar daunorrubicina**
- **Discusión a través de Internet utilizando Cure4Kids**



PML/RARA DESORGANIZA LOS NUCLEAR BODIES

Inmunofluorescencia con anti-PML



ANTI-PML IF TECHNIQUE

-
- - Fix slides at room temperature in methanol (5 minutes)
- - Fix slides in cold (kept at -20°C) acetone (2 minutes)
- - Wash in phosphate-buffered saline (PBS 1X) (15 minutes)
- - Dry the slides with paper in the area around the cells without touching them
- - Incubate fixed slides for 30 min. in a humidified chamber with the PG-M3 MoAb (diluted 1:10 with PBS + BSA 1%)(200ul for 1slide)
- - Wash in PBS 1X for 10 min..
- - Dry the slides with paper in the area around the cells without touching them.
- - Incubate for 30 min. in a humidified dark chamber with the FITC conjugated anti-mouse secondary antibody (dilute 1:15 with PBS+BSA1%).(150 ul for slise)
- - Wash in PBS 1X for 10 minutes
- - Dry the slides with paper in the area around the cells without touching them
- - Add DAPI (nuclear coloration, 4',6-diamidino-2-phenylindole)
- - Mount with coverslide and visualise PML distribution on immunofluorescence microscope.

kindly provided by Serena Lavorgna – Francesco LoCoco's Lab

CONFIRMACIÓN GENÉTICA

- **RT-PCR**
- **FISH**
- **Cariotipo**
- **RQ-PCR**

Para biología molecular – muestras de médula ósea recogidas en tubos con EDTA. El volumen total debe ser 4 ml.

Homogeneizar la muestra inmediatamente después de la obtención.

La muestra debe ser transportada 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

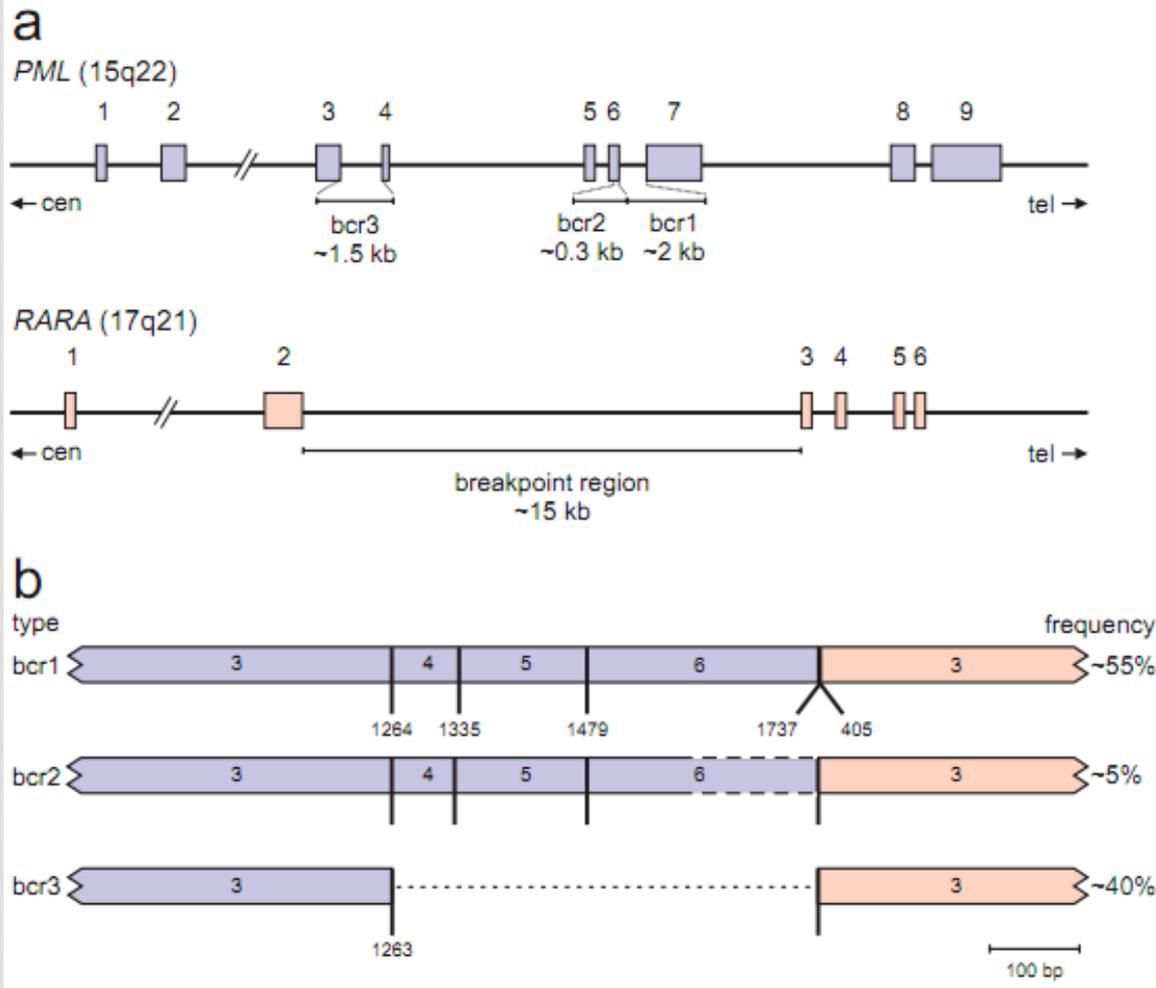
¿COFIRMACIÓN POR CITOMETRIA DE FLUJO?

“multiparameter flow cytometry can improve the accuracy of diagnosis, particularly in patients with morphologic features evoking a microgranular (variant) subtype. However, patients with morphologic and/or immunophenotypic features suggestive of APL without the PML/RARA rearrangement, and vice versa, have been described in the literature”

Sanz et al. Blood. 2009;113:1875-1891

- Grimwade D, et al.. Blood. 2000;96:1297-1308.

RT-PCR - PUNTOS DE QUIEBRA



**Primers: BIOMED-1
van Dongen et al.
Leukemia (1999) 13,
1901-1928**

RT-PCR PARA PML/RARA

- **Rápida y barata**
- **Debe ser ajustada para una sensibilidad de 1 en 10.000 células**
 - **NB4 (bcr1) o células de un caso (bcr3) - hacer diluciones en mononucleares de la sangre (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1: 100.000, 1:1000000)**
 - **La banda debe ser identificada hasta la dilución 1:10.000 o 1:100.000, pero nunca en la de 1:1000000)(10⁻⁶)**
 - **Almacenar muestras de las diluciones**

DETERMINACIÓN DE ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA (MRD)

- **La determinación ha sido hecha por RT-PCR al final del tercer ciclo de consolidación y cada 3 meses durante el mantenimiento. Después del término del tratamiento cada 3 meses por 2 años.**
- **La sensibilidad del examen fue ajustada para una célula leucémica en 10.000 normales**

PERSISTENCIA Y RECAÍDA MOLECULAR

- **Persistencia molecular fue definida como la positividad en el examen de RT-PCR en dos muestras consecutivas obtenidas al final del tercer ciclo de consolidación**
- **Recaída fue definida como el resurgimiento de la banda correspondiente al *PML/RARA* en dos muestras consecutivas obtenidas con 15 días de diferencia en cualquier tiempo después**

¿ Y LA RQ-PCR ?

- **Estudio retrospectivo**
- **Muestras de médula ósea de 74 pacientes sometidos al protocolo de tratamiento de IC- APL**
- **Las muestras se recogieron secuencialmente diagnóstico (n = 74) , después de la inducción (n = 48) , después de tercera consolidación (n = 41) y mantenimiento (n = 239)**

METODOLOGIA DE RQ-PCR

- El número de transcriptos del PML/RARA fueron normalizados de acuerdo con la expresión del gen de control ABL, utilizando curvas estándar hechas basadas en dilución de un plásmido comercial (Ipsogen , Marsella , Francia) .
- Las muestras se realizaron por triplicado y la amplificación de al menos dos de tres réplicas con valor $Ct \leq 40$ se utilizó para definir los resultados como positivos.
- Los pacientes fueron considerados en remisión clínica molecular (CMR) cuando ningún transcripto PML/RARA fuera detectado por RQ- PCR

RQ- VERSUS RT-PCR DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN

- La tasa de remisión molecular después del tratamiento de inducción fue de 37.5% (18/48) basado en la RQ-PCR y de 48.9% (24/49) según la RT-PCR.
- De los 30 enfermos con resultados positivos por la RQ- PCR – dos recayeran en la fase de mantenimiento
- De los 25 pacientes con resultados positivos por RT –PCR solo uno recayó.

RQ- VERSUS RT-PCR DURANTE CONSOLIDACIÓN Y MANTENIMIENTO

- **Se estudiaron 239 muestras**
 - **86,1 % (206/239) fueron negativos por RQ**
 - **92,8 % (222/239) fueron negativos por RT**
- **Los resultados de los dos métodos fueron concordantes en 93,7 % (224/239) de las pruebas.**

RECLUTAMIENTO EN EL ICAL PROTOCOL

Tiempo mediano de seguimiento: 39 meses

País	N
Brazil	228
Chile	63
Mexico	30
Paraguay	4
Peru	27
Uruguay	24
Total	376

DATOS DEMOGRÁFICOS

Variable	
Idad (mediana)	34 years (15 – 81)*
Genero	M: 192 , F: 177
PETHEMA/GIMEMA grupo de riesgo	
Alto	141 (37.5%)
Intermediário	184 (49%)
Bajo	51 (13.5%)
PML breakpoint	
BCR1	245 (65.2%)
BCR2	11 (3%)
BCR3	119 (31.7%)
Coagulopatía (S/N)	114/69 (62%/38%)
FLT3-ITD	35/171 (20.4%)

* Mediana (rango)

INDUCCIÓN

- Taja de remisión completa: 84%

País	N	Muertes en inducción
Brazil	228	22
Chile	63	8
Mexico	30	6
Paraguay	4	1
Peru	27	4
Uruguay	24	1
Total	376	42 (11%)

**Interim analysis: 183 enfermos
Junio 2006 hasta Septiembre 2010.
Taja de moratilidad temprana
(TMT): 15%
TMT antes del IC-APL: 32%**

Resistencia primaria: 2 casos

CAUSAS DE MUERTE DURANTE LA INDUCCIÓN

Causas de muerte	n (%)
Hemorragia	25 (59%)
Infecciones	8 (19%)
Síndrome de diferenciación	7 (16.5%)
Resistência	1 (2.4%)
Thrombosis	1 (2.4%)

RESULTADOS A LARGO PLAZO

- **3y overall survival: 78% (95% CI: 71 - 84%)**
- **3y disease-free survival: 84% (95% CI: 76 – 90%)**
- **3y cumulative incidence of non-relapse mortality: 5.7 % (95% CI: 2.7 – 10.5%)**
- **3y incidence of relapse: 10.1 % (95% CI: 5.5% - 16.5%)**

PERSPECTIVAS

- **Todavía es posible reducir la mortalidad en los primeros días desde el diagnóstico hasta que el tratamiento sea iniciado**
- **Intensificar el programa educacional con el objetivo de disminuir la mortalidad causada por el SD**
- **Involucrar más países y ganar una mayor diversidad de experiencias**
- **Mejorar los resultados en el grupo de alto riesgo**
- **Ampliar las actividades del ICAL – empezando un protocolo para otros subtipos de LMA.**

AGRADECIMIENTOS

US and Europe

- Nancy Berliner
- Robert Gallagher
- David Grimwade
- Haesook Kim
- Hau Kwaan
- Francesco Lo-Coco
- Bob Lowenberg
- Charlotte Niemeyer
- Raul Ribeiro
- Miguel Sanz
- Stanley Schrier
- Martin Tallman

Latin America

- Brazil
 - Rodrigo Bendlin
 - Rosane Bittencourt
 - Cristina Bortolheiro
 - Maria L. Chauffaille
 - Carlos Chiattono
 - Evandro Fagundes
 - Rafael H. Jacomo
 - Raul Melo
 - Katia Pagnano
 - Ricardo Pasquini
 - Fernanda Souto

Paraguay

- José Zarza
- Victor Salinas
- Ana Ayala

• Mexico

- Homero Gutiérrez-Aguirre
- David Gomez-Almaguer
- Guillermo Ruiz-Arguelles
- Javier Garces-Eisele
- Luis A Meillon

• Uruguay

- Cecilia Guillermo
- Lem Martinez
- Isabel Moro
- Pablo Muxí
- Carolina Oliver
- Rosario Uriarte

• Chile

- Soledad Unduraga

• Peru

- Juan Navarro
- Ninoska Rojas

AGRADECIMIENTOS

- Este estudio fue realizado bajo los auspicios de International Members Committee of the American Society of Hematology
- Apoyados por:



- Fundacion Mexicana para la Salud
- Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo
- St Jude Children's Research Hospital
- Roche South Arabia
- Cephalon Europe



Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO**