

***PROYECTO DE CENTRALIZACION
DE MUESTRAS DE LMA EN
EXTREMADURA. REGISTRO
PROSPECTIVO. EVOLUCIÓN
CLONAL***

*Baldomero Moriano Palacios
FEA Hematología y Hemoterapia
Complejo Hospitalario Universitario de Cáceres*

Conflicto de interés

- He proporcionado asesoramiento científico: NA
- He participado en reuniones médicas organizadas: *Janssen, Astellas*
- He recibido fondos para investigación: NA
- He recibido pagos por presentaciones y asesoría: NA
- Recibo honorarios por esta presentación.

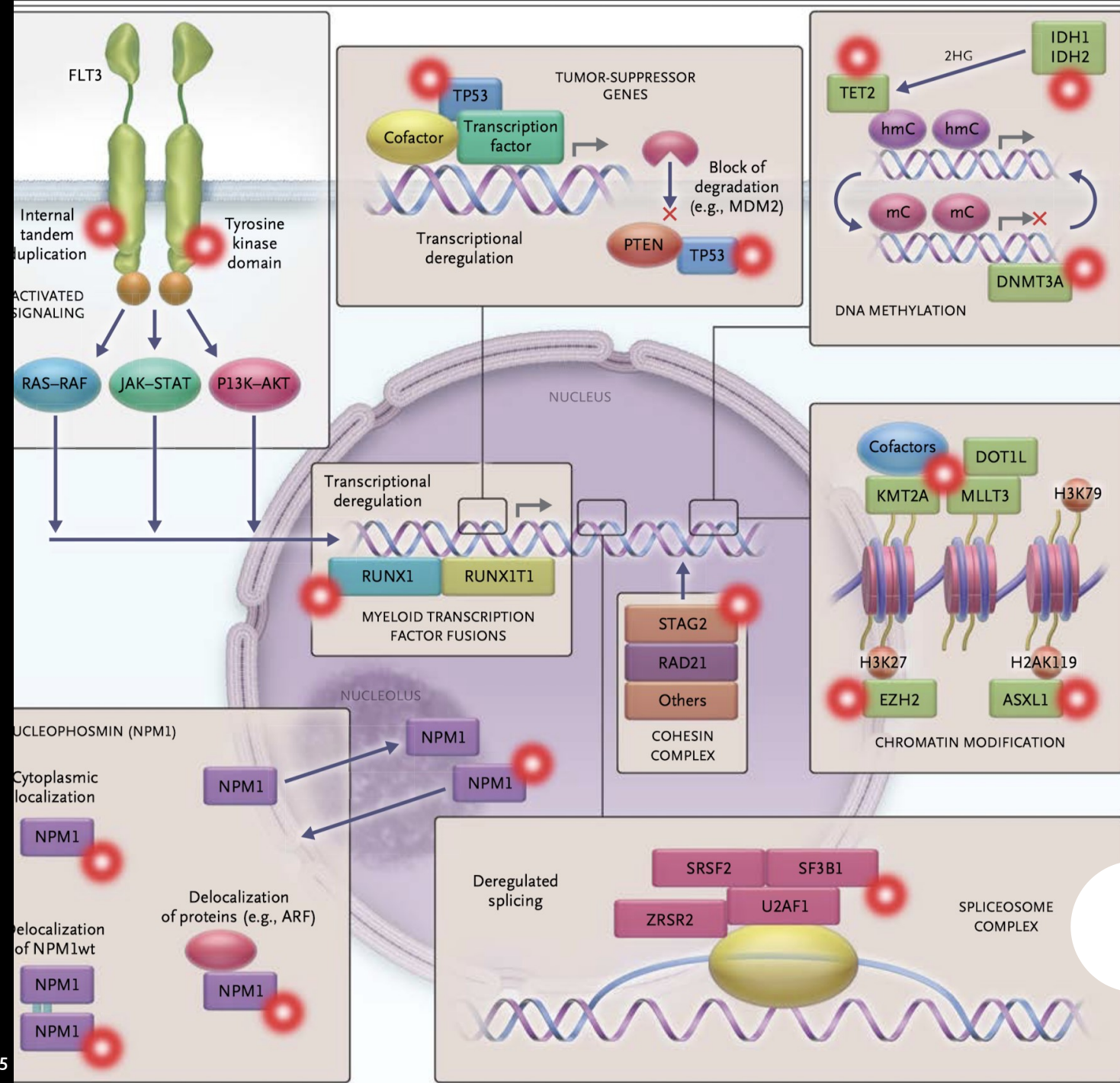
Introducción

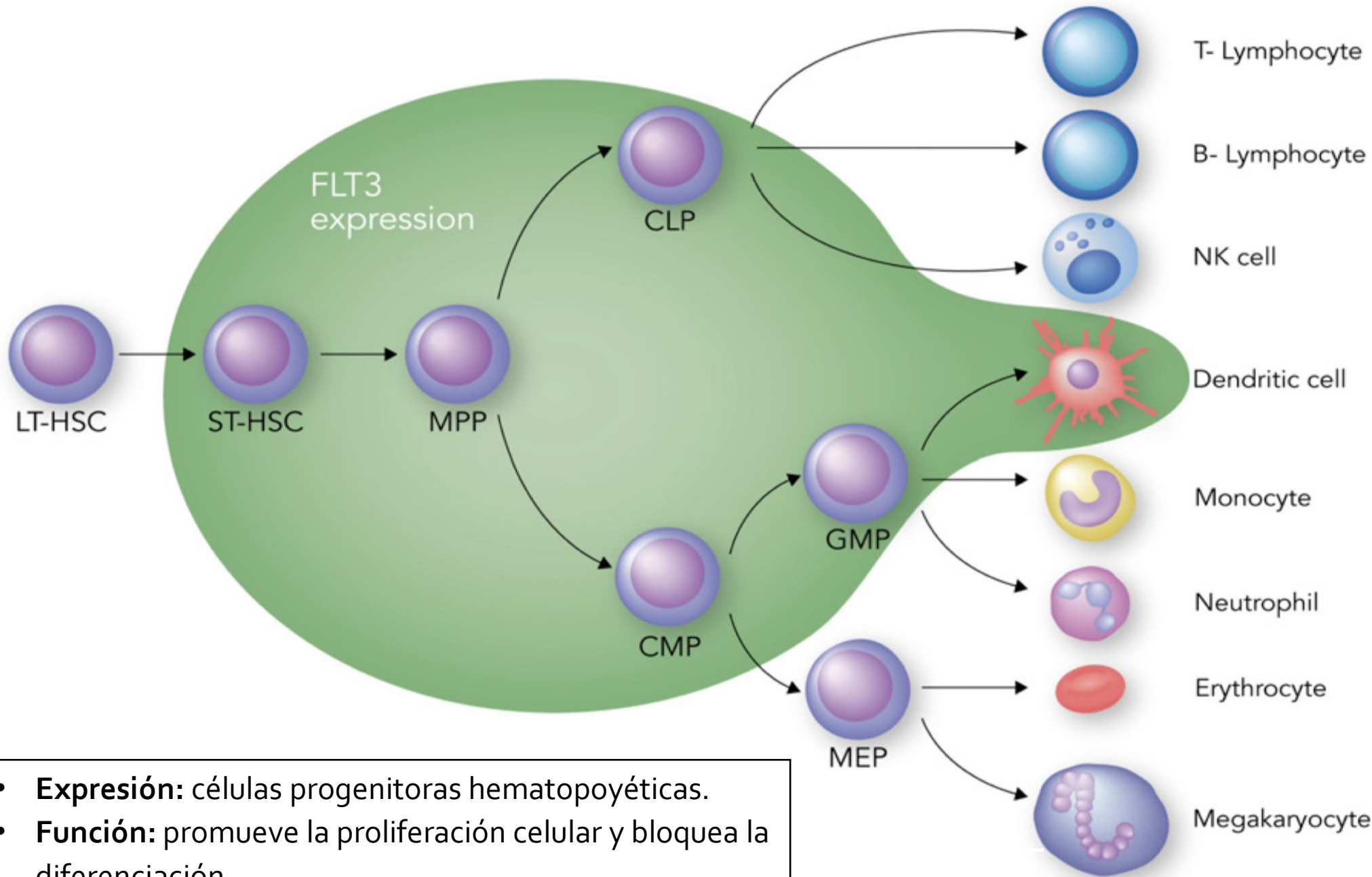
- La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad muy heterogénea que deriva de la adquisición secuencial de mutaciones driver específicas en la stem cell leucémica.
- Incidencia: 3,8 casos/100.000 habitantes/año.
- Mediana de edad: 65-70 años.

Espectro mutacional de LMA

Categorías funcionales de genes mutados:

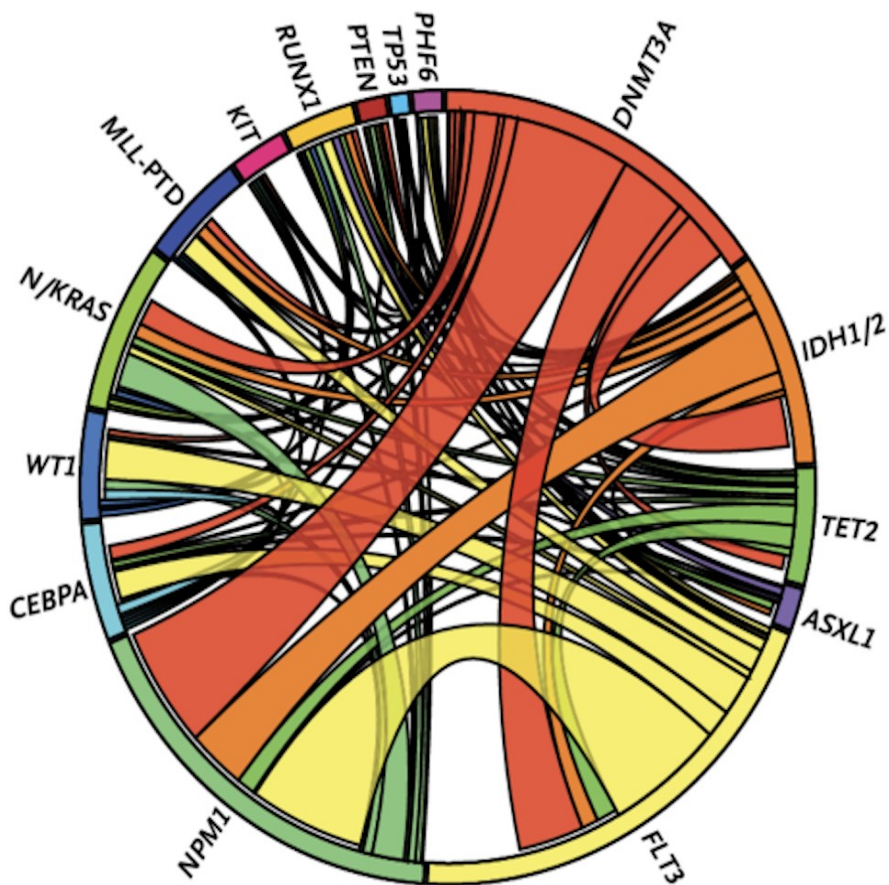
1. Señalización celular
2. Genes supresores tumorales
3. Genes de metilación del DNA
4. Factores de transcripción
5. Complejo de cohesinas
6. Modificadores de cromatina
7. Transporte núcleo-citoplasma
8. Genes de splicing





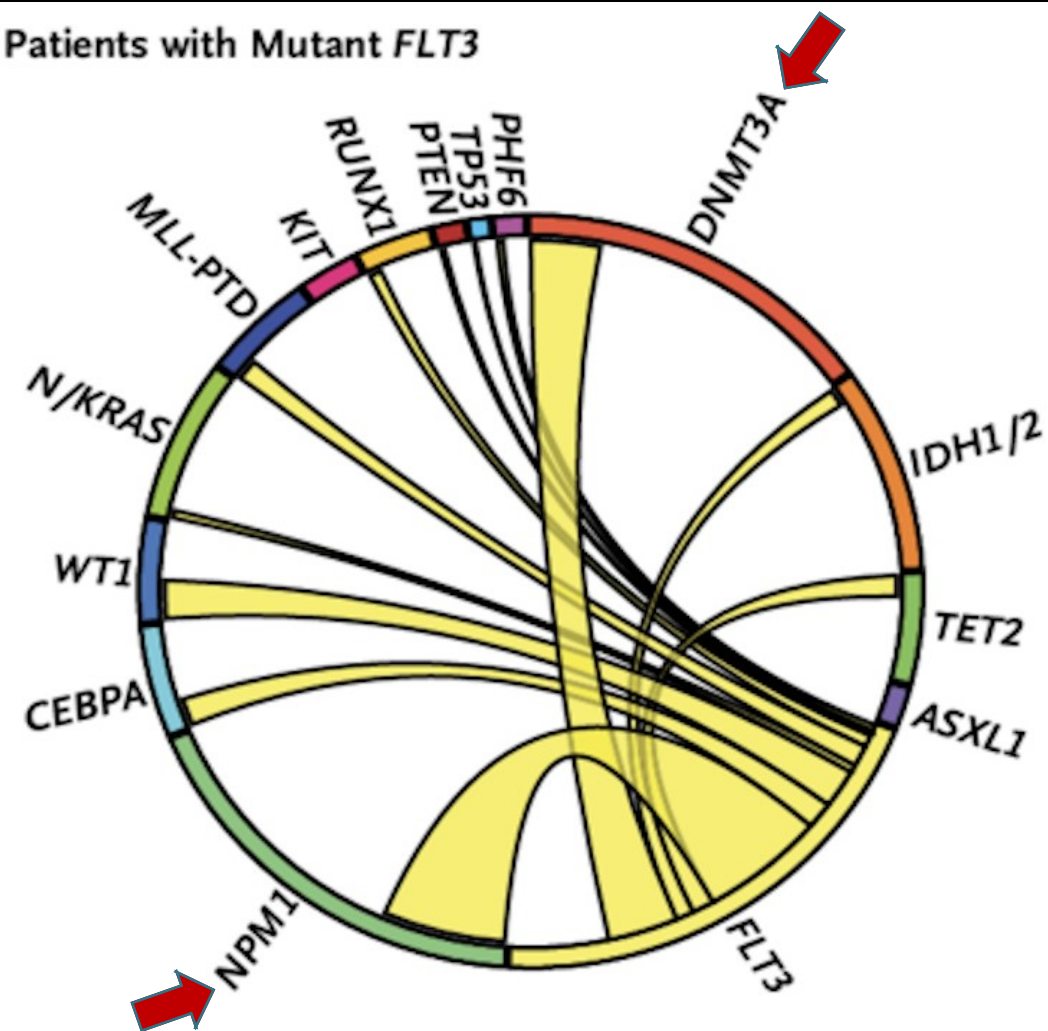
- **Expresión:** células progenitoras hematopoyéticas.
- **Función:** promueve la proliferación celular y bloquea la diferenciación

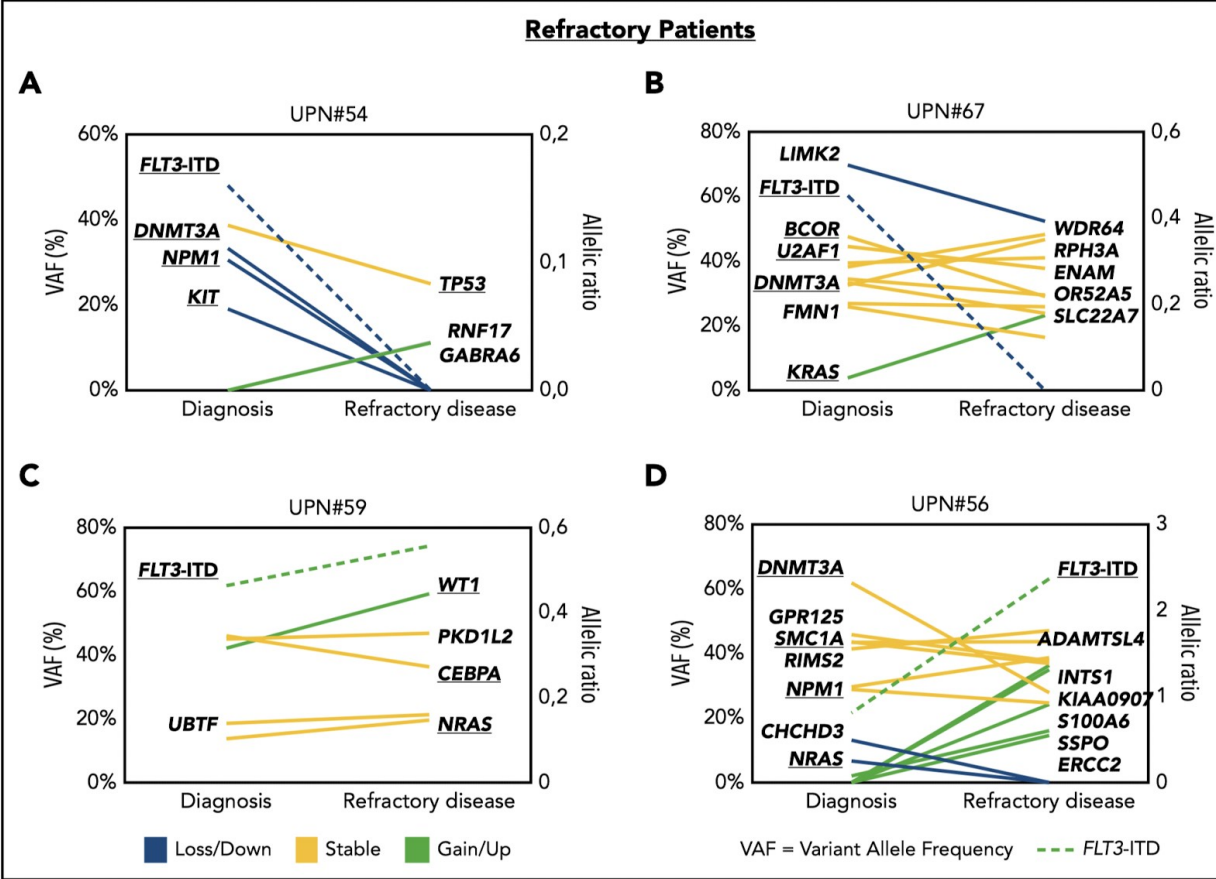
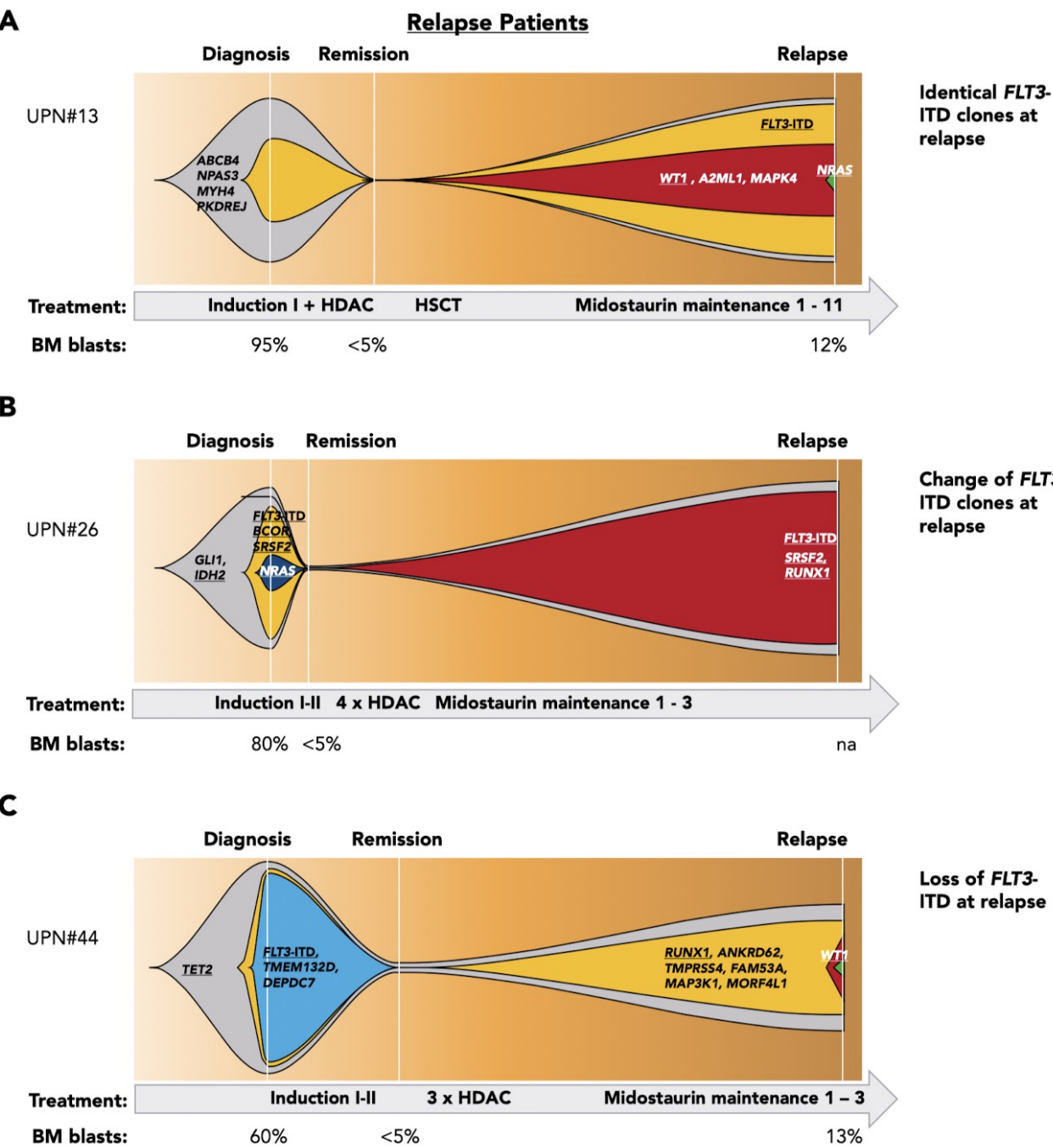
Total Cohort



Gene	Overall Frequency (%)
FLT3 (ITD, TKD)	37 (30, 7)
NPM1	29
DNMT3A	23
NRAS	10
CEBPA	9
TET2	8
WT1	8
IDH2	8
IDH1	7
KIT	6
RUNX1	5
MLL-PTD	5
ASXL1	3
PHF6	3
KRAS	2
PTEN	2
TP53	2
HRAS	0
EZH2	0

Patients with Mutant FLT3





Referencias

1. Schmalbrock LK, Dolnik A, Cocciardi S, Sträng E, Theis F, Jahn N, Panina E, Blätte TJ, Herzig J, Skambraks S, Rücker FG, Gaidzik VI, Paschka P, Fiedler W, Salih HR, Wulf G, Schroeder T, Lübbert M, Schlenk RF, Thol F, Heuser M, Larson RA, Ganser A, Stunnenberg HG, Minucci S, Stone RM, Bloomfield CD, Döhner H, Döhner K, Bullinger L. Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood*. 2021 Jun 3;137(22):3093-3104. doi: 10.1182/blood.2020007626. PMID: 33598693; PMCID: PMC8233666.
2. Levis MJ, Perl AE, Altman JK, Gocke CD, Bahceci E, Hill J, Liu C, Xie Z, Carson AR, McClain V, Stenzel TT, Miller JE. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with *FLT3*-ITD mutations. *Blood Adv*. 2018 Apr 24;2(8):825-831. doi: 10.1182/bloodadvances.2018015925. PMID: 29643105; PMCID: PMC5916006.
3. Grob T, Sanders MA, Vonk CM, Kavelaars FG, Rijken M, Hanekamp DW, Gradowska PL, Cloos J, Fløisand Y, van Marwijk Kooy M, Manz MG, Ossenkoppele GJ, Tick LW, Havelange V, Löwenberg B, Jongen-Lavrencic M, Valk PJM. Prognostic Value of *FLT3*-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2023 Feb 1;41(4):756-765. doi: 10.1200/JCO.22.00715. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36315929.
4. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Fischer T, Döhner K; German-Austrian AML Study Group (AML SG). Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2386-92. doi: 10.1182/blood-2009-03-209999. Epub 2009 Jul 14. PMID: 19602710.
5. Ayala R, Carreño-Tarragona G, Barragán E, Boluda B, Larráyoiz MJ, Chillón MC, Carrillo-Cruz E, Bilbao C, Sánchez-García J, Bernal T, Martínez-Cuadron D, Gil C, Serrano J, Rodríguez-Medina C, Bergua J, Pérez-Simón JA, Calbacho M, Alonso-Domínguez JM, Labrador J, Tormo M, Amigo ML, Herrera-Puente P, Rapado I, Sargas C, Vazquez I, Calasanz MJ, Gomez-Casares T, García-Sanz R, Sanz MA, Martínez-López J, Montesinos P. Impact of FLT3-ITD Mutation Status and Its Ratio in a Cohort of 2901 Patients Undergoing Upfront Intensive Chemotherapy: A PETHEMA Registry Study. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 24;14(23):5799. doi: 10.3390/cancers14235799. PMID: 36497281; PMCID: PMC9737662.
6. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079-89. doi: 10.1056/NEJMoa1112304. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22417203; PMCID: PMC3545649.
7. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4326-35. doi: 10.1182/blood.v99.12.4326. PMID: 12036858
8. Kennedy VE, Smith CC. *FLT3* Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol*. 2020 Dec 23;10:612880. doi: 10.3389/fonc.2020.612880. PMID: 33425766; PMCID: PMC7787101.
9. atnaik MM. The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018 Oct;59(10):2273-2286. doi: 10.1080/10428194.2017.1399312. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29164965
10. Chen F, Sun J, Yin C, Cheng J, Ni J, Jiang L, Wang Q, Yu G, Wei Y, Liu X, Sun J, Carter BZ, Jiang X. Impact of FLT3-ITD allele ratio and ITD length on therapeutic outcome in cytogenetically normal AML patients without NPM1 mutation. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Apr;55(4):740-748. doi: 10.1038/s41409-019-0721-z. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31645666.
11. Reville PK, Sasaki K, Kantarjian HM, Daver NG, Yilmaz M, Dinardo CD, Short NJ, Borthakur G, Pemmaraju N, Mehta RS, Pierce S, Konoplev SN, Khoury JD, Garcia-Manero G, Konopleva MY, Jabbour E, Ravandi F, Kadia TM. Improved outcomes among newly diagnosed patients with FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication mutated acute myeloid leukemia treated with contemporary therapy: Revisiting the European LeukemiaNet adverse risk classification. *Am J Hematol*. 2022 Mar 1;97(3):329-337. doi: 10.1002/ajh.26451. Epub 2022 Jan 8. PMID: 34981570; PMCID: PMC8884919.
12. himony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2023 Jan 2. doi: 10.1002/ajh.26822. Epub ahead of print. PMID: 36594187.
13. Staudt D, Murray HC, McLachlan T, Alvaro F, Enjeti AK, Verrills NM, Dun MD. Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 16;19(10):3198. doi: 10.3390/ijms19103198. PMID: 30332834; PMCID: PMC6214138.
14. Levis M, Perl AE. Gilteritinib: potent targeting of FLT3 mutations in AML. *Blood Adv*. 2020 Mar 24;4(6):1178-1191. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000174. PMID: 32208491; PMCID: PMC7094008.

Proyecto

***PROYECTO DE CENTRALIZACION
DE MUESTRAS DE LMA EN
EXTREMADURA. REGISTRO
PROSPECTIVO. EVOLUCIÓN
CLONAL***



Objetivos

- Crear un **registro prospectivo de pacientes con LMA en R/R en Extremadura**, con el objetivo de obtener información del perfil molecular, comparando la biología de la enfermedad en la recaída con los datos al diagnóstico.
- Creación de biobanco para almacenar muestras de pacientes con LMA R/R.
- Ampliar en un segundo término el perfil mutacional con **estudios de NGS/single-cell...**

Metodología

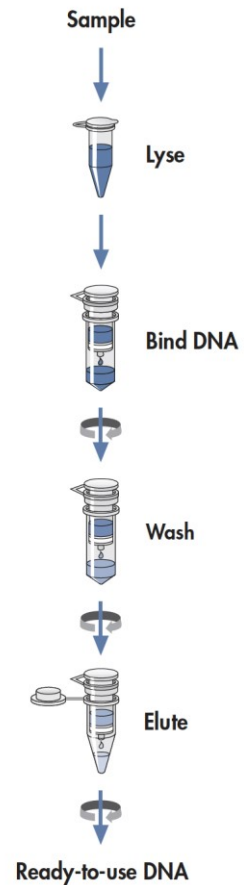
PCR y electroforesis capilar.

1. Extracción de DNA (sangre periférica/médula ósea):

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)



QIAamp DNA Investigator Procedure



Fully automatable on the QIAcube

Metodología

2. **PCR:** amplificación de los exones 14 y 15 del gen FLT3 empleando primers marcados con el fluorógeno 6-FAM.

- **Kit FLT3-ITD: Imegen^R (IMG-238).**
- Cantidad de ADN: 50 ng.
- Tipo de muestra: sangre periférica / médula ósea.
- Tiempo de trabajo manual: 30 minutos.
- Duración del programa de PCR: 1H 45 min.
- **Termociclador: CFX96 Biorad.**



Metodología

3. **Electroforesis capilar:** separación por tamaños de los fragmentos amplificados por PCR (patrón de tamaño **GeneScan™ 500 ROX™**).

Secuenciador: Analizador Genético Applied Biosystems™ SeqStudio (ThermoFisher Scientific).

- Cálculo de la ratio alélica.
- Límite de detección: 5%.
- Cumplimiento requisitos calidad especificados por la ISO 13485 e ISO 14001.

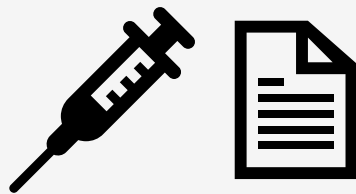


Desarrollo del proyecto





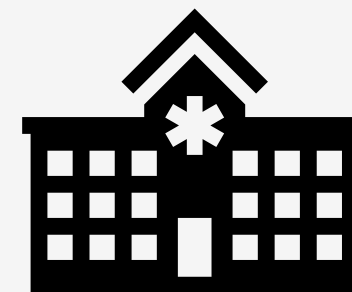
- Paciente con LMA R/R
- Información, entrega y firma consentimiento informado



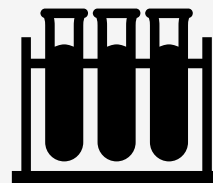
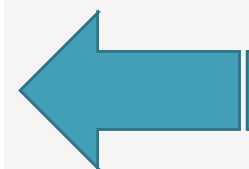
- Obtención de muestra (2 tubos EDTA: sp/mo)
- Formulario para el envío de la muestra



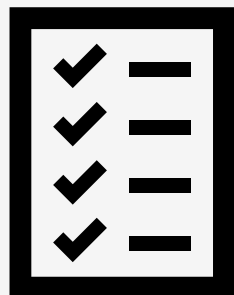
- Envío de muestras



- Recepción en laboratorio de hematología
H. San Pedro de Alcántara (Cáceres)



- Procesamiento de muestras
- Determinación de la mutación FLT3-ITD
- Criopreservación/Biobanco.



- Resultados (24-48h)

Agradecimientos: Para llevar a cabo este proyecto hemos contado con la colaboración de Astellas Pharma, Novartis y fondos públicos



Muchas gracias

