



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

**“PAPEL DE LA CITÓMICA FUNCIONAL EN EL ESTUDIO
DE MECANISMOS DE REFRACTARIEDAD DE LAS
NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS”**

Memoria de Tesis presentada por

Laura García Rico

Para optar al Grado de

Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

**“PAPEL DE LA CITÓMICA FUNCIONAL EN EL ESTUDIO DE MECANISMOS DE
REFRACTARIEDAD DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS”**

Memoria de Tesis presentada por

Laura García Rico

Para optar al Grado de

Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Investigación realizada en el **Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras**

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del **Dr. Jordi Pétriz González**

y la tutoría de la **Dra. Victòria Nogués Bara**

Laura García Rico

Jordi Pétriz González

Victoria Nogués Bara

La Doctoranda

El Director de Tesis

La Tutora de Tesis

Bellaterra, 2019

El Dr. Jordi Pétriz González, líder del Grupo de Investigación de Citómica Funcional del Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras del Campus ICO-Germans Trias i Pujol (Badalona),

CERTIFICA:

Que Laura García Rico ha realizado bajo su dirección y supervisión el trabajo de investigación que se expone en la memoria de Tesis titulada "*Papel de la citómica funcional en el estudio de mecanismos de refractariedad de las neoplasias hematológicas*" para optar al Grado de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que este trabajo se ha llevado a cabo en Grupo de Investigación de Citómica Funcional del Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras, Campus ICO-Germans Trias i Pujol (Badalona).

Y para que así conste, se firma el presente certificado:

Jordi Pétriz González

El Director de Tesis

Laura García Rico

La Doctoranda

Badalona, 2019

A mi yaya,

*que solía decirme:
“oye, tú curas muy bien el cáncer, ¿no?”*

En tu memoria, aquí tienes mi granito de arena

AGRADECIMIENTOS

En aquest moment, només puc donar **GRÀCIES**. Gràcies a totes i a tots, ja que sou moltes persones que heu posat el vostre granet de sorra per a fer aquest projecte possible.

Ningú va dir que fer un projecte de tesi doctoral fos fàcil, i no ho ha estat. Durant 4 anys i 6 mesos hi ha hagut treball, esforç, estrès, llàgrimes i, evidentment, aprenentatge, molt aprenentatge, somriures, alegries, moments inoblidables, il·lusions, descobriments. En aquest temps he pogut créixer tant a nivell professional com a nivell personal, i és això, per sobre de tot, amb el que em quedo.

Per començar, vull donar les gràcies al **Jordi Petríz**, el meu *jefe*. Gràcies, en primer lloc, per confiar en mi per a fer el projecte de màster al teu grup de recerca de la Vall d'Hebron. I gràcies, després, per donar-me el suport i ajudar-me per a què pogués fer el projecte de Tesi Doctoral a l'Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC). Em sento molt afortunada i agraïda de tenir un *jefe* com tu. Durant aquest temps m'has ensenyat, m'has acompanyat, m'has donat suport, m'has motivat, m'has escoltat, m'has posat reptes, has confiat en mi per a participar d'altres projectes, has fet possible que vagi a congressos... Gràcies per tot el temps que has dedicat, i per la paciència que has tingut amb mi, sobretot en aquests últims mesos frenètics!

També voldria donar les gràcies a la meva tutora de la UAB, la **Victòria Nogués**, per la seva disponibilitat i disposició a resoldre tots els meus dubtes i a guiar-me en la realització de la Tesi Doctoral. Així com als membres de la comissió de seguiment de la Tesi, formada pel **Dr. Jaume Farrés**, el **Dr. Joan Carles Domingo** i el **Dr. Ginés Viscor**. Gràcies per any rere any reunir-vos amb mi, aconsellar-me, interessar-vos per la meva feina i ajudar-me.

El nostre grup de recerca no hagués tirat endavant si no hagués estat per l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras. Gràcies, **Sr. Josep Carreras**, i a totes les persones que hi ha darrera d'aquest gran projecte que és la Fundació i, que, dia a dia, ho dona tot per fer que la leucèmia i altres neoplàsies hematològiques es puguin curar. Gràcies, de la mateixa manera, al **Prof. Evarist Feliu** per confiar en nosaltres i donar-nos

suport, així com reconeixement. I, finalment, gràcies **Kiku**, per ser tant proper, per ajudar-nos i escoltar-nos. La nostra recerca és possible gràcies a vosaltres!

Quan vaig començar la tesi, al grup només hi érem en Jordi i jo, però de seguida es va omplir amb la incorporació de dos nois amb moltes ganes, motivació i il·lusió per formar part del nostre grup: l'**Àngel** i el **Jorge**. Gràcies, nois, per venir amb nosaltres, per fer créixer el grup, per tot el suport que m'heu donat per a fer aquest projecte de Tesi i per les estones passades al laboratori, que, amb companyia es passen molt millor! Gràcies per ser tan bones persones, cosa difícil de trobar! I gràcies per la paciència que heu tingut amb mi aquests últims mesos. **Jorge**, compartim uns inicis de tesi *durillos*, que ben segur ens han fet més forts. Gràcies per ser tan actiu, treballador, per esforçar-te tant i per estar disposat a ajudar-me fins i tot abans de que t'ho demani. **Àngel**, amb tu les plantes molen més! Gràcies per ensenyar-me tantes coses, pel teu suport, per la teva feina, pel teu esforç i per les teves ganes d'aprendre coses noves!

Un dels punts forts de l'IJC és l'estreta relació que té amb el Servei d'Hematologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol. En el nostre cas, especialment amb el Laboratori de Citometria. En primer lloc, gràcies, **Jordi Juncà**, pel teu interès, per donar-nos suport amb els teus coneixements, per tenir tantes ganes i empenta per investigar, per tots els projectes que hem desenvolupat plegats, i pels teus consells i ajuda en el meu projecte de Tesi. **Sara, Minerva**, infinitas gracias por vuestra ayuda. No puedo estar más agradecida por todo lo que hacéis por nuestro grupo. Trabajar con personas como vosotras no tiene precio. Gracias por el tiempo, paciencia, interés y por ser como sois. I al **Marc Sorigué**, benvingut al grup! Gràcies per voler fer recerca amb nosaltres i per tenir tantes ganes d'aprendre i de fer coses noves! Ben segur que sumarem!

Una altra de les raons de ser del nostre grup de recerca són les empreses biotecnològiques que ens donen suport, especialment, Sysmex i Thermo Fisher. Muchísimas gracias, **Pepe**, así como a tus compañeros/as de Sysmex, por creer en nosotros, por ayudarme y hacer posible que pueda estar aquí y que haya podido ir a congresos y gracias por tu humanidad y personalidad. Thanks to **Mike** and **Jolene** from

Thermo Fisher for your support, for giving us the opportunity to develop our research, for your comments, interest, and collaboration. It's a real pleasure to work altogether!

Encara que el nostre grup sigui petit, formem part del que és la gran família de l'IJC. En aquesta etapa he pogut conèixer a persones increïbles que m'han aportat moltíssimes coses i amb les que he viscut moments meravellosos. Gracias **Paula**, por ser como eres y por todos los momentos que hemos compartido, llegarás muy lejos, lo sé. **Nuri**, mi compi del Baix! Gracias por informarme de todos los "cotis", que, si no, no me enteraría de nada, y por ser la "organizer" por excelencia. **Mar**, gràcies per ser també una súper informadora, i per deixar-me aprendre tantes coses de tu. **Rocío**, gracias por tu ayuda y por ser mi primera compi de mesa. **Jesi**, fichaje! Gracias por tu energía y trabajo. **Jordi**, gràcies per la teva alegria contagiosa, i **Laura**, gràcies per ser l'ànima de la festa, ets una *crack*! He pogut aprendre també moltes coses de vosaltres, súper Doctors! **Pame**, por tus margaritas, **Francisco**, pels teus comentaris únics i els teus *aguacates*, **Natalia**, per les teves visites al lab amb la *side population*, **Josep**, per ser com ets, se't troba a faltar! Vosotros, los otros pre-docs, con los que compartimos nuestros dramas, y hacemos que estos momentos sean más llevaderos. Gracias. Y a las nuevas incorporaciones en el mundo pre-doc y en la secta de la 3a planta, **Celia** y **Miriam**. Gracias por aportar nueva energía al instituto y acompañarnos en comidas y dramas. Suerte y ánimo en esta etapa que estáis empezando. Y mención a nuevas incorporaciones, las **Anas**, y a los que han pasado por aquí, **Vera**, **Elena**, **Neus**, **Paula**, **Érica**, **Guillem**, **Laura**, **Alba**... de todos me llevo algo. Gracias.

I més IJC. Gràcies **Eulalia**, pels teus coneixements i pel teva ajuda cedint-nos mostres. **Joao**, gracias por tu interés, motivación y críticas, siempre constructivas, que me sirven para tanto. Gràcies **Emili** per donar alegria a cultius, així com per la teva vitalitat i manera de ser. Thanks to **Fumi** and **Marcus** for your challenging questions, for your interest in our work, and for your advices. Gràcies **Alba** i **Albert**, per estar per nosaltres i ajudar-nos tant. I a la resta de l'Institut i Campus, la vostra feina és increïble!

No em puc oblidar de la resta del Servei d'Hematologia de l'Hospital. Gràcies a aquesta gran relació he après moltíssimes coses de tots els professionals que en formen part, tant

Agradecimientos

en sessions clíniques, bibliogràfiques com en col·laboracions que han sorgit. Gràcies al Laboratori de Biologia Molecular, a la **Lourdes**, la **Sílvia**, la **Itziar**, el **Pepe**, la **Marta** i la **Diana**, per tots els coneixements que m'emporto de vosaltres i per ser tan bons professionals i persones. I gràcies al Laboratori de Citogenètica, a la **Isabel**, la **Marisol**, l'**Aleix**, el **Javier**, la **Neus**, l'**Adela**, pel mateix, i per la vostra ajuda amb els cariotips de les línies cel·lulars. Gràcies! També gràcies a la **Dra. Elisa Orna** i al **Dr. Tomás Navarro**, per tot el que m'heu ensenyat sobre la citomorfologia. I, evidentment, gràcies a tots els clínics que estan dia a dia tractant amb els pacients i que donen a l'hora suport a la recerca que fem, al **Dr. Josep Maria Ribera**, el **Dr. Albert Oriol**, la **Dra. Blanca Xicoy** i la **Dra. Inés Rodríguez**, i a la resta de metges, residents i professionals de l'equip d'hematologia. La vostra feina no té preu.

A mis amigos y amigas, por estar a mi lado, por ser mi vía de escape, de desconexión y por hacerme pasar momentos únicos. **Minerva**, gracias por ser mi animadora número 1, por ayudarme tanto, por todo. **Miky**, gracias por los pequeños momentos, que, aunque sean menos de los que quisiéramos, son únicos. **Ari**, aunque la distancia siempre nos ha separado, sé que estás y estarás ahí. **Janat**, **Ester**, **Alba** y **Laura**, gracias por sacarme de aquí y compartir viajes increíbles (¡y los que quedan!). Gracias a los y las “**Barretimonis**” (y ex), **Laura**, **Judith**, **Mireia**, **Cristian**, **Irina**, **Zara... y ¡todos/as!**, por tantos momentos vividos, por el apoyo, todo lo que me aportáis cada uno/a de vosotros/as, en especial mención a **Dani**, gracias por tu ayuda con la Figura 6! A las del cole, **Ana** y **Berta**, por nuestras quedadas mensuales; a las “**marujas de Cornellà**”, por seguir ahí; i als meus **compis biomedes** i **biotecs** per estar al començament d'aquesta bonica bogeria anomenada ciència. Es increíble estar rodeada de personas así. Gracias.

Y gracias a la **familia García** y a la **familia Rico**, a los que están y a los que ya no están, por vuestro interés, apoyo, y por los momentos compartidos. Y, sobre todo, gracias a mi padre, **Jesús**, y a mi madre, **Luisa**, y a mi hermano, **Albert**, por haber hecho de mí la persona que soy ahora. Gracias por haberme ofrecido la oportunidad de dejarme ser quien yo quisiera ser, por hacerme volar, por dejar que me equivoque, por hacerme independiente y libre, y por estar ahí en todo momento. Os quiero.

LISTADO DE ABREVIATURAS

7-AAD	<i>7-aminoactinomycin D - 7-aminoactinomicina</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP	<i>Alkaline phosphatase - Fosfatasa alcalina</i>
APLS	<i>Alkaline Phosphatase Live Stain</i>
ARN	Ácido ribonucleico
BCMA	<i>B cell maturation antigen - Antígeno de maduración de células B</i>
BP	<i>Bandpass - Paso de banda</i>
C	Citoplasmático
CAR	<i>Chimeric antigen receptor - Receptor de antígeno quimérico</i>
CD	Cúmulo de diferenciación
CDP	<i>Common dendritic progenitor - Progenitor común dendrítico</i>
CETLAM	Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias
CF	Concentración final
CFM	Citometría de flujo multiparamétrica
clg	<i>Cytoplasmic immunoglobulin - Inmunoglobulina citoplasmática</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor - Progenitor común linfoide</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitor - Progenitor común mieloide</i>
CP	Célula plasmática
CRAB	<i>Hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, and bone lesions - Hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas</i>

Listado de abreviaturas

CSC	<i>Cancer stem cell</i> - Célula madre tumoral
DAPI	<i>Diamidino-2-phenylindole</i> - Diamidino-2- fenilindol
DCV	<i>DyeCycle™ Violet</i>
DfN	<i>Different-from-normal</i> - Diferente de lo normal
DLP	<i>Dichroic longpass</i> - Dicroico de paso largo
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> - Dimetilsulfóxido
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EFS	<i>Event-free survival</i> - Supervivencia libre de eventos
ELN	<i>European Leukemia Net</i> - Red europea de leucemia
ELP	<i>Early lymphoid progenitor</i> - Progenitor linfoide temprano
ERM	Enfermedad residual medible
FAB	Franco-americano-británico
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> - Suero fetal bovino
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> - Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FSC	<i>Forward scatter</i> - Dispersión frontal
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> - Factor estimulador de colonias de granulocitos
GMP	<i>Granulocyte-macrophage progenitor</i> - Progenitor de granulocitos y macrófagos
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto

HBA	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> con albúmina y azida sódica
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> - Antígeno leucocitario humano
HR	<i>Hazard ratio</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i> - Célula madre hematopoyética
IC	Intervalo de confianza
Ig	Inmunoglobulina
IGH	<i>Immunoglobulin heavy chain</i> - Cadena pesada de inmunoglobulina
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i> - Grupo de Trabajo Internacional del Mieloma
ISAC	<i>International Society for Advancement of Cytometry</i> - Sociedad Internacional para el Avance en Citometría
ISS	<i>International staging system</i> - Sistema internacional de estadificación
IT-HSC	<i>Intermediate term hematopoietic stem cell</i> - Célula madre hematopoyética de plazo intermedio
LAIP	<i>Leukemia-associated immunophenotype</i> - Inmunofenotipo asociado a la leucemia
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de precursores B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda de precursores T

Listado de abreviaturas

LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLB	Linfoma linfoblástico de precursores B
LLT	Linfoma linfoblástico de precursores T
LMPP	<i>Lymphoid-primed multipotent progenitor</i> - Progenitor multipotente de pre-instrucción linfoide
LP	<i>Longpass</i> - Paso largo
LSC	<i>Leukemic stem cell</i> - Célula madre leucémica
LT-HSC	<i>Long term hematopoietic stem cell</i> - Célula madre hematopoyética de largo plazo
MDP	<i>Monocyte-dendritic cell progenitor</i> - Progenitor de monocitos y células dendríticas
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i> - Célula supresora de origen mieloide
MEP	<i>Megakaryocyte-erythrocyte progenitor</i> - Progenitor de megacariocitos y eritrocitos
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i> - Mediana de la intensidad de la fluorescencia
MM	Mieloma múltiple
MO	Médula ósea
MPO	Mieloperoxidasa

MPP	<i>Multipotent progenitor</i> - Progenitor multipotente
NGS	<i>Next generation sequencing</i> - Secuenciación masiva de nueva generación
NK	<i>Natural Killer</i>
NLNW	<i>No lyse no wash</i>
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i> - Nucleofosmina 1
OMIP	<i>Optimized multicolor immunofluorescence panel</i> - panel de inmunofluorescencia multicolor optimizado
OMS	Organización Mundial de la Salud
OS	<i>Overall survival</i> - Supervivencia global
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PETHEMA	Programa Español de Tratamientos en Hematología
PI	<i>Propidium iodide</i> - Yoduro de propidio
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> - Forbol 12-miristato-13-acetato
PMT	<i>Photomultiplier tube</i> - Tubo fotomultiplicador
Proteína M	Proteína monoclonal
RC	Remisión o respuesta completa
R-ISS	<i>Revised international staging system</i> - Sistema internacional de estadificación revisado

ROC	<i>Receiver operating characteristic</i> - Característica operativa del receptor
RT-qPCR	<i>Real time quantitative polimerase chain reaction</i> - Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
S	Sangre
slg	<i>Surface immunoglobulin</i> - Inmunoglobulina de superficie
SSC	<i>Side scatter</i> - Dispersión lateral
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleótido único
SP	<i>Shortpass</i> - Paso corto
SPop	<i>Side population</i>
ST-HSC	<i>Short term hematopoietic stem cell</i> - Célula madre hematopoyética de corto plazo
TCR	<i>T cell receptor</i> - Receptor de células T
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> - Desoxinucleotidil transferasa terminal
TKI	<i>Tyrosin-kinase inhibitor</i> - Inhibidor de la tirosina cinasa
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	9
LISTADO DE ABREVIATURAS	15
ÍNDICE.....	23
INTRODUCCIÓN.....	31
1. LA HEMATOPOYESIS	33
2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	36
2.1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud.....	37
2.1.1. Neoplasias mieloides.....	37
2.1.2. Neoplasias linfoides.....	38
2.2. Neoplasias hematológicas estudiadas en esta Tesis Doctoral	38
2.2.1. Leucemia mieloide aguda.....	38
2.2.1.1. Definición	38
2.2.1.2. Etiología.....	39
2.2.1.3. Características clínicas, citomorfológicas y genéticas	41
2.2.1.4. Clasificación	42
2.2.1.5. Inmunofenotipo.....	46
2.2.2. Leucemia linfoblástica aguda de precursores B.....	50
2.2.2.1. Definición.....	50
2.2.2.2. Etiología.....	50
2.2.2.3. Características clínicas, citomorfológicas y genéticas	52
2.2.2.4. Clasificación	54
2.2.2.5. Inmunofenotipo.....	56
2.2.3. Mieloma múltiple.....	57

2.2.3.1. Definición	57
2.2.3.2. Etiología.....	58
2.2.3.3. Características clínicas, citomorfológicas y genéticas.....	59
2.2.3.4. Clasificación.....	60
2.2.3.5. Inmunofenotipo	62
2.3. Herramientas de diagnóstico integrado	63
2.3.1. Citomorfolología	66
2.3.2. Inmunofenotipado	68
2.3.2.1. Inmunofenotipado de la leucemia aguda	73
2.3.2.2. Inmunofenotipado del mieloma múltiple	75
2.3.3. Citogenética y genética molecular	76
2.4. Seguimiento de las neoplasias hematológicas.....	80
2.4.1. Tecnologías basadas en citometría de flujo multiparamétrica.....	82
2.4.2. Tecnologías moleculares basadas en la PCR.....	84
2.4.3. Tecnologías de <i>Next Generation Sequencing</i>	86
2.5. Pronóstico y clasificación según el riesgo	87
2.6. Tratamiento.....	94
2.6.1. Principales esquemas de tratamiento.....	94
2.6.1.1. Tratamiento general de la leucemia mieloide aguda	94
2.6.1.2. Tratamiento general de la leucemia linfoblástica aguda de precursores B	96
2.6.1.3. Tratamiento general del mieloma múltiple	98
2.6.2. El trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	99
2.6.3. Terapias emergentes.....	102
2.6.3.1. Terapias moleculares y epigenéticas	103

2.6.3.2. Inmunoterapias.....	103
3. MECANISMOS DE REFRACTARIEDAD DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	105
3.1. Heterogeneidad intratumoral.....	106
3.2. Supresión inmunitaria.....	108
4. LA CITÓMICA FUNCIONAL PARA EL ESTUDIO DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	111
HIPÓTESIS.....	119
OBJETIVOS.....	123
MATERIALES Y MÉTODOS.....	127
1. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	129
1.1. Pacientes.....	129
1.2. Líneas celulares.....	131
2. REACTIVOS.....	131
2.1. Citómetro de flujo.....	131
2.2. Anticuerpos monoclonales.....	131
2.3. Marcadores de ácidos nucleicos.....	132
2.4. Sustratos fluorogénicos, fármacos, estimuladores e inhibidores.....	132
2.5. Medios de cultivo, soluciones y <i>buffers</i>	133
3. INSTRUMENTACIÓN.....	135
3.1. Citometría de flujo.....	135
3.1.1. Puesta a punto y mantenimiento.....	135

3.1.2.	Configuración de los filtros	136
3.1.2.1.	Citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™	137
3.1.2.2.	Citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT	138
3.1.3.	Adquisición de la muestra.....	140
3.1.4.	Compensación electrónica de los espectros de emisión.....	140
3.2.	Otra instrumentación	141
4.	PROCOLOS GENERALES.....	141
4.1.	Determinación de la actividad fosfatasa alcalina.....	141
4.2.	Ensayos de extrusión del sustrato APLS.....	142
4.3.	Análisis de la actividad fosfatasa alcalina en la <i>side population</i>	143
4.4.	Análisis del ciclo celular.....	143
4.5.	Determinación de PD-L1 de superficie en MDSCs.....	144
4.6.	Determinación de PD-L1 y CD11b citoplasmáticos.....	145
4.7.	Ensayo de competición de anticuerpo monoclonal y fármaco para PD-L1	145
5.	ANÁLISIS DE DATOS	146
	RESULTADOS.....	149
	Trabajo I: Identificación de progenitores leucémicos con elevada actividad fosfatasa alcalina y relación con la recaída y enfermedad refractaria en leucemia aguda	151
1.	INTRODUCCIÓN.....	153
2.	RESULTADOS.....	155

2.1. Desarrollo de una metodología para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina en combinación con el inmunofenotipado mediante citometría de flujo	155
2.1.1. APLS no resulta tóxico a nivel celular y su fluorescencia se mantiene estable en el tiempo	155
2.1.2. APLS no es extruido por el transportador multidroga ABCG2	157
2.1.3. Las células de la <i>side population</i> presentan de forma diferencial actividad ALP según las concentraciones de oxígeno ambientales	158
2.1.4. La línea celular KG-1a como control positivo de actividad fosfatasa alcalina .	159
2.1.5. Las soluciones de lisis de eritrocitos alteran la determinación de la actividad fosfatasa alcalina.....	160
2.2. Determinación de la actividad ALP en leucemias agudas refractarias..	161
2.2.1. Caso 1: Células CD34 ⁺ con elevada actividad ALP detectadas en diferentes seguimientos de una leucemia linfoblástica aguda de precursores B refractaria.....	161
2.2.2. Caso 2: Células CD34 ⁺ con elevada actividad ALP detectadas en el diagnóstico y la recaída de una leucemia linfoblástica aguda de precursores B refractaria	167
2.2.3. Casos 3-5: La actividad ALP no está restringida a células CD34 ⁺	168
2.3. Importancia de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina en el diagnóstico de la leucemia mieloide aguda	169
2.3.1. Características de los pacientes y pronóstico	169
2.3.2. Diferencias de la actividad fosfatasa alcalina en pacientes con leucemia mieloide aguda: Identificación de dos grupos	176
2.3.3. Diferencias en la respuesta al tratamiento entre ambos grupos	178
2.3.4. Diferencias en la supervivencia entre ambos grupos.....	180
2.3.5. Análisis multivariado.....	181

Trabajo II: Diseño y evaluación de un ensayo de <i>screening</i> directo para la detección de PD-L1 en MDSCs y su potencial uso en la predicción del éxito de la inmunoterapia	183
1. INTRODUCCIÓN.....	185
2. RESULTADOS	186
2.1. Diseño de un panel <i>screening</i> multicolor para la detección de PD-L1	186
2.2. PD-L1 presenta un patrón diferencial de expresión ante la estimulación en presencia de ésteres de forbol.....	188
2.3. PD-L1 no se detecta a nivel citoplasmático.....	190
2.4. PD-L1 se detecta de forma diferencial según el tiempo de estimulación	191
2.5. El anticuerpo monoclonal conjugado y durvalumab compiten para un sitio de unión de PD-L1 espacialmente cercano	193
DISCUSIÓN	195
CONCLUSIONES	223
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	227
ANEXO	253
1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ASOCIADOS A LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL.....	255
2. OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EN LA ETAPA DE LA TESIS DOCTORAL.....	255
3. COMUNICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES DE LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL.....	256

INTRODUCCIÓN

1. LA HEMATOPOYESIS

La **hematopoyesis** es un proceso fisiológico esencial para el organismo que consiste en el mantenimiento y en la formación continua de poblaciones celulares sanguíneas. Estas poblaciones se originan a partir de las células madre hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells*, HSCs).

Este proceso fisiológico transcurre durante el desarrollo embrionario y durante la etapa adulta con la finalidad de mantener los sistemas sanguíneo y linfático. En individuos adultos, la hematopoyesis se lleva a cabo principalmente en la **médula ósea** (MO). La MO es un tejido esponjoso que se alberga en las cavidades centrales de los huesos axiales y largos. Proporciona un soporte físico y un nicho celular para el desarrollo de las poblaciones sanguíneas, así como el microambiente necesario para producir todas las señales reguladoras durante la hematopoyesis, mediadas por citocinas, hormonas y mecanismos de cooperación celular (1,2).

Las HSCs existentes en la MO son capaces de reconstituir íntegramente el sistema hematopoyético, ya que pueden dar lugar a todas las células de los distintos linajes que lo conforman (3) y de otros linajes celulares (4), y es por esa razón que se las considera células madre pluripotentes. Las HSCs tienen la capacidad de autorenovarse, para poder mantenerse indiferenciadas a largo plazo, y de diferenciarse, dando lugar a todos los tipos celulares de cada linaje. No obstante, la mayoría de las HSCs se mantiene en fase quiescente y solo una fracción de estas avanza en el ciclo celular para poder diferenciarse o autorenovarse (5).

Existen diversos modelos y propuestas sobre el desarrollo de la hematopoyesis, así como de la clasificación de los distintos tipos de HSCs y de sus características específicas. Comprender la hematopoyesis es fundamental para poder

posteriormente estudiar las enfermedades ocasionadas por alteraciones durante la diferenciación hematopoyética (1). Uno de los modelos existentes (6) postula la existencia de dos tipos de HSCs: Las HSCs de largo plazo (*long term HSCs*, LT-HSCs) y las HSCs de corto plazo (*short term HSCs*, ST-HSCs), y más recientemente las de plazo intermedio (*intermediate term HSCs*, IT-HSCs) (7). Estas se diferencian por su capacidad de autorenovación, siendo las LT-HSCs aquellas que la conservan más incrementada, mientras que las ST-HSCs, las que menos; y por su capacidad de diferenciación, siendo las ST-HSCs las más comprometidas para diferenciarse en el resto de progenitores (**Figura 1**).

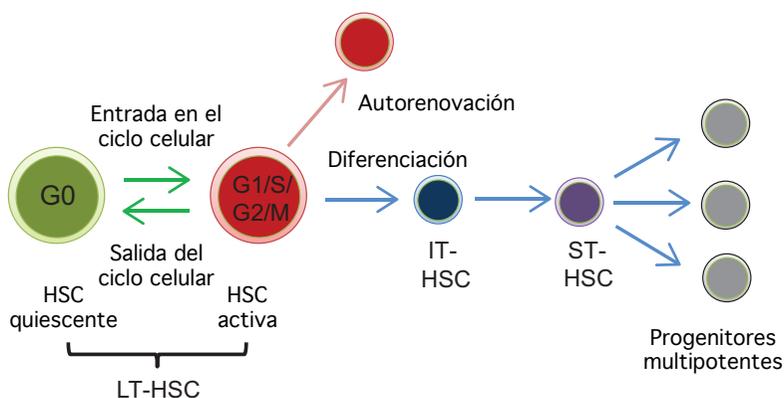


Figura 1. Estadios de la diferenciación de las HSCs. Adaptada de Nakamura-Ishizu *et al.*, 2014 (8).

A partir de las ST-HSCs, se originan los progenitores multipotentes (*multipotent progenitors*, MPPs) para dar lugar a las células de los linajes mieloide y linfoide. Se distinguen entonces los progenitores comunes mieloides (*common myeloid progenitors*, CMPs) (9) y los progenitores comunes linfoides (*common lymphoid progenitors*, CLPs) (10). De los CMPs derivan las células de linaje mieloide: monocitos, granulocitos, eritrocitos y megacariocitos; y de los CLPs derivan las células de linaje linfoide: linfocitos T, linfocitos B y células *Natural Killer* (NK). No obstante, y como se puede observar en la **Figura 2**, la diferenciación

hematopoyética es mucho más compleja, ya que las células linaje-comprometidas pueden originarse a través de diferentes progenitores y vías de diferenciación.

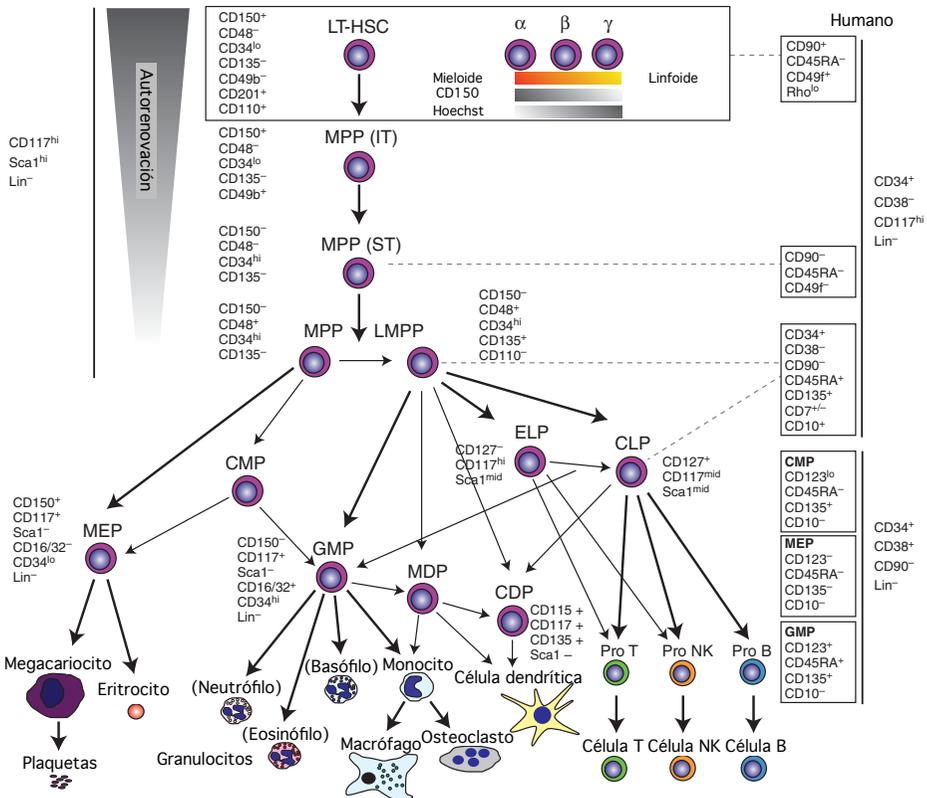


Figura 2. Jerarquía de la diferenciación hematopoyética en adultos. CD, cúmulo de diferenciación; LMPP, *Lymphoid-primed* MPP - MPP de pre-instrucción linfoide; ELP, *early lymphoid progenitor* - progenitor linfoide temprano; GMP, *granulocyte-macrophage progenitor* - progenitor de granulocitos y macrófagos; MEP, *megakaryocyte-erythrocyte progenitor* - progenitor de megacariocitos y eritrocitos; CDP, *common dendritic progenitor* - progenitor común dendrítico; MDP, *monocyte-dendritic cell progenitor* - progenitor de monocitos y células dendríticas. Adaptada de Rieger y Schroeder, 2012 (11).

Las células que constituyen el sistema hematopoyético se pueden identificar y distinguir por la expresión de antígenos y/o cúmulos de diferenciación (CD) que se encuentran en la membrana celular, citoplasma o núcleo. Estos CD se emplean como marcadores celulares con el objetivo de clasificar poblaciones leucocitarias

en asociación con su grado de madurez o inmadurez y el linaje (12). Los progenitores más primitivos, desde las LT-HSCs hasta los MPPs, se caracterizan por ser CD34⁺/CD38⁻/CD117^{high}. CD90 se encuentra expresado en las LT-HSCs, y esta expresión se pierde cuando estas se diferencian hacia ST-HSCs. Los CMPs y CLPs continúan expresando CD34 y CD117 y otros marcadores tales como CD123 y CD38, en el caso de los progenitores mieloides, y CD135 en el caso de los linfoides. Las células linaje-comprometidas dejan de expresar estos marcadores más característicos de células inmaduras para expresar los marcadores característicos del propio linaje (13).

La perturbación de los complejos procesos fisiológicos que regulan la hematopoyesis puede desencadenar alteraciones hematológicas que ocasionalmente conlleven el desarrollo de una **neoplasia hematológica**.

2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Las **neoplasias hematológicas** constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema hematopoyético caracterizadas por perturbaciones en la regulación de la hematopoyesis que alteran la producción de uno o varios tipos celulares y producen la infiltración de las células afectadas en diversos tejidos impidiendo la producción normal del resto de células (14). Los tejidos afectados por este grupo de enfermedades incluyen la médula ósea, la sangre periférica y los tejidos linfáticos, aunque también pueden verse afectados otros tejidos y órganos. Las alteraciones de la hematopoyesis pueden ser debidas a mutaciones genéticas o a aberraciones cromosómicas, así como a modificaciones epigenéticas producidas en alguno de los estadios celulares del proceso. El origen de estas afecciones es diverso, ya que pueden verse alterados distintos tipos celulares y vías de señalización y regulación.

Según el linaje celular afectado, las neoplasias hematológicas se clasifican en dos grandes grupos: Las **neoplasias mieloides**, cuando las células neoplásicas pertenecen al linaje mieloides, y las **neoplasias linfoides**, cuando las células afectadas pertenecen al linaje linfoides.

2.1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud

Las neoplasias hematológicas se clasifican según los criterios de la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** recogidos en *Clasificación de Tumores de Tejidos Hematopoyéticos y Linfoides*. La cuarta edición revisada en el año 2017 es la que se ha consultado en la elaboración de esta Tesis Doctoral (15). A continuación, se mencionan las categorías principales de neoplasias mieloides y linfoides según la OMS y desde el punto 2.2 al punto 2.5 se desarrollarán más extensamente las neoplasias hematológicas estudiadas en esta Tesis Doctoral: la leucemia mieloides aguda, la leucemia linfoblástica aguda de precursores B y el mieloma múltiple.

2.1.1. Neoplasias mieloides

Las neoplasias mieloides se originan debido a alteraciones en la **mielopoyesis**, es decir, el proceso de la hematopoyesis de formación de las células de linaje mieloides a partir de los progenitores comunes mieloides.

Según la OMS 2017, las neoplasias mieloides se clasifican en nueve categorías principales:

- i. Neoplasias mieloproliferativas
- ii. Mastocitosis
- iii. Neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia y reordenamientos genéticos
- iv. Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas

- v. Síndromes mielodisplásicos
- vi. Neoplasias mieloides con predisposición familiar
- vii. Leucemia mieloide aguda y neoplasias de precursores relacionados
- viii. Neoplasia de células dendríticas plasmacitoides
- ix. Leucemias agudas de linaje ambiguo

2.1.2. Neoplasias linfoides

Las neoplasias linfoides se originan debido a alteraciones en la **linfopoyesis**, es decir, el proceso de la hematopoyesis de formación de las células de linaje linfoides a partir de los progenitores comunes linfoides.

Según la OMS 2017, las neoplasias linfoides se clasifican en seis categorías principales:

- i. Neoplasias de precursores linfoides
- ii. Neoplasias de células B maduras
- iii. Neoplasias de células T y NK maduras
- iv. Linfomas Hodgkin
- v. Alteraciones linfoproliferativas asociadas a inmunodeficiencias
- vi. Neoplasias histiocíticas y de células dendríticas

2.2. Neoplasias hematológicas estudiadas en esta Tesis Doctoral

2.2.1. Leucemia mieloide aguda

2.2.1.1. Definición

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un tipo de neoplasia mieloide caracterizada por la expansión clonal de alguno o varios progenitores mieloides y la acumulación de estos en la médula ósea y finalmente en la sangre periférica, y en ocasiones

en otros tejidos, interfiriendo en las proporciones habituales del resto de células y provocando, en consecuencia, neutropenia, anemia y/o trombocitopenia. Las células leucémicas se denominan **blastos** o también **mieloblastos**, debido a sus propias características de inmadurez celular (15).

La incidencia global de esta enfermedad es de 1 - 4,3 casos por 100.000 habitantes anualmente, con mayor incidencia en Europa Occidental, Estados Unidos y Australia. La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico es de 65 años con un ligero predominio entre los hombres (15–17).

2.2.1.2. Etiología

El origen de esta enfermedad es multifactorial. Se habla de leucemia mieloide aguda secundaria cuando se origina a partir de otra neoplasia hematológica mieloide, ya sea un síndrome mielodisplásico o un síndrome mieloproliferativo. También se ha observado que ciertos tratamientos aplicados debido a una manifestación de una neoplasia previa están relacionados con el desarrollo posterior de una LMA relacionada con el tratamiento. Estos incluyen la exposición a agentes ionizantes, a inhibidores de las topoisomerasas o a otros agentes quimioterapéuticos (18).

Sin embargo, la LMA se manifiesta en la mayoría de las ocasiones como una nueva enfermedad en individuos previamente sanos. En este caso, se habla de leucemia mieloide aguda *de novo*. Las causas por las cuales se desarrolla la LMA *de novo* son diversas y múltiples factores de riesgo pueden provocar alteraciones que lleven a un proceso de leucemogénesis, con el consecuente desarrollo de la enfermedad.

Uno de los modelos de ontogenia de la LMA es el sugerido por Gilliland y Griffin en el año 2002 (19), el **modelo two-hit de leucemogénesis**. Este modelo postula que los mieloblastos leucémicos se originan tras la aparición de dos lesiones

genéticas de diferente clase que de manera cooperativa inician la leucemia, aunque ninguna de estas alteraciones la desarrollaría por sí misma. Las mutaciones de clase I resultan en una activación constitutiva de receptores de superficie celular del tipo tirosina cinasa. Esta activación confiere una ventaja proliferativa que deriva en una expansión clonal de los progenitores hematopoyéticos afectados, sin efecto en su diferenciación. Las mutaciones de clase II, caracterizadas por la formación de genes de fusión, suponen un detrimento en la diferenciación hematopoyética y en la posterior activación del programa de muerte celular o apoptosis. Actualmente, se considera que las alteraciones genéticas que ocurren en primera instancia son las mutaciones de clase II, mientras que las de clase I ocurren en una fase más tardía. En la **Figura 3** se ilustra el esquema del modelo propuesto por Gilliland y Griffin.

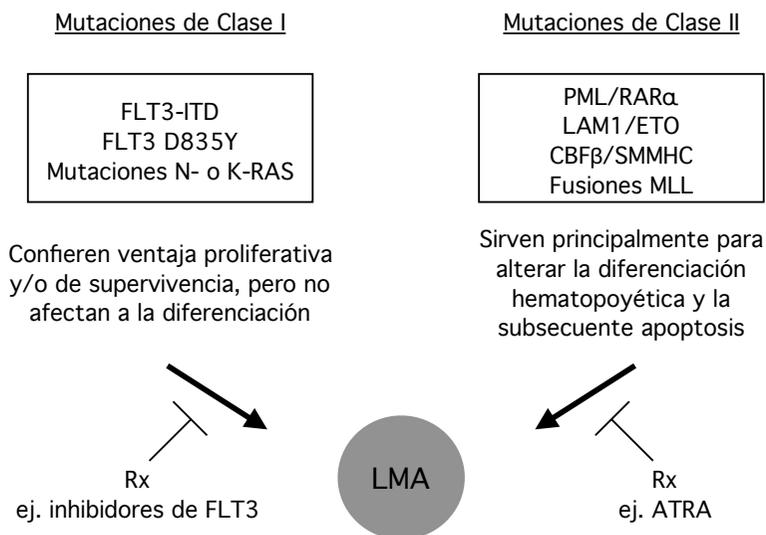


Figura 3. Modelo de cooperación entre mutaciones de clase I y de clase II para desarrollar leucemia mieloide aguda. Adaptada de Gilliland y Griffin, 2002 (19).

2.2.1.3. Características clínicas, citomorfológicas y genéticas

La LMA es una neoplasia mieloide muy heterogénea a nivel citomorfológico, ya que se pueden encontrar alteradas diversas poblaciones celulares de linaje mieloide; a nivel clínico, ya que el curso de la enfermedad y las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes son diversos y variados; y a nivel genético, ya que han sido exploradas y descritas múltiples alteraciones recurrentes en esta entidad, siendo muy diversas entre pacientes (20).

Las **manifestaciones clínicas** derivan principalmente de la infiltración de los mieloblastos leucémicos en la MO y en otras localizaciones extramedulares. El reemplazo del resto de células hematopoyéticas resulta en alteraciones hematológicas que conllevan neutropenia, anemia o trombocitopenia. Estas alteraciones pueden provocar fiebre, fatiga, sangrado, palidez, dolor óseo, infecciones, entre otros síntomas. Los síntomas pueden ser muy variables entre pacientes, por lo que es difícil definir unos criterios clínicos característicos (21).

A nivel **citomorfológico**, el diagnóstico de la LMA se determina cuando el porcentaje de blastos leucémicos presente en la MO, ya sea de mieloblastos, monoblastos/promonocitos y/o megacarioblastos, sea igual o superior al 20% (22). No obstante, se puede diagnosticar con porcentajes de blastos inferiores al 20% si hay asociada una translocación de los cromosomas 8 y 21, $t(8;21)(q22;q22.1)$; una inversión del cromosoma 16, $inv(16)(p13.1;q22)$; una alteración del cromosoma 16, $t(16;16)(p13.1;q22)$ o el gen de fusión *PML-RARA* (15).

Las **alteraciones genéticas** de la LMA son muy diversas, heterogéneas y complejas (20). Los criterios de la OMS 2017 enumeran las más comunes, basándose en los estudios de *The Cancer Genome Atlas Research Network* del año 2013 (23), donde se analizaron los genomas de 200 pacientes con LMA *de novo* utilizando secuenciación completa del genoma (*whole genome sequencing*)

en 50 casos y secuenciación completa del exoma (*whole exome sequencing*) en 150 casos. Un promedio de 13 genes se encontraron alterados, de los cuales 5 resultaron recurrentes. Un total de 23 genes estaban significativamente mutados en la LMA (**Figura 4**). De los 200 pacientes, 199 revelaron una mutación no sinónima de una de las nueve categorías de genes relevantes para la patogénesis de la LMA (**Tabla 1**), contribuyendo a ampliar las dos clases de genes del modelo *two-hit* de leucemogénesis (19).

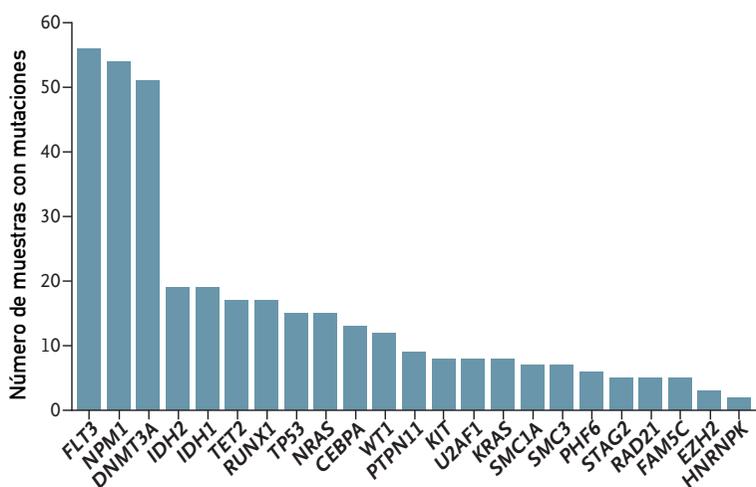


Figura 4. Genes significativamente mutados en 200 pacientes con LMA.
Adaptada de *The Cancer Genome Atlas Research Network et al.*, 2013 (23).

2.2.1.4. Clasificación

En 1970, un grupo cooperativo de expertos franco-americano-británicos (FAB) dividió la LMA entidad en varios subtipos. Esta clasificación se basó en la citomorfología, incluyendo el estado madurativo de los tipos celulares dominantes de cada subgrupo (**Tabla 2**). La clasificación FAB fue publicada en 1976 (24) y modificada en 1985 (25,26) y en 1991 (27), cuando se incluyó el subgrupo M0. Los subgrupos M0 a M5 corresponden a precursores leucocitarios. Los grupos M6

y M7 de la clasificación FAB están identificados con precursores de eritrocitos y megacariocitos/plaquetas, respectivamente.

Tabla 1. Grupos funcionales de las alteraciones genéticas de la leucemia mieloide aguda. Adaptada de *The Cancer Genome Atlas Research Network et al.*, 2013 (23) y de *Swerdlow et al.*, 2017 (15).

Clase	Tipo	Ejemplos de alteraciones
Clase 1	Fusiones de factores de transcripción	t(8;21), inv(16), t(15;17)
Clase 2	Nucleofosmina 1 (<i>Nucleophosmin 1, NPM1</i>)	Mutaciones en <i>NPM1</i>
Clase 3	Genes supresores de tumores	Mutaciones de <i>TP53</i> y <i>PHF6</i>
Clase 4	Genes relacionados con la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN)	<i>TET2, IDH1, IDH2</i> (hidroximetilación del ADN); <i>DNMT3A</i> (ADN metiltransferasa)
Clase 5	Genes de activación de la señal	Mutaciones de <i>KIT</i> y <i>RAS</i>
Clase 6	Genes modificadores de cromatina	Mutaciones de <i>ASXL1</i> y <i>EZH2</i> ; fusiones de <i>KMT2A</i> y <i>KMT2A-PTD</i>
Clase 7	Genes de factores de transcripción mieloide	Mutaciones de <i>CEPBA, RUNX1</i>
Clase 8	Genes del complejo de la cohesina	Mutaciones de <i>STAG2, RAD21, SMC1</i> y <i>SMC2</i>
Clase 9	Genes del complejo del espliceosoma	Mutaciones de <i>SRSF2, U2AF1</i> y <i>ZRSR2</i>

Tabla 2. Clasificación franco-americano-británica (FAB) de la leucemia mieloide aguda (25–27).

Subtipo FAB	Nombre
M0	Leucemia mieloblástica aguda con diferenciación mínima
M1	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración
M3	Leucemia promielocítica aguda (LPA)
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M4 eos	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritroide aguda
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

La clasificación FAB sigue siendo útil hoy en día y se sigue aplicando para agrupar la LMA en subtipos morfológicos. Sin embargo, debido al incremento del conocimiento sobre esta enfermedad y por únicamente tener en cuenta la citomorfología, esta clasificación ha sido reemplazada por la clasificación de la OMS, que además de la citomorfología, tiene en cuenta las características citogenéticas, e información sobre la genética molecular y el inmunofenotipo. Su versión más reciente (15) es la que se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de la leucemia mieloide aguda (15).

Tipo	Subtipos
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	LPA con <i>PML-RARA</i>
	LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>KMT2A-MLLT3</i>
	LMA con t(6;9)(p22;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
	LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
	LMA con <i>BCR-ABL1</i> (entidad provisional)
	LMA con <i>NPM1</i> mutada
	LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEBPA</i>
LMA con <i>RUNX1</i> mutado (entidad provisional)	
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	
Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia	
LMA no especificada de otro modo	Leucemia mieloblástica aguda con diferenciación mínima
	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración
	Leucemia mieloblástica aguda con maduración
	Leucemia mielomonocítica aguda
	Leucemia monoblástica/monocítica aguda
	Leucemia pura eritroide
	Leucemia megacarioblástica aguda
	Leucemia basofílica aguda
	Panmielosis con mielofibrosis aguda

2.2.1.5. Inmunofenotipo

La clasificación de la OMS de la leucemia mieloide aguda (15), especifica el inmunofenotipo que presenta cada entidad.

Los inmunofenotipos más característicos de los diferentes tipos de leucemia mieloide aguda son los siguientes:

LMA con anomalías genéticas recurrentes

- **LMA con t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*:** subpoblación de blastos CD34^{high}, HLA-DR^{high}, CD13^{high}, CD33^{dim} y con mieloperoxidasa (MPO) elevada; subpoblación con maduración neutrofilica CD15⁺/CD65^{+/-}; escasos blastos con asincronía en la maduración CD34⁺/CD15⁺; marcadores linfoides CD19, PAX5, CD79a citoplasmático (cCD79a) y expresión de desoxinucleotidil transferasa terminal (*terminal deoxynucleotidyl transferase*, TdT) ocasionalmente; CD56 puede encontrarse expresado.
- **LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*:** blastos inmaduros CD34^{high}/CD117^{high}; poblaciones diferenciadas hacia linaje granulocítico CD13⁺/CD33⁺/CD15⁺/CD65⁺/MPO⁺ y hacia monocítico CD14⁺/CD4⁺/CD11b⁺/CD11c⁺/CD64⁺/CD36⁺/lisozima⁺.
- **LPA con *PML-RARA*:** MPO⁺/HLA-DR^{low/-}/CD34^{low/-}/CD11a⁺/CD11b⁺/CD18⁺/CD13^{+/-}/CD117^{dim}/CD64⁺.
- **LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLLT3*:** en edad pediátrica se han descrito casos CD33^{high}/CD65^{high}/CD4^{high}/HLA-DR^{high}/CD13^{low}/CD34^{low}/CD14^{low}; en adultos se encuentran preferiblemente expresados marcadores de diferenciación monocítica CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36 y lisozima, con expresión variable de marcadores de inmadurez CD34 y CD117, y en algunos casos con expresión de CD56.

- **LMA con t(6;9)(p22;q34.1); *DEK-NUP214*:** blastos sin un fenotipo mielóide que pueden expresar MPO, CD9, CD13, CD33, CD38, CD123 y HLA-DR y en la mayoría de casos expresan CD117, CD34, CD15, CD64 y TdT.
- **LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*:** blastos CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺/CD117⁺HLA-DR⁺; expresión aberrante de CD7; algunos casos expresan marcadores megacariocíticos CD41 y CD61.
- **LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*:** los megacarioblastos expresan CD41, CD42b y/o CD61; pueden ser CD13⁺/CD33⁺ y normalmente son negativos para CD34, CD45 y HLA-DR.
- **LMA con *BCR-ABL1* (entidad provisional):** expresión de CD13, CD33 y CD34. Expresión aberrante de CD7, CD19 y TdT.
- **LMA con *NPM1* mutada:** expresión de marcadores mieloides CD33⁺/CD13^{+/-}; los marcadores de inmadurez suelen ser CD117⁺/CD123⁺/CD110⁺/HLA-DR⁻/CD34⁻; subgrupo con perfil monocítico CD36⁺/CD64⁺/CD14⁺.
- **LMA con mutaciones bialélicas en *CEBPA*:** HLA-DR⁺/CD15⁺; marcadores aberrantes CD7⁺ y CD56⁻.
- **LMA con *RUNX1* mutado (entidad provisional):** blastos CD13⁺/CD34⁺/HLA-DR⁺ con expresión variable de CD33, marcadores monocíticos y MPO.

LMA con cambios relacionados con mielodisplasia

Debido a la gran heterogeneidad de esta entidad, los inmunofenotipos pueden ser también de gran complejidad. Los blastos expresan los marcadores CD13 y CD33 de manera aberrante o débil; los casos de displasia multilinea presentan blastos HLA-DR^{low}/CD117^{low}/CD135^{low}/CD38^{low}; los blastos CD34⁺/TdT⁺/CD7⁺ están asociados a aberraciones de los cromosomas 5 y 7; en los casos de LMA secundaria a síndrome mielodisplásico, se detecta una subpoblación de blastos CD34⁺/CD38^{low}/HLA-DR^{low}; los marcadores CD7 y CD56 se encuentran expresados aberrantemente de manera habitual.

Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia

No existe un inmunofenotipo específico para la LMA relacionada con la terapia por tratarse de un grupo muy heterogéneo. Los blastos suelen expresar los marcadores CD34, CD13, CD33 y MPO.

LMA no especificada de otro modo

- **Leucemia mieloblástica aguda con diferenciación mínima:** caracterizada por la presencia de antígenos de hematopoyesis temprana (CD34, CD38 y HLA-DR) así como por la falta de antígenos de maduración mieloide y monocítica; blastos CD13⁺/CD117⁺/CD33^{+/-}/CD38^{low}/HLA-DR^{low}; sin expresión de marcadores citoplasmáticos B o T CD3, CD79a o CD22 citoplasmáticos; positividad en algunos casos para TdT y CD7.
- **Leucemia mieloblástica aguda sin maduración:** caracterizada por una subpoblación de blastos MPO⁺/CD13⁺/CD33⁺/CD117⁺; la mayoría de casos presentan fenotipo CD34⁺/HLA-DR⁺; sin marcadores de maduración granulocítica o monocítica; sin presencia de marcadores

citoplasmáticos B o T CD3, CD79a o CD22; expresión aberrante ocasional de CD7 junto con CD2, CD4, CD19 o CD56.

- **Leucemia mieloblástica aguda con maduración:** con presencia de la combinación de marcadores mieloides CD13, CD33, CD65, CD11b y CD15; expresión de CD34, CD117 y HLA-DR en subpoblaciones de blastos; expresión aberrante de CD7 ocasionalmente.
- **Leucemia mielomonocítica aguda:** subpoblaciones de blastos con antígenos mieloides CD13⁺/CD33⁺/CD65⁺/CD15⁺; subpoblaciones con marcadores de diferenciación monocítica; subpoblaciones de blastos inmaduros CD34⁺/CD117⁺; ocasionalmente CD7⁺ y expresión aberrante de otros marcadores de manera infrecuente.
- **Leucemia monoblástica/monocítica aguda:** expresión de CD13, CD33, CD15 y CD65; expresión de marcadores de diferenciación monocítica CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD68 y CD36; expresión ocasional de CD34 y frecuente de CD117 y HLA-DR; CD7 y CD56 se expresan aberrantemente de manera ocasional.
- **Leucemia eritroide pura:** eritroblastos CD71⁺/CD235a⁺; blastos CD117⁺/HLA-DR⁻/CD34⁻.
- **Leucemia megacarioblástica aguda:** megacarioblastos CD41⁺/CD61⁺/CD42b⁺; presencia de marcadores mieloides CD13 y CD33. CD45, CD34 y HLA-DR pueden ser negativos. También puede haber expresión aberrante de CD7.
- **Leucemia basofílica aguda:** blastos CD13⁺/CD33⁺/CD123⁺/CD203c⁺/CD11b⁺ y negativos para marcadores monocíticos; CD34 y CD117 son poco habituales. CD9, CD22 citoplasmático y TdT son marcadores que se pueden expresar aberrantemente.

- **Panmielosis con mielofibrosis aguda:** blastos CD34⁺ coexpresando algún marcador mielóide (CD13, CD33 y/o CD117).

2.2.2. Leucemia linfoblástica aguda de precursores B

2.2.2.1. Definición

La **leucemia linfoblástica aguda** (LLA) es una neoplasia linfoide caracterizada por una interrupción en la diferenciación de los precursores linfoides durante la linfopoyesis. Esta interrupción se puede dar en diferentes fases de la linfopoyesis. Viene acompañada de un incremento de la proliferación de los precursores afectados y la acumulación de estos, denominados también **blastos** o **linfoblastos**, en la MO y expansión a otros tejidos, como a la sangre periférica, provocando una pérdida del homeostasis celular, así como sucede en la LMA. Cuando las células afectadas son de origen B, se habla de leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B), en cambio, cuando las afectadas son de origen T, se habla de leucemia linfoblástica aguda de precursores T (LLA-T) (15).

La incidencia global de esta enfermedad es de 1 - 4,75 casos por 100.000 habitantes anualmente, siendo el 75% de los casos LLA-B y el 25% LLA-T. Es una enfermedad más predominante en niños/as menores de 6 años (75% de los casos de LLA) y especialmente más devastadora en adultos (15–17).

2.2.2.2. Etiología

El origen de esta entidad patológica es todavía desconocido. En la mayoría de casos aparece como una neoplasia *de novo* en individuos previamente sanos.

Existe una mayor prevalencia de esta neoplasia en la población pediátrica con síndrome de Down, así como en individuos pediátricos portadores de otras alteraciones genéticas constitucionales (28). Otros factores de predisposición están relacionados con la exposición a radiaciones ionizantes, pesticidas, ciertos

disolventes (29) o a virus como el Epstein-Barr y el virus de la inmunodeficiencia humana (30,31).

Estudios de *genome-wide association* han demostrado la asociación entre la presencia de ciertos polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) de genes tales como *GATA3*, *ARID5B*, *IKF1*, *CEBPE* y *CDKN2A/B* y el riesgo a desarrollar LLA (32–34). Si bien, a pesar de que las aberraciones cromosómicas son una característica principal en la LLA, no son suficientes para iniciar la leucemia.

Por lo tanto, y como en la mayoría de cánceres, la LLA probablemente surge de las interacciones entre exposiciones exógenas y endógenas, y de la susceptibilidad genética del propio individuo, tal y como se ilustra en la **Figura 5** (35). De entre esas exposiciones, las hipótesis más aceptadas postulan que la LLA puede iniciarse por una respuesta inmunitaria anómala ante infecciones víricas o bacterianas, especialmente durante la edad pediátrica (36,37).

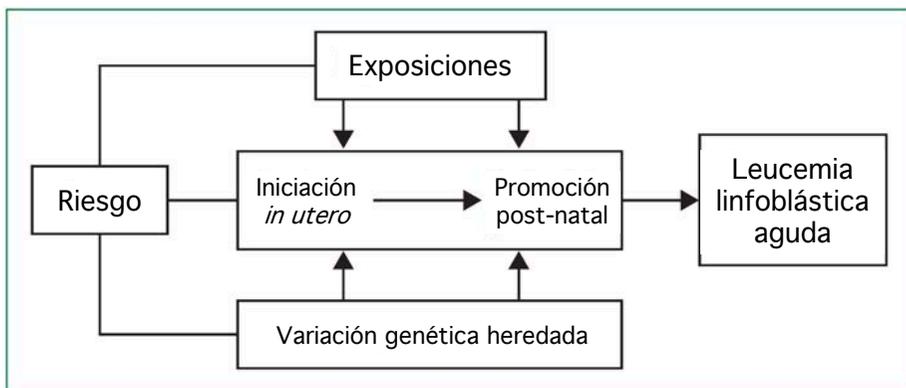


Figura 5. Causalidad compuesta de la leucemia linfoblástica aguda. Adaptada de Inaba *et al.*, 2013 (35).

2.2.2.3. Características clínicas, citomorfológicas y genéticas

Las **manifestaciones clínicas** de la LLA-B son consecuencia de la acumulación de precursores linfoides malignos en la médula ósea, en sangre periférica y en otras localizaciones extramedulares. Esta acumulación de blastos puede causar citopenias (trombocitopenia o leucopenia) y anemia. Los síntomas más comunes incluyen fiebre, pérdida de peso, fatiga e infecciones.

Según los criterios **citomorfológicos**, el diagnóstico de LLA-B requiere la presencia de un mínimo del 20% de blastos en la médula ósea. En caso que este porcentaje sea menor, se recurre a la denominación de linfoma linfoblástico B (LLB). Los blastos varían desde ser pequeños en tamaño, con un diámetro entre 14 y 20 μm , el doble de los linfocitos pequeños, con escaso citoplasma y cromatina condensada, a blastos con un diámetro superior a 20 μm , con cantidades moderadas de citoplasma y cromatina dispersa. Generalmente, los linfoblastos son bastante uniformes y difícilmente se puede distinguir entre blastos de tipo B y de tipo T (15,24).

Las diferentes **alteraciones genéticas** que presenta la LLA-B describen los subtipos biológicos y clínicos. Estas alteraciones se dividen en tres subgrupos: [1] translocaciones cromosómicas que resultan en nuevos genes de fusión que expresan proteínas leucemogénicas o en la sobreexpresión de oncogenes; [2] grupos de ploidía establecidos caracterizados por la ganancia o pérdida de ciertos cromosomas; y [3] otras alteraciones. En la **Tabla 4** se detallan las alteraciones genéticas clínica y biológicamente relevantes para los tres subgrupos (38).

Tabla 4. Subgrupos genéticos de leucemia linfoblástica aguda de precursores B clínica y biológicamente relevantes. Adaptada de Moorman, 2012 (38).

Subgrupo 1: Translocaciones cromosómicas / genes de fusión	Genes
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i>
t(1;19)(q23;p13)/der(19)t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3-PBX1</i>
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AFF1</i>
t(11;19)(q23;p13.3)	<i>MLL-MLLT1</i>
Otras translocaciones de <i>MLL</i>	6q27 (<i>MLLT4</i>), 9p21 (<i>MLLT3</i>), 10p12 (<i>MLLT10</i>), 1p32 (<i>EPS15</i>)
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>
t(17;19)(q22;p13)	<i>TCF3-HLF</i>
Translocaciones <i>IGH@-CEBP</i>	19q13 (<i>CEBPA</i> , <i>CEBPG</i>), 20q13 (<i>CEBPB</i>), 14q11 (<i>CEBPE</i>), 8q11 (<i>CEBPD</i>)
Otras translocaciones <i>IGH@</i>	1q21 (<i>BCL9</i>), 1q24 (<i>LHX4</i>), 5q31 (<i>IL3</i>), 6p22 (<i>ID4</i>), 7p14 (<i>TRG@</i>), 11q23 (?), 11q24 (<i>mir-125b</i>), 12p13 (<i>BCL1</i>), 17q21 (<i>IGF2BP1</i>), 19p13 (<i>EPOR</i>)
t(X;14)(p22;q32)/t(Y;14)(p11;q32)	<i>IGH@-CRLF2</i>
del(X)(p22.33p22.33)/del(Y)(p11.32p11.32)	<i>P2RY8-CRLF2</i>
Subgrupo 2: Ploidía	Número de cromosomas
Casi haploidía	< 30 cromosomas
Hipodiploidía moderada / Casi triploidía	30-39 / 60-78 cromosomas
Elevada hiperdiploidía	51-65/67 cromosomas

Tabla 4 (continuación). Subgrupos genéticos de leucemia linfoblástica aguda de precursores B clínica y biológicamente relevantes. Adaptada de Moorman, 2012 (38).

Subgrupo 3: Otros	Definición
Amplificación intracromosomal del cromosoma 21	Amplificación de 21q22.11-21q22.12
Cariotipo complejo	Cinco o más alteraciones cromosómicas no relacionadas en ausencia de otra alteración establecida

2.2.2.4. Clasificación

Así como para la LMA, existe una clasificación de la LLA basada en la morfología celular propuesta por el grupo FAB en 1976 (24) y asociada a la clínica en 1981 (39). Esta clasificación dividió la LLA, tanto de precursores B como de precursores T, en tres subtipos (L1, L2 y L3), basándose en el tamaño celular, las características del citoplasma, la presencia/ausencia y el tamaño del nucleolo, la vacuolización y la basofilia (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación franco-americano-británica (FAB) de la leucemia linfoblástica aguda. Adaptada de Bennet *et al.*, 1976 (24).

Subtipo FAB	Características
L1	Células pequeñas (14 - 20 µm de diámetro), cromatina homogénea, núcleo regular, nucleolo no visible, escaso citoplasma, basofilia moderada y vacuolización variable
L2	Células grandes (> 20 µm de diámetro) y heterogéneas, cromatina heterogénea, núcleo irregular, nucleolo presente y grande, citoplasma moderadamente abundante, basofilia y vacuolización variable
L3	Células grandes y homogéneas, cromatina homogénea, núcleo regular, nucleolo prominente, citoplasma moderadamente abundante, basofilia intensa y vacuolización prominente

Además de la clasificación FAB, la OMS clasifica la leucemia linfoblástica aguda de precursores B teniendo en cuenta las alteraciones genéticas en grupos clínicamente relevantes. La LLA-B o LLB se incluye en el grupo de neoplasias de precursores linfoides, donde también se incluyen la LLA-T (o linfoma linfoblástico de precursores T, LLT) y la leucemia/linfoma linfoblástico de células NK. En la **Tabla 6** se detalla la clasificación de la LLA-B/LLB según la versión del año 2017 publicada por la OMS (15).

Tabla 6. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de la leucemia linfoblástica aguda de precursores B / linfoma linfoblástico de precursores B (15).

Tipo	Subtipos
Leucemia/linfoma linfoblástico de precursores B, no especificado de otro modo	
Leucemia/linfoma linfoblástico de precursores B con alteraciones genéticas recurrentes	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(v;11q23.3); reordenamiento de <i>KMT2A</i>
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con hiperdiploidía
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con hipodiploidía
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(5;14)(q31.1;q32.1); <i>IGH-IL3</i>
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
	Leucemia/linfoma linfoblástico B <i>BCR-ABL1 like</i>
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con <i>iAMP21</i>

2.2.2.5. Inmunofenotipo

A continuación, se describen los inmunofenotipos más característicos de los diferentes subtipos de LLA de precursores B (15):

LLA-B no especificada de otro modo

Los linfoblastos se caracterizan por ser CD19⁺/cCD79a⁺/cCD22⁺, así como CD10⁺/CD22⁺/CD24⁺/TdT⁺ en la mayoría de los casos; puede haber expresión aberrante de CD33 y CD13. Según el grado de diferenciación del precursor de linaje B, existe una expresión diferencial de CD10, así como de inmunoglobulinas citoplasmáticas (*cytoplasmic immunoglobulin*, clg) y de superficie (*surface immunoglobulin*, slg):

- **LLA pro-B:** CD19⁺/cCD79a⁺/cCD22⁺/TdT⁺/CD10⁻/clg^μ/slg⁻
- **LLA-B común:** CD19⁺/cCD79a⁺/cCD22⁺/TdT⁺/CD10⁺/clg^μ/slg⁻
- **LLA pre-B:** CD19⁺/cCD79a⁺/cCD22⁺/TdT⁺/CD10^{+/-}/clg^μ/slg⁻
- **LLA-B madura:** CD19⁺/cCD79a⁺/cCD22⁺/TdT⁺/CD10^{+/-}/clg^μ/slg⁺

LLA-B con alteraciones genéticas recurrentes

- **LLA-B con t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*:** blastos CD10⁺/CD19⁺/TdT⁺; expresión frecuentemente aberrante de CD13, CD33 y cCD66.
- **LLA-B con t(v;11q23.3); reordenamiento de *KMT2A*:** blastos con fenotipo de célula pro-B CD19⁺/CD10⁻ y expresión de CD15.
- **LLA-B con t(12;21)(p13.2;q22.1); *ETV6-RUNX1*:** blastos CD19⁺/CD10⁺/CD34⁺; frecuente expresión aberrante de CD13.
- **LLA-B con hiperdiploidía:** blastos típicos de célula B CD19⁺/CD10⁺ y también CD34⁺.

- **LLA-B con hipodiploidía:** blastos con fenotipo de célula pre-B CD19⁺/CD10^{+/-}/clgμ⁺.
- **LLA-B con t(5;14)(q31.1;q32.1); *IGH-IL3*:** blastos CD19⁺/CD10⁺.
- **LLA-B con t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*:** blastos con fenotipo de célula pre-B CD19⁺/CD10^{+/-}/clgμ⁺.
- **LLA-B *BCR-ABL1 like*:** blastos CD19⁺/CD10⁺.
- **LLA-B con *iAMP21*:** no existe información detallada del inmunofenotipo.

2.2.3. Mieloma múltiple

2.2.3.1. Definición

El **mieloma múltiple** (MM) es una neoplasia linfoide caracterizada por la proliferación monoclonal y la acumulación de células plasmáticas (CPs) malignas en la médula ósea. Además de encontrarse en la MO, las CPs malignas pueden infiltrarse a sangre periférica y a otros tejidos y órganos extramedulares, sobretodo en estadios más tardíos del curso de la enfermedad (15).

En la mayoría de pacientes, el MM se caracteriza por la secreción por parte de las CPs malignas de la misma inmunoglobulina (Ig) monoclonal formada por una cadena pesada (IgG, IgA, IgM, IgE o IgD) y una cadena ligera, restringida a ser κ o λ. Esta inmunoglobulina monoclonal se conoce como proteína monoclonal (proteína M). En el 15-20% de los pacientes, únicamente son secretadas las cadenas ligeras libres monoclonales por parte de las células mielomatosas. Entre el 1% y 5% de los pacientes no secreta ni proteína M ni cadenas ligeras monoclonales (40).

La incidencia global de la enfermedad varía entre 1 - 6,63 por 100.000 habitantes por año. Es una neoplasia que se acostumbra a presentar con más frecuencia en hombres que en mujeres y en pacientes mayores de 50 años (16,17).

2.2.3.2. Etiología

Las causas que provocan el mieloma múltiple son todavía desconocidas, aunque varios estudios han analizado diferentes factores de riesgo potenciales para desarrollar esta enfermedad. Algunos autores han relacionado el desarrollo del MM en pacientes expuestos a las radiaciones originadas tras la explosión de armas nucleares (41). Sin embargo, otros estudios posteriores no obtuvieron una relación asociativa (42). También ha sido estudiada la exposición a pesticidas, agentes infecciosos, disolventes, bencenos, entre otros compuestos (43,44), sin resultados concluyentes.

Los estudios de *genome-wide association* han identificado *loci* genéticos asociados a un riesgo incrementado de padecer MM. También se han identificado SNPs que provocan la activación de *MYC*, asociada a la progresión a MM (45).

En la mayoría de casos, el MM viene precedido por una alteración pre-maligna denominada gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), que se caracteriza por la presencia de proteína M y la ausencia de síntomas de mieloma u otra enfermedad linfoproliferativa (46).

El mieloma múltiple, así como las alteraciones hematológicas relacionadas con las células plasmáticas, se desarrolla cuando se producen translocaciones cromosómicas que involucran a genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulina (*immunoglobulin heavy chain*, IGH) o aneuploidías, que confieren una ventaja selectiva en la proliferación celular de las células plasmáticas y alteran la producción normal de inmunoglobulinas. Ello provocaría una expansión clonal que puede llevar al desarrollo de la GMSI y posteriormente del MM, siempre y cuando se produzcan eventos genéticos secundarios. En la **Figura 6** se ilustra un esquema del desarrollo de las diferentes gammapatías monoclonales (47).

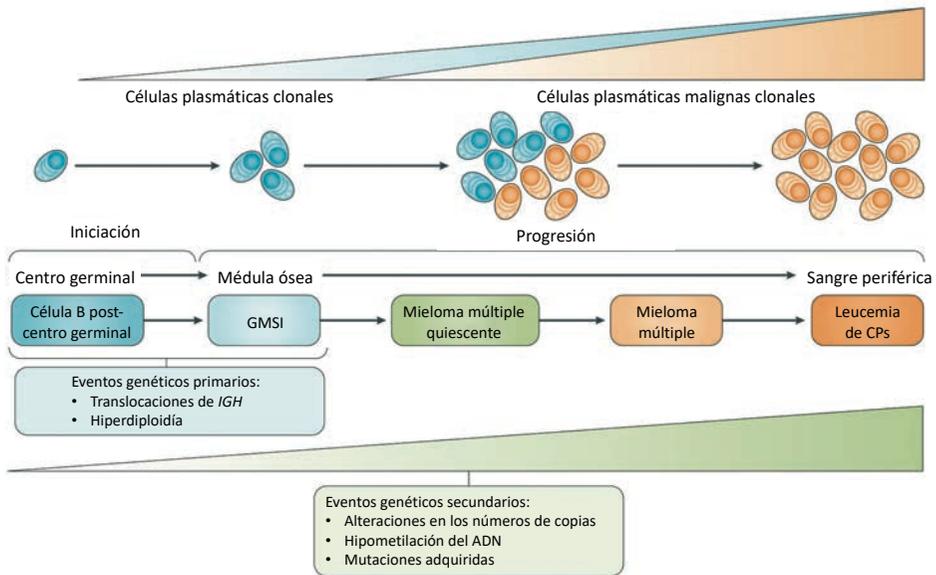


Figura 6. Desarrollo de las gammopatías monoclonales. Adaptada de Kumar *et al.*, 2017 (47).

2.2.3.3. Características clínicas, citomorfológicas y genéticas

La mayoría de los pacientes con mieloma múltiple presentan unas **características clínicas** relacionadas con alteraciones en ciertos órganos producidas por las CPs malignas, ya sea por su acumulación o por la secreción de la proteína M y/o de citocinas. Estas alteraciones se presentan en una o más de las siguientes manifestaciones clínicas: hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas (*hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, and bone lesions*; CRAB). Otras manifestaciones clínicas incluyen infecciones, sangrado y ocasionalmente afecciones neurológicas.

A nivel **citomorfológico**, las CPs malignas se diferencian de las CPs normales en varios aspectos. Por un lado, presentan anomalías relacionadas con el núcleo de la célula, tales como la condensación anómala de la cromatina, o bien, núcleo irregular. Por otro, existen cambios relacionados con el citoplasma, incluyendo la coloración y las inclusiones formadas a causa del metabolismo alterado de las

inmunoglobulinas. Según el paciente, las CPs malignas presentan diferentes grados de diferenciación (48).

Por lo que se refiere a las **alteraciones genéticas**, el MM es considerado una enfermedad biológicamente heterogénea, ya que se presentan alteraciones muy diversas relacionadas con esta enfermedad. Como se ha explicado anteriormente, existen unas alteraciones primarias del tipo translocaciones cromosómicas y aneuploidías y otras secundarias, que llevan finalmente al desarrollo de la enfermedad. En la **Tabla 7** se destacan las más frecuentes (15,47).

2.2.3.4. Clasificación

La clasificación de la OMS del año 2017 (15) incluye el mieloma múltiple dentro de la categoría de neoplasias de células B maduras, específicamente en del grupo de neoplasias de células plasmáticas. Este grupo incluye: [1] gammapatía monoclonal de significado incierto; [2] mieloma múltiple o mieloma de células plasmáticas; [3] plasmacitoma; [4] enfermedades por depósito de proteína monoclonal; y [5] neoplasias de células plasmáticas asociadas a síndromes paraneoplásicos.

El mieloma múltiple se define según las siguientes características: más de un 10% de células plasmáticas malignas en médula ósea o evidencias de plasmacitoma extramedular y al menos un evento definitorio de mieloma, ya sea una característica CRAB o un marcador de malignidad¹ (49).

Existen, además, tres variantes del mieloma múltiple que dependen de los síntomas manifestados, los niveles de proteína M, el porcentaje de células plasmáticas malignas y su grado de infiltración. Las variantes en cuestión son las siguientes:

¹ $\geq 60\%$ células plasmáticas malignas, ratio de cadenas libres en suero ≥ 100 o más de una lesión focal.

Tabla 7. Alteraciones genéticas del mieloma múltiple. Adaptada de Kumar *et al.*, 2017 (47) y de Swerdlow *et al.*, 2017 (15).

Alteraciones cromosómicas	
Hiperdiploidía	Trisomía de los cromosomas 3, 5, 7, 9 11, 15, 19 y 21
Translocación de <i>CCND1</i> , <i>CCND2</i> y <i>CCND3</i>	t(11;14)(q13;q32)
	t(12;14)(p13;q32)
	t(6;14)(p21;q32)
Translocación de <i>NSD2</i>	t(4;14)(p16;q32)
Translocación de <i>MAF</i>	t(14;16)(q32;q23)
	t(14;20)(q32;q11)
	t(8;14)(q24;q32)
Alteraciones genéticas secundarias	
<i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>FAM46C</i> , <i>DIS3</i> , <i>TP53</i> , <i>BRAF</i> , <i>TRAF3</i> , <i>PRDM1</i> , <i>CYLD</i> , <i>RB1</i> , <i>IRF4</i> , <i>EGR1</i> , <i>MAX</i> , <i>HIST1H1E</i> y <i>ACTG1</i>	
Alteraciones epigenéticas	
Alteración de la metilación del ADN	
Alteración de la estructura de la cromatina	
Desregulación de microARNs	

- **Mieloma múltiple quiescente:** Este tipo de mieloma presenta células plasmáticas clonales en la médula ósea entre el 10% y el 60% y/o niveles de proteína M en suero $\geq 30\text{g/L}$. Sin embargo, no presenta ninguno de

los eventos definitorios del mieloma múltiple. Es una forma de mieloma que se encuentra entre la GMSI y el MM plenamente desarrollado.

- **Mieloma múltiple no secretor:** Las células plasmáticas malignas no producen secreción de proteína M en el 1% y el 3% de los mielomas múltiples. Esta proteína M es producida por las CPs, pero no secretada al plasma. Se detectan cadenas libres presentes en suero o bien ratios alteradas. Las características clínicas se manifiestan a un nivel moderado.
- **Leucemia de células plasmáticas:** Esta variante presenta más de un 20% de células plasmáticas malignas respecto al total de leucocitos en sangre periférica o un recuento absoluto superior a $2 \times 10^9/L$.

2.2.3.5. Inmunofenotipo

En el mieloma múltiple, las células plasmáticas malignas presentan un inmunofenotipo ligeramente diferente al de las células plasmáticas normales, por lo que será esencial determinarlo adecuadamente y poder discernir entre las dos poblaciones celulares.

Las CPs normales se caracterizan por ser principalmente CD45^{low}, CD38^{high} y expresar CD138. En cambio, las CPs malignas expresan CD38 con menor intensidad, CD138 con mayor intensidad y CD45 puede ser negativo o de expresión muy débil. Las CPs normales presentan una heterogeneidad en la expresión de CD19, así como de CD81, son positivas para CD27 y CD81 y no expresan CD56, o en muy baja intensidad. Sin embargo, las células plasmáticas aberrantes se caracterizan por la falta de CD19 y por expresar CD27 en menor intensidad y no tener expresión de CD81. También presentan una expresión aberrante de antígenos tales como CD56 y CD117. Las CPs normales expresan proporciones similares las cadenas ligeras κ y λ y, en cambio, las CPs malignas están restringidas a la expresión de un solo tipo de cadena ligera (50–52).

2.3. Herramientas de diagnóstico integrado

En el **diagnóstico** de las neoplasias hematológicas, es esencial combinar el estudio de las manifestaciones clínicas que presente el paciente con las características morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas que presentan las células neoplásicas. En las **Tablas 8, 9 y 10** se hace un resumen de las principales herramientas para el diagnóstico de la LMA, la LLA-B y el MM, respectivamente.

Tabla 8. Herramientas para el diagnóstico de la leucemia mieloide aguda. Adaptada de Döhner *et al.*, 2017 (53).

Procedimientos para establecer el diagnóstico	Procedimientos adicionales
Recuento sanguíneo completo y diferencial	Historia demográfica, médica, familiar, sanguínea
Citomorfolología del aspirado de médula ósea	Examen físico
Citomorfolología de la biopsia de médula ósea	Análisis de comorbilidades
Inmunofenotipado	Análisis bioquímicos; test de coagulación; análisis de orina; test de hepatitis A, B y C; test del virus de la inmunodeficiencia humana 1
Análisis citogenéticos y genéticos	Tipaje de alelos del sistema antígeno leucocitario humano (<i>human leukocyte antigen</i> , HLA) para establecer la elegibilidad para trasplante alogénico de médula ósea
Citogenética	Radiografía de tórax, electrocardiograma, ecocardiografía
Detección de mutaciones genéticas (<i>NPM1</i> , <i>CEPBA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i> , <i>TP53</i> y <i>ASXL1</i>)	Punción lumbar
Detección de reordenamientos genéticos (<i>PML-RARA</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , otros genes de fusión)	Almacenamiento de muestras en biobanco

La sangre periférica y los aspirados o biopsias de médula ósea son los tejidos principalmente analizados en el diagnóstico de estas neoplasias hematológicas

(15). En el caso de las leucemias agudas, también se analiza el líquido cefalorraquídeo (53,54), indicado para el estudio de la infiltración extramedular, y en el caso del mieloma múltiple, el tejido óseo, para conocer si existen lesiones osteolíticas mediante tecnologías de imagen (55,56).

Tabla 9. Herramientas para el diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda de precursores B. Adaptada de Hoelzer *et al.*, 2016 (54).

Procedimientos para establecer el diagnóstico	Procedimientos adicionales
Recuento sanguíneo completo y diferencial	Historia demográfica, médica, familiar, sanguínea
Citomorfoloía del aspirado o biopsia de médula ósea y de sangre	Examen físico
Citomorfoloía del fluido cerebroespinal	Análisis de comorbilidades
Inmunofenotipado	Análisis bioquímicos, test de coagulación, análisis de orina
Análisis citogenéticos y genéticos	Tipaje de alelos de HLA para establecer la elegibilidad para trasplante alogénico de médula ósea
Citogenética	Radiografía de tórax, electrocardiograma, ecocardiografía
Detección de reordenamientos genéticos (<i>BCR-ABL1</i> , <i>MLL-AFA4</i> , <i>TCF3-PBX1</i> , <i>ETV6-RUNX1</i> , otros genes de fusión)	Punción lumbar
Detección de mutaciones genéticas (no implementado a nivel clínico)	Almacenamiento de muestras en biobanco

Diagnosticar y definir correctamente la entidad es, por lo tanto, de gran importancia para poder establecer un pronóstico y un tratamiento adecuado. Las herramientas de diagnóstico incluyen la **citomorfoloía**, para definir la morfología y las características celulares; el **inmunofenotipado**, mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica, para identificar la expresión aberrante de antígenos; y la

citogenética y genética molecular, para identificar las aberraciones cromosómicas y alteraciones genéticas que presenta la entidad. La integración de estas herramientas es imprescindible para identificar, clasificar y definir el tratamiento de las neoplasias hematológicas. Dada esta aproximación integrada y multimodal requerida para el diagnóstico y clasificación de las neoplasias hematológicas, es recomendable que estos estudios de diagnóstico se realicen acorde con las manifestaciones clínicas del paciente y se informen en un documento único e integrado (15).

En los siguientes subapartados, se detallarán estas herramientas para el diagnóstico integrado de las enfermedades hematológicas y cómo se aplican para el análisis de las neoplasias estudiadas en la Tesis Doctoral.

Tabla 10. Herramientas para el diagnóstico del mieloma múltiple. Adaptada de Caers *et al.*, 2018 (55) y Moreau *et al.*, 2017 (56).

Procedimientos para establecer el diagnóstico	
Recuento sanguíneo completo y diferencial	Examen físico
Electroforesis de suero y/u orina para evaluación de la proteína M	Análisis de comorbilidades
Cuantificación de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), caracterización de cadenas pesadas y de cadenas ligeras libres	Análisis bioquímicos
Determinación de albúmina, β 2-microglobulina, proteína C-reactiva y lactato deshidrogenasa (LDH)	Test renal y hepático
Evaluación de lesiones óseas (tecnologías de imagen)	Análisis citogenéticos y genéticos
Citomorfolología del aspirado o biopsia de médula ósea	Citogenética
Inmunofenotipado	Detección de reordenamientos cromosómicos y deleciones por FISH (t(4;14), del(17p), y t(14;16))
Determinación de creatinina sérica y niveles de calcio	Detección de mutaciones genéticas (no implementado a nivel clínico)

2.3.1. Citomorfología

La citomorfología comprende el estudio de las características celulares mediante microscopía óptica y electrónica. En las enfermedades hematológicas, es necesario identificar la morfología celular, las proporciones de las diversas poblaciones celulares y sus características, tanto a partir de sangre periférica como de médula ósea.

Para determinar las diversas poblaciones celulares, se realizan frotis de sangre periférica y médula ósea y se tiñen con May-Grünwald-Giemsa o Wright-Giemsa para la visualización óptima de los gránulos citoplasmáticos y de la cromatina nuclear (57). Los recuentos celulares obtenidos del análisis de la sangre periférica generalmente deberían ser acordes con los resultados obtenidos mediante el contador hematológico. Las poblaciones que se cuantifican en la médula ósea son las siguientes: blastos, promonocitos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, neutrófilos en banda, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos, células plasmáticas, precursores eritroides y mastocitos. Los megacariocitos no son tenidos en cuenta para el cálculo de los porcentajes finales (15).

En el caso de la **leucemia mieloide aguda**, la citomorfología ayuda a definir, por un lado, el porcentaje de blastos sobre el total de las poblaciones celulares, y por otro, la morfología de estos para determinar el linaje afectado (**Figura 7a**). El porcentaje de blastos será definitorio de leucemia mieloide aguda si este es superior al 20% en MO. Porcentajes menores determinan anemias refractarias con exceso de blastos tipo I o II, o LMA en caso de que haya asociada una translocación de los cromosomas 8 y 21, $t(8;21)(q22;q22.1)$, una inversión del cromosoma 16, $inv(16)(p13.1;q22)$, una alteración del cromosoma 16, $t(16;16)(p13.1;q22)$, o la fusión *PML-RARA* (15). Según la morfología que

presenten los blastos, la LMA se puede clasificar en una de las categorías FAB (25–27).

En la **leucemia linfoblástica aguda**, la citomorfología no determinará si los blastos leucémicos son de origen B o T, aunque sí indicará su grado de maduración y, por lo tanto, en qué categoría FAB se clasifican (24) (**Figura 7b**). Como en la LMA, el límite inferior de blastos que se debe detectar mediante citomorfología en MO es del 20%. Porcentajes inferiores al 20% pueden estar relacionados con linfomas linfoblásticos, si además van acompañados de ausencia de infiltración de blastos en la sangre periférica (15).

En el **mieloma múltiple** se determinará el porcentaje de células plasmáticas malignas (**Figura 7c**) para el diagnóstico y clasificación en las diversas variantes. Un porcentaje de CPs malignas mayor al 60% representa uno de los eventos definitorios de malignidad en el mieloma. Porcentajes inferiores al 10% de CPs deberán ir acompañados de otros eventos definitorios para poder diagnosticar la enfermedad (49).

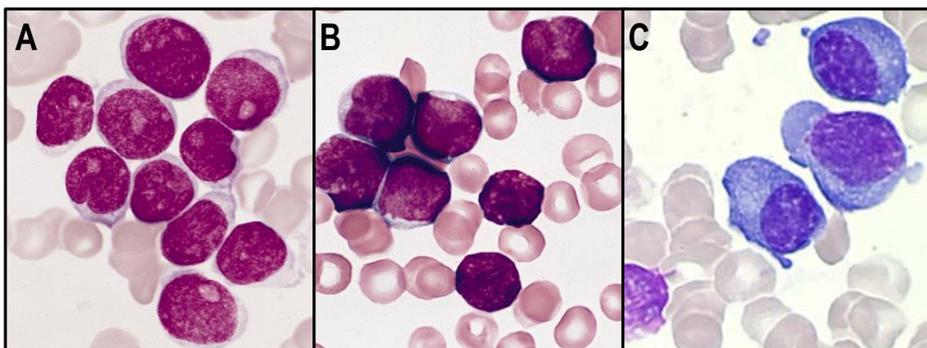


Figura 7. Citomorfología de células malignas. (A) Blastos correspondientes a una leucemia mieloide aguda M1. Tinción Wright-Giemsa. Adaptada de Mihova, 2013 (58). (B) Blastos correspondientes a una leucemia linfoblástica aguda L1. Tinción Wright-Giemsa. Adaptada de Mihova, 2013 (59). (C) Células plasmáticas maduras malignas correspondientes a un mieloma múltiple. Tinción May-Grünwald-Giemsa. Adaptada de Ribourtout *et al.*, 2015 (48).

2.3.2. Inmunofenotipado

Una vez conocidas las características clínicas y citomorfológicas, se procede a la caracterización inmunofenotípica, necesaria en el diagnóstico integrativo de cada una de las entidades. Con la finalidad de permitir la clasificación de la neoplasia hematológica adecuadamente, es necesario realizar el inmunofenotipado en el momento del diagnóstico, que definirá el estado de maduración de la célula maligna, y proporcionará de la información inmunofenotípica para el seguimiento pertinente de la evolución de la enfermedad (15).

La **citometría de flujo multiparamétrica** (CFM) es la tecnología mayoritariamente utilizada para estudiar el inmunofenotipo de las neoplasias hematológicas (60). Permite analizar miles de células en un período de tiempo muy corto y combinar múltiples marcadores simultáneamente para conocer detalladamente el fenotipo de las poblaciones neoplásicas. Los avances de las últimas décadas relativos a mejoras en la instrumentación de los citómetros y la disponibilidad de un amplio abanico de anticuerpos y fluorocromos (61), han mejorado la capacidad de esta tecnología para discriminar poblaciones celulares normales de aquellas con aberraciones inmunofenotípicas, siendo clave en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. Además, debido a su alta sensibilidad, será una herramienta de gran utilidad en la determinación de la enfermedad residual medible (ERM) durante el seguimiento de los pacientes (62–64).

El **principio de funcionamiento** de esta tecnología reúne la combinación de tres componentes principales: un sistema fluídico, un sistema óptico y un sistema electrónico (**Figura 8**). Estos sistemas permiten analizar las características de dispersión de la luz y fluorescencia de células en suspensión y también de otros elementos como microorganismos, el núcleo o preparaciones de cromosomas (65).

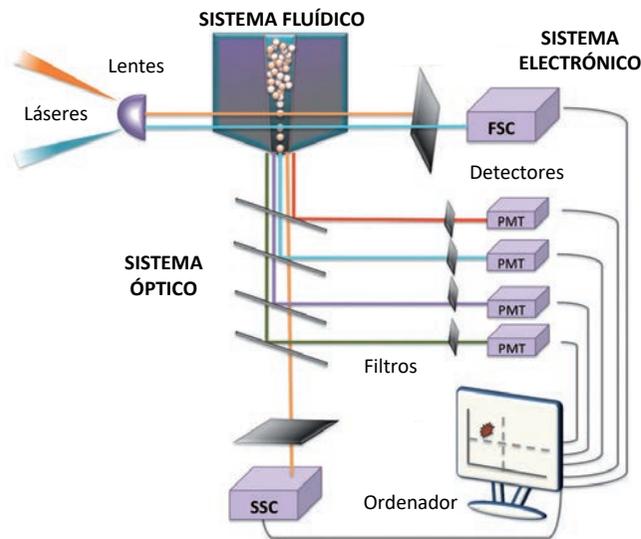


Figura 8. Componentes principales de un citómetro de flujo.
Adaptada de Adan *et al.*, 2017 (66).

El **sistema flúídico** del citómetro permite direccionar las células mediante un fluido acompañante, que envuelve la muestra. Para evitar la mezcla del espécimen y del fluido acompañante, el movimiento del fluido sigue un patrón de flujo laminar (67), es decir, un movimiento en el cual el fluido se dispone en láminas paralelas. Al llegar a la zona de análisis, la región central donde se dispone el espécimen se va estrechando y, por tanto, la velocidad del flujo incrementa. En la cámara de análisis se produce un efecto de enfoque hidrodinámico, utilizado en la mayoría de citómetros para el diagnóstico clínico, que permite el preciso posicionamiento de las células gracias al fluido acompañante y a la diferencia de presiones entre muestra y fluido.

Las células atraviesan la cámara de análisis de forma individual para llegar al punto de intersección entre el láser y la célula, denominado punto de interrogación. En el punto de interrogación, el haz de luz de cada láser del citómetro excita los fluorocromos de las células de la forma más uniforme posible.

La fluorescencia emitida, así como la dispersión de la luz frontal y lateral, se recoge mediante el **sistema óptico**. El sistema óptico está conformado por una serie de filtros que permiten separar emisiones de la fluorescencia según su longitud de onda y dirigir las a los distintos detectores del sistema electrónico.

El **sistema electrónico** consta de tubos fotomultiplicadores (*photomultiplier tubes*, PMTs) que convierten los fotones de luz que llegan a los detectores en un impulso eléctrico. Los fotodiodos de avalancha pueden convertirse en una alternativa a los PMTs, dado que son fotodetectores con una eficiencia cuántica de detección superior que permite obtener mejores resultados en el análisis de longitudes de onda espectros de emisión superiores a 400 nm y hasta 1100 nm, mientras que los PMTs permiten convertir longitudes de onda de hasta 800 nm, con una eficiencia cuántica inferior (68). La señal electrónica convertida por los detectores genera un pulso de voltaje, caracterizado por su altura, anchura y área, muy útil en la discriminación de agregados celulares (61). Esta señal electrónica finalmente es procesada por el sistema informático acoplado al citómetro para obtener y almacenar datos y realizar el análisis pertinente de la información recogida (65).

Los **parámetros** que analiza el citómetro de flujo se engloban en dos subtipos básicos: los parámetros de dispersión de la luz y los parámetros de fluorescencia. Los parámetros de dispersión de la luz proporcionan información de la dispersión frontal (*forward scatter*, FSC), que generalmente se asocia con el tamaño de las partículas analizadas; y de la dispersión lateral (*side scatter*, SSC), que se asocia con la complejidad celular (65). La combinación del FSC y SSC resulta muy útil para distinguir las distintas poblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos y granulocitos) así como los blastos, debido a sus diferencias en tamaño y complejidad (61), sin necesidad de realizar ningún tipo de marcaje de fluorescencia. Para poder detectar aquellos marcadores de interés, las muestras

deben ser preparadas previamente, dado que las características de autofluorescencia no permiten generalmente distinguir subpoblaciones celulares, a pesar de existir componentes celulares intrínsecamente fluorescentes (69).

El **procedimiento de inmunofenotipado** tiene la finalidad de detectar marcadores biológicos específicos (antígenos, receptores, proteínas, enzimas, etc.) a nivel de célula única y sobre un gran número de ellas, por lo que los especímenes a estudiar son sometidos a inmunoreacciones en presencia de anticuerpos monoclonales conjugados covalentemente a fluorocromos. Si el marcador biológico sujeto a estudio se encuentra expresado en las células a analizar, y si la inmunoreacción se ha producido eficientemente, como resultado, el anticuerpo habrá reconocido a su antígeno mediante una unión específica al epítipo correspondiente. Al adquirir los especímenes en el citómetro de flujo, el fluorocromo conjugado será excitado por la luz del láser. La luz emitida será recogida a través de los filtros del sistema óptico y transformada en una señal electrónica (70). De este modo, se podrán detectar marcadores celulares a nivel de la membrana, a nivel citoplasmático o a nivel nuclear.

En la *Clasificación de Tumores de Tejidos Hematopoyéticos y Linfoides* de la OMS (15) se detalla el inmunofenotipo que pueden presentar las células neoplásicas de cada entidad, como es el caso de la LMA, la LLA-B y el MM, con el objetivo de poder identificarlas y así como de poder diferenciarlas de otras entidades, en combinación con el resto de pruebas diagnósticas.

Según Craig y Foon (60), los pasos a seguir para el diagnóstico de una neoplasia hematológica mediante CFM son los siguientes: [1] identificación de células de distintos linajes y de su grado de madurez; [2] detección de células anómalas a través de la identificación de expresiones antigénicas aberrantes; [3] documentación detallada del inmunofenotipo de las células aberrantes; [4] evaluación de la información disponible y de su potencial en poder distinguir una

entidad; [5] información inmunofenotípica que proporcione un valor pronóstico adicional, incluyendo la identificación de dianas para la potencial utilización de terapias dirigidas.

Para analizar diversos marcadores de forma simultánea, las muestras se incubarán en presencia de combinaciones específicas de anticuerpos monoclonales. Estas combinaciones específicas de anticuerpos se denominan **paneles multicolor**. Para ello, es preciso determinar qué marcadores son necesarios detectar y cuál es el fluorocromo al que debe estar unido el anticuerpo que detectará dicho marcador después de la inmunoreacción. Existen recomendaciones consenso para la elección de fluorocromos (51,64), así como herramientas proporcionadas por diversas casas comerciales para el diseño de los paneles. Cabe tener en cuenta que los citómetros de flujo utilizados en el diagnóstico clínico permiten detectar y discriminar una cantidad limitada espectros de emisión, por lo general, entre 8 y 10 colores. Por tanto, si es necesario determinar un número de marcadores en una muestra superior al número de detectores del citómetro de flujo, será necesario el diseño de paneles en los que se realicen combinaciones de los diferentes marcadores a evaluar, y que permitan obtener una información diagnóstica completa (61). Para facilitar el uso de paneles multicolor, la revista científica *Cytometry*, revista oficial de la Sociedad Internacional para el Avance en Citometría (*International Society for Advancement of Cytometry*, ISAC) ha generado una colección de artículos que incluyen la descripción de paneles multicolor denominados OMIPs. Los OMIPs, del inglés, *optimized multicolor immunofluorescence panels*, son publicaciones especiales que detallan nuevos paneles multicolor diseñados y optimizados para su aplicación en citometría de flujo y otras tecnologías basadas en fluorescencia policromática. Esta iniciativa se ha desarrollado con el objetivo de que puedan ser usados por distintos laboratorios, y crear de este modo nuevos OMIPs; además de poder disponer de paneles multicolor revisados y reglados (71,72).

Las mejoras en esta tecnología han permitido incrementar el número de fluorocromos estudiados simultáneamente, la cantidad de células analizadas, el tiempo de adquisición y la resolución de las poblaciones, permitiendo estudiar de forma simultánea, rápida y eficiente múltiples características dentro de un mismo tipo celular. Además, se han desarrollado recomendaciones de consenso para la estandarización entre los diferentes laboratorios de diagnóstico (73,74), siendo de gran importancia en el establecimiento de protocolos de preparación de especímenes, valores de referencia y bases de datos.

A continuación, se presentan las estrategias a seguir para la realización del inmunofenotipado en el momento del diagnóstico de la leucemia aguda y del mieloma múltiple mediante citometría de flujo.

2.3.2.1. Inmunofenotipado de la leucemia aguda

La red europea de leucemia *European Leukemia Net* (ELN) propone un panel común (75) para el inmunofenotipado mediante CFM en caso de sospecha de leucemia aguda. Este panel común permite discernir entre leucemia aguda mieloide, linfoblástica o de fenotipo mixto; determinar el grado de maduración de las células leucémicas; identificar el linaje afectado (precursores B o T, en caso de la LLA); así como posibles marcadores aberrantes que puedan expresar las células neoplásicas. Este panel forma parte del proyecto *Harmonemia*, realizado por un grupo de expertos con el objetivo de obtener datos de CFM comparables de una manera simple, rápida y robusta (76).

En **Tabla 11** se especifican los marcadores del panel común de leucemia aguda propuesto por la ELN.

En primera instancia, la combinación del marcador leucocitario común CD45 junto con el SSC delimitará las poblaciones leucocitarias de linfocitos, monocitos y granulocitos maduros, así como los precursores eritrocitarios, caracterizados por

la ausencia de este marcador (77). La población de células leucémicas también se podrá identificar mediante la combinación de ambos parámetros, aunque, según el tipo de leucemia aguda, esta población presentará una expresión más o menos intensa e incluso negativa de CD45. Por lo tanto, su determinación servirá como primera orientación (78). La TdT es un ADN polimerasa presente en el núcleo de los blastos de LLA de precursores B o T, y en algunas LMA inmaduras. Al estar ausente en linfomas, servirá para discernir entre estas entidades (75).

Los siguientes marcadores del panel ayudarán a discernir entre LMA o LLA de precursores B o T. El marcador CD3 citoplasmático se expresa en LLA-T (79), la mieloperoxidasa (MPO) es una enzima característica del linaje mielóide (80) y el marcador CD79a citoplasmático es característico de células B (81).

Tabla 11. Panel común de leucemia aguda propuesto por la ELN. Adaptada de Béné *et al.*, 2011 (75).

<p>Para una orientación rápida</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CD45 • CD3 citoplasmático, MPO, CD79a citoplasmático, TdT • CD7, CD2, CD10, CD22 (citoplasmático o de superficie), slg, CD13, CD33 y CD34
<p>Clasificación del linaje y definición de entidades clínicas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • HLA-DR, CD1a, CD4, CD5, CD8, CD3, Igμ (citoplasmático), CD14, CD117, CD56, CD65, CD41 o CD61, CD235 o CD36
<p>Orientación de la terapia dirigida, dependiendo del tipo de leucemia y del ensayo clínico considerado</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CD20, CD22, CD33 y CD52

Otros marcadores ayudaran a discriminar también las poblaciones de origen T (CD7 y CD2), B (CD10, CD22 e inmunoglobulinas de superficie) o mielóide (CD13 y CD33). El marcador de inmadurez CD34 se puede expresar en los blastos y en las células madre leucémicas (*leukemic stem cells*, LSCs) de la mayor parte de leucemias agudas (15,82,83).

Una vez se ha procedido a clasificar el linaje de la leucemia aguda, se caracterizará la entidad de una forma más exhaustiva para poder determinar entidades clínicas específicas (15). Para ello, se analizará la expresión de otros marcadores específicos del tipo de leucemia determinado, así como de marcadores característicos de otros linajes, para estudiar si las células leucémicas presentan una expresión aberrante de otras moléculas.

2.3.2.2. Inmunofenotipado del mieloma múltiple

El inmunofenotipado en el momento del diagnóstico del **mieloma múltiple** es necesario para identificar, detectar y cuantificar las células plasmáticas malignas presentes en la MO. La CFM permitirá diferenciar las CPs malignas de las normales gracias a la determinación de marcadores tanto de superficie como intracelulares que se expresan distintamente en ambas poblaciones. Además, también será de gran importancia en el diagnóstico diferencial entre el mieloma múltiple y otras afecciones (84,85).

Según las recomendaciones del grupo cooperativo *European Myeloma Network* (55), para diferenciar entre CPs normales y malignas es necesario que diseñar un panel multicolor que permita el análisis de marcadores característicos de células plasmáticas. CD38, CD138 y CD45, junto con las características de FSC y SSC, son los marcadores y parámetros básicos para distinguir las células plasmáticas. Para discernir la expresión aberrante de marcadores y así identificar las CPs malignas, se añadirán otros marcadores de membrana tales como CD19, CD56, CD117, CD20, CD28, CD27 y CD81. Finalmente, la identificación de la expresión

de las cadenas ligeras κ y λ , expresadas a nivel citoplasmático, permitirá conocer si existe una restricción clonal a una de las cadenas por parte de la población de CPs determinada.

2.3.3. Citogenética y genética molecular

Los estudios citogenéticos son de gran utilidad el diagnóstico de la mayor parte de neoplasias hematológicas, ya que permiten determinar aberraciones a nivel cromosómico de las células malignas. A nivel clínico, las técnicas citogenéticas utilizadas se engloban en la citogenética convencional, que incluye el cariotipado, y en la citogenética molecular, que incluye la hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*, FISH). La genética molecular será también necesaria para detectar mutaciones o reordenamientos del genoma asociados a la neoplasia hematológica. Las técnicas moleculares que se utilizan a nivel diagnóstico se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR).

La **citogenética convencional** es la disciplina citogenética que comprende el estudio del cariotipo, es decir, del número y estructura de los cromosomas que conforman el núcleo de las células. El cariotipado de las células obtenidas de especímenes procedentes de médula ósea o sangre periférica permitirá evaluar y detectar anomalías cromosómicas estructurales (inversiones, translocaciones y deleciones) y anomalías numéricas (aneuploidías); siendo relevante para definir los diferentes subtipos de leucemias agudas de la OMS (15) y para caracterizar el mieloma múltiple, así como para definir el pronóstico citogenético de estas entidades (53,86–88). Para realizar el cariotipado, las células obtenidas son sometidas a un proceso de proliferación y secuestro mitótico para disponer de preparaciones cromosómicas en la metafase del ciclo celular, asumiendo así su conformación más condensada y por tanto adecuada para la visualización de los cromosomas. Para revelar los detalles estructurales de los cromosomas en la

metafase, se realiza una técnica de tinción basada en el uso de Giemsa: el bandeo G (89). El colorante de Giemsa se une al ADN cromosómico generando bandas más oscuras para las regiones heterocromáticas y bandas más claras para las regiones donde la cromatina está menos condensada. Una vez visualizados, identificados, pareados y ordenados los cromosomas de cada célula, se representan en un mapa citogenético, tal y como se muestra en la **Figura 9**, y se determinan las anomalías cromosómicas para finalmente obtener el cariotipo del paciente, acorde con la nomenclatura especificada en el Sistema Internacional para la Nomenclatura Citogenética Humana (90).

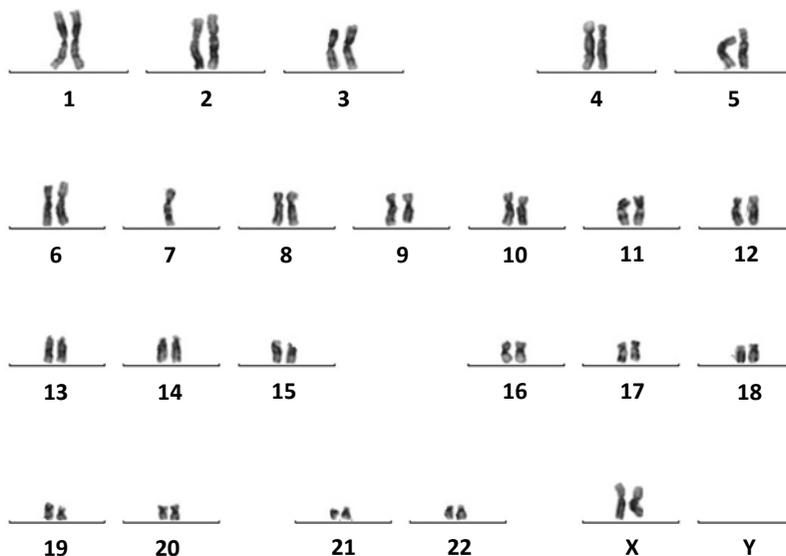


Figura 9. Mapa citogenético de un cariotipo obtenido mediante bandeo G de un subclon de LMA con monosomía del cromosoma 7. Adaptada de Ma *et al.*, 2015 (91).

Las limitaciones de esta técnica incluyen la necesidad de obtener un número mínimo de células en metafase, la posible morfología cromosómica alterada que puede dificultar la detección de alteraciones, y el límite de resolución a la detección de reordenamientos mayores a 10-20 megabases (89). No obstante, la determinación del cariotipo en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas es

de obligatoria realización según las recomendaciones actuales (53–55), debido a que permite analizar la totalidad de los cromosomas y obtener así un mapa detallado de las anomalías citogenéticas que pueda presentar el paciente.

Técnicas citogenéticas más sofisticadas, como son la técnica de FISH y el *array* de hibridación genómica comparativa, se engloban en el campo de la **citogenética molecular**. Estas técnicas han permitido incrementar el conocimiento de ciertas anomalías cromosómicas debido a su mayor resolución respecto a la citogenética convencional y a su mayor aplicabilidad, dado que permiten detectar anomalías cromosómicas de células interfásicas (92,93). A nivel clínico, la técnica de FISH se utiliza para detectar alteraciones específicas en los cromosomas mediante sondas complementarias a la secuencia genética unidas covalentemente a un fluorocromo. La unión de la sonda a su región de ADN complementaria se puede detectar y visualizar mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 10**). Se realiza como técnica complementaria a la citogenética convencional, para determinar alteraciones indetectables mediante la técnica de bandeo G o facilitar la caracterización de reordenamientos complejos; y siendo de obligatoria realización si no es posible obtener el cariotipo.

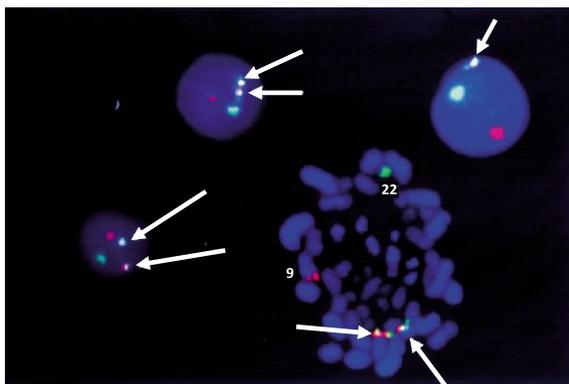


Figura 10. FISH de color dual en el núcleo de cromosomas metafásicos con una prueba BCR/ABL en una LLA-B. Las señales de fusión positivas para la translocación *BCR-ABL1* están indicadas con flechas. Adaptada de Jarošová *et al.*, 2000 (94).

Para el diagnóstico de la LMA, las alteraciones cromosómicas que se determinan son los reordenamientos *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MY11*, *KMT2A* y las fusiones genéticas de *EVI1* o las pérdidas de los cromosomas 5q, 7q o 17p (53). En LLA-B el reordenamiento *BCR-ABL1* será de importante determinación para definir el subtipo LLA-B con t(9;22)(q34.1;q11.2), y así iniciar un protocolo específico de tratamiento basado en inhibidores de la tirosina cinasa (*tyrosin-kinase inhibitors*, TKIs) (95). Otros reordenamientos crípticos a determinar son el del gen *KMT2A* y el reordenamiento *ETV6-RUNX1* (54,96). Para determinar reordenamientos cromosómicos en el mieloma múltiple, se ha de hacer una separación previa de las células plasmáticas CD138⁺ para determinar la presencia de anomalías genéticas tales como translocaciones que involucren el *locus IGH* o la delección de 17p (55,97).

Los reordenamientos detectados mediante citogenética convencional y/o molecular se confirmarán y cuantificarán mediante técnicas de **genética molecular** basadas en PCR cuantitativa a tiempo real (*real time quantitative PCR*, RT-qPCR), con la finalidad de identificar los genes de fusión resultantes de los reordenamientos cromosómicos. La cuantificación del número de transcritos de los genes de fusión será necesaria para el posterior seguimiento de la enfermedad (53–55).

En referencia a la LMA, existen alteraciones genéticas que no son detectables mediante técnicas citogenéticas, aun siendo especialmente importantes en la definición de la OMS de subtipos de LMA (15). Por lo tanto, se deberá recurrir a técnicas moleculares basadas en PCR y secuenciación de Sanger o a técnicas de RT-qPCR (53) para su confirmación. En el diagnóstico de esta entidad, se determinará si existen mutaciones de los genes *NPM1*, *CEPBA*, *RUNX1* y también de *FLT3* (tanto para duplicaciones internas en tándem como para el dominio tirosina cinasa), entre otras mutaciones relevantes. Las mutaciones de *FLT3* no

definen un subgrupo de LMA. Sin embargo, y debido a su relevante impacto pronóstico, su determinación será necesaria (98,99).

Recientemente, han surgido técnicas moleculares más avanzadas como la PCR digital, la secuenciación masiva de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS) y los *microarrays* de expresión o de hibridación genómica comparativa. Estas tecnologías podrían ayudar a diagnosticar el pronóstico de los pacientes con más eficacia, con la finalidad de definir un tratamiento más específico, además de suponer un avance fundamental en el conocimiento de estas enfermedades. Sin embargo, estas tecnologías todavía no están establecidas en la rutina clínica habitual, restringiendo su uso a nivel de investigación o en ensayos clínicos (23,100–105).

2.4. Seguimiento de las neoplasias hematológicas

Las técnicas de diagnóstico mencionadas anteriormente son también de gran utilidad en el seguimiento del paciente, permitiendo la evaluación de la respuesta al tratamiento. El seguimiento del paciente mediante dichas técnicas ayuda a determinar si la enfermedad ha remitido parcial o completamente, si por lo contrario hay persistencia o progresión, o si se produce una recaída, siendo crítico en la toma de decisiones terapéuticas.

El seguimiento las neoplasias hematológicas estudiadas en esta Tesis Doctoral, entre otras, se realiza en primera instancia mediante el estudio de la citomorfología, donde se determina el grado de persistencia de las células malignas, así como si las proporciones homeostáticas de las poblaciones celulares han sido reestablecidas, recogiendo los resultados obtenidos en el mielograma. De este modo, se podrá determinar si se cumplen los criterios de **remisión o respuesta completa** (RC). La presencia de menos de un 5% de

células aberrantes será una de las características para poder definir una RC del tratamiento de la neoplasia hematológica (53,54,56).

Además de la realización de los análisis citomorfológicos de la MO durante el seguimiento del paciente, es necesario el uso de tecnologías más sensibles para estimar mejor la reducción de la enfermedad después de la terapia, proporcionando información acerca de la evolución de la neoplasia y de la respuesta al tratamiento en cada paciente de manera individual. Mediante citometría de flujo multiparamétrica y técnicas de biología molecular se pretende cuantificar la **enfermedad residual medible**, hasta hace poco tiempo denominada enfermedad residual mínima. La ERM es el porcentaje de células malignas detectables en el paciente durante el tratamiento y en la remisión, por encima de la sensibilidad de la técnica empleada, del orden de 10^{-3} a 10^{-6} , a diferencia de la citomorfología, que solo permite una sensibilidad de 5×10^{-2} . Tal y como se muestra en la **Figura 11** (106), la RC determinada por citomorfología puede venir acompañada de una persistencia de ERM que conlleve a una recaída hematológica. Por otro lado, cabe destacar que incluso habiendo asumido una ERM negativa determinada según la sensibilidad de la tecnología utilizada, finalmente se puede producir una recaída de la enfermedad.

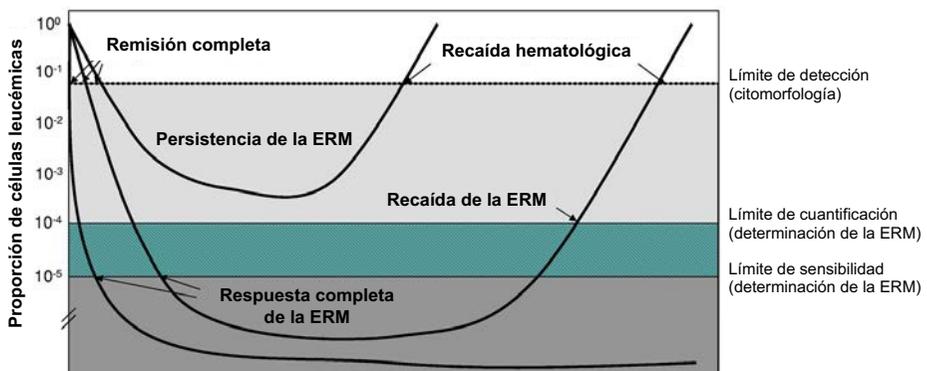


Figura 11. Términos de enfermedad residual medible en función de la sensibilidad de la tecnología utilizada. Adaptada de Brüggemann *et al.*, 2012 (106).

En la LLA de precursores B, la determinación de la ERM después del tratamiento de inducción y consolidación tiene un impacto pronóstico independiente muy importante, identificando pacientes con ERM positiva como un grupo de riesgo elevado y siendo utilizada en la toma de decisiones terapéuticas (107–109). En la LMA, debido a la heterogeneidad de la enfermedad (20), la ERM no es uno de los estándares para tomar decisiones terapéuticas (53). Si bien, debido a que ciertos estudios han demostrado la importancia de la ERM como factor pronóstico (110,111), se espera que la integración de los factores definidos en el diagnóstico y en la determinación de la ERM puedan ser informativos en las decisiones terapéuticas (112). En el MM, la ERM se incluye en los criterios de respuesta (113), habiéndose relacionado el estatus de la ERM con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de los pacientes (114,115).

Actualmente, la ERM se determina mediante protocolos basados en citometría de flujo multiparamétrica y tecnologías moleculares basadas en la PCR. Hay que mencionar que en los últimos años están emergiendo nuevas tecnologías como la PCR digital y la NGS, que también pueden utilizarse para la determinación de la ERM. Cada metodología difiere en su aplicabilidad y en su sensibilidad para detectar y cuantificar la ERM. No obstante, los protocolos para determinar la ERM tanto mediante tecnologías actuales como emergentes no han sido estandarizados, haciendo de su utilización clínica todavía un reto.

2.4.1. Tecnologías basadas en citometría de flujo multiparamétrica

Una vez se ha caracterizado el inmunofenotipo de las células malignas, y con el objetivo de monitorizar la evolución de la enfermedad mediante citometría de flujo, se diseñará un panel de marcadores que permita determinar la enfermedad residual medible. El umbral actual de determinación de positividad o negatividad de la ERM es del 0,1% para la LMA, 0,01% para la LLA-B y 0,001% para el MM (116–118). Por lo tanto, la sensibilidad de esta tecnología vendrá determinada en

función de la patología a monitorizar y oscilará entre 10^{-3} y 10^{-5} , pudiendo llegar hasta 10^{-6} .

La ventaja clave de la citometría de flujo multiparamétrica en la determinación de la ERM de estas enfermedades reside principalmente en la amplia aplicabilidad de esta tecnología, pudiéndose utilizar en más del 90% de los casos (62,119,120).

Para determinar la ERM en la **leucemia aguda** mediante CFM, se especificará en el momento del diagnóstico el inmunofenotipo asociado a la leucemia (*leukemia-associated immunophenotype*, LAIP), el cual proporcionará la información fenotípica de los blastos leucémicos. Con estos datos, se determinará la ERM post-terapia identificando células que presenten el LAIP especificado en el momento del diagnóstico (121,122). Sin embargo, esta aproximación asume la estabilidad inmunofenotípica de la leucemia después de la terapia y se ha demostrado en diversos estudios que los inmunofenotipos de las leucemias agudas pueden ser diferentes después del tratamiento (123), debido a la capacidad de diferenciación que conservan las células leucémicas inmaduras. Alternativamente, la ERM se puede determinar mediante otra aproximación existente basada en la detección de los inmunofenotipos “diferentes de lo normal” (*different-from-normal*, DfN). La aproximación DfN tendrá la ventaja de no necesitar un conocimiento previo del inmunofenotipo en el momento del diagnóstico y de tener en cuenta la inestabilidad inmunofenotípica de las leucemias, además de los posibles clones pre-leucémicos que podrían seleccionarse al someter a los pacientes a quimioterapia (124,125).

La sensibilidad de la CFM para la detección de la ERM en la LLA-B es de 10^{-4} y su aplicabilidad es superior al 90% (120). EuroFlow, un consorcio europeo de citometría de flujo e inmunofenotipado, ha publicado estudios realizados con el objetivo de estandarizar protocolos basados en esta tecnología. En estos, se detalla la implementación de paneles de 8 colores para la evaluación de la ERM

en la LLA-B con una sensibilidad $\leq 10^{-5}$ y aplicables en más del 98% de los pacientes (64). En la LMA, sin embargo, la determinación de la ERM mediante CFM tiene una sensibilidad de 10^{-3} y una aplicabilidad en más del 90% de los casos (62).

Para determinar la ERM en el **mieloma múltiple**, se deben identificar las células plasmáticas malignas y distinguirlas de las normales, de la misma manera que en el momento del diagnóstico. Debido a que las CPs malignas tienen un inmunofenotipo característico y fácilmente distinguible de las CPs normales, la determinación de la ERM mediante CFM se puede aplicar virtualmente en todos los pacientes (119). En los últimos años, nuevos estudios del consorcio EuroFlow han permitido incrementar la sensibilidad de la CFM para determinar la ERM en el MM, debido a la integración de más de 8 marcadores evaluados simultáneamente y el incremento del número de células analizadas, llegando a niveles de sensibilidad del orden de 10^{-6} . Estos estudios han sido validados para poder así implementar la estandarización de esta técnica a nivel clínico (51).

2.4.2. Tecnologías moleculares basadas en la PCR

La tecnología de la PCR cuantitativa a tiempo real puede servir para identificar, por una parte, reordenamientos genéticos clonales de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, y, por otra parte, reordenamientos o mutaciones de genes recurrentes asociados a la neoplasia hematológica.

Los reordenamientos de los segmentos V, D y J del *locus IGH* son eventos aleatorios producidos en el proceso de maduración de las células B. La transformación maligna resulta en células neoplásicas con reordenamientos de *IGH* clonales. Por lo tanto, los linfoblastos de la LLA-B y las CPs malignas del MM presentarán clonalidad en los reordenamientos de *IGH*. La RT-qPCR detecta y cuantifica estos reordenamientos permitiendo así la determinación de la ERM, debido a que únicamente se presentan en las células de origen B malignas. Para

poder detectar los reordenamientos clonales, se requiere diseñar oligonucleótidos alelo-específicos dirigidos a las células malignas del paciente. Esta tecnología presenta unos niveles de sensibilidad del orden de 10^{-5} - 10^{-6} (113) y un alto grado de estandarización para la LLA-B (126) y el MM (119). En contraste, al diseñarse oligonucleótidos alelo-específicos para cada paciente en el momento del diagnóstico, se pueden obviar subclones, indetectables en primera instancia, que posteriormente evolucionen. También se pueden producir fenómenos de hipermutación somática que no sean detectados mediante los oligonucleótidos alelo-específicos inicialmente diseñados para el seguimiento del paciente (127,128). Además, el uso de esta tecnología supone un proceso largo, laborioso y de coste elevado, siendo aplicable únicamente en el 60-70% de los casos.

La identificación de reordenamientos o mutaciones de genes recurrentes asociados a la enfermedad mediante RT-qPCR solo será aplicable en aquellos pacientes que presenten las alteraciones genéticas descritas para el estudio de la ERM. Por un lado, el reordenamiento *BCR-ABL* se produce en el 25% de las LLA-B de adulto (15). La detección de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* mediante RT-qPCR es relevante para el diagnóstico y también de gran importancia para el seguimiento de la ERM. Este procedimiento, aunque solo aplicable para este tipo de leucemia, es más sencillo de realizar y más eficiente en la determinación del estado de los pacientes que la determinación mediante CFM o por diseño de oligonucleótidos alelo-específicos para cada paciente (129). En la LMA, se usará esta metodología para determinar la ERM en aquellos pacientes que presenten los transcritos de fusión *PML-RARA*, presentes en un 10-15% de los pacientes de LMA (130), y *CBFB-MYH11* o *RUNX1-RUNX1T1*, que representan un 20% de las LMAs (131), ya que son unos predictores importantes de la recaída (132,133). Otras fusiones presentes en esta enfermedad, como *MLLT3-KMT2A*, no se monitorizarán por RT-qPCR debido a la reducida expresión de la fusión génica (134). La mutación de *NPM1*, presente en un tercio de los pacientes con LMA

(135), también será monitorizada mediante técnicas de RT-qPCR o secuenciación de Sanger, dado que esta mutación tiene asociado un gran impacto pronóstico (136,137), y, debido al elevado nivel de expresión del transcrito, su cuantificación mediante esta tecnología adquirirá una sensibilidad del orden de 10^{-6} . La presencia de otros genes mutados como *FLT3* o *KIT*, podrán ser también monitorizados mediante estas técnicas, pero siempre de forma complementaria a otras determinaciones (116). Por otro lado, el MM, al ser tan heterogéneo, no presenta mutaciones o reordenamientos de genes descritos para el seguimiento por RT-qPCR, por lo que la ERM no será determinada mediante este abordaje.

La PCR digital es una adaptación de la tecnología de RT-qPCR que permite una cuantificación absoluta de los ácidos nucleicos del transcrito que se necesita detectar, ya que no depende de curvas de calibración. Sin embargo, actualmente no se aplica en el diagnóstico clínico, siendo solamente utilizada a nivel de investigación (138–140).

2.4.3. Tecnologías de *Next Generation Sequencing*

Las tecnologías de secuenciación del ADN de nueva generación o de *high throughput* permiten la secuenciación paralela y repetida de millones de pequeños fragmentos de ADN para evaluar unos genes determinados e incluso el genoma completo (141).

Estas tecnologías podrían solventar ciertas desventajas que presentan la CFM y la RT-qPCR en la determinación de la ERM, como son la falta de estandarización, la sensibilidad, la limitada aplicabilidad y la subestimación de los procesos de evolución clonal e hipermutación somática. Por un lado, la estandarización de la NGS podría ser sencilla debido uso de oligonucleótidos consensuados, evitando el diseño de oligonucleótidos alelo-específicos por paciente. La sensibilidad de la técnica es de 10^{-6} , y aunque limitada del mismo modo por el número de células (142,143), la detección de la ERM presenta una elevada resolución. Y finalmente,

al poder evaluarse el genoma completo, se tendrían en cuenta los procesos de evolución clonal o hipermutación somática que pudieran presentarse, ya que la NGS detectaría los subclones minoritarios y los cambios asociados, por lo que se podrían evaluar los reordenamientos de *IGH* para las neoplasias de células B (MM y LLA-B). En el caso de la LMA, esta tecnología sería solamente aplicable cuando la entidad presentara alteraciones genéticas recurrentes (40-50% de los pacientes) (116).

No obstante, esta tecnología no ha sido todavía implementada en la rutina clínica habitual debido a que presenta ciertas limitaciones, como la necesidad de una infraestructura compleja, de personal experto para interpretar los datos, así como un elevado coste, y el tiempo requerido para realizar el procedimiento completo. También es indispensable el análisis de especímenes del paciente antes del tratamiento y no demuestra eficacia en el caso de especímenes aplásicos.

2.5. Pronóstico y clasificación según el riesgo

Las técnicas de diagnóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas permiten establecer unas características determinadas de la entidad para así poder establecer el pronóstico de la enfermedad. Además de las características de la entidad, existen factores del propio paciente que también tendrán una influencia en el curso de la enfermedad, así como los factores determinados después del diagnóstico y relacionados con la respuesta del paciente.

2.5.1. Factores pronósticos relacionados con el paciente

La edad avanzada en el momento del diagnóstico es un factor pronóstico desfavorable tanto en la LMA, en la LLA-B como en el MM. No obstante, factores como el estado general, definido por la escala *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) (144), la salud general y otras comorbilidades modularán el efecto

de la edad en cuanto a la tolerancia al tratamiento (53,54,145). Además, en la LMA, el hecho de tener antecedentes de una neoplasia hematológica previa, o una LMA relacionada con el tratamiento, está asociado con un pronóstico adverso (53).

2.5.2. Factores pronósticos relacionados con la entidad

Las alteraciones genéticas que pueda manifestar la LMA suponen un factor pronóstico de gran importancia. Diversos estudios (146–148) han analizado el riesgo de tener ciertas mutaciones genéticas y/o translocaciones cromosómicas, y han determinado su impacto pronóstico. En las últimas recomendaciones de la red europea ELN (53), se publica un sistema de estratificación de riesgo basado en la genética, donde se establecen tres categorías de riesgo: favorable, intermedio o adverso (**Tabla 12**). Cabe destacar que el reordenamiento *PML-RARA*, característico que la leucemia promielocítica aguda, no entra en este sistema de estratificación de riesgo, dado que la entidad se revisa en unas recomendaciones de la ELN específicas (149) y actualizadas recientemente en su última versión (150).

En la LLA-B, el número de leucocitos en el diagnóstico será un factor pronóstico independiente, siendo un número superior a $30 \times 10^9 /L$ un indicador de mal pronóstico analizado en diversos estudios (151–153). La infiltración de células neoplásicas en el sistema nervioso central también se considera un factor de pronóstico adverso, aunque no independiente (154). Los avances en los conocimientos de las características citogenéticas y genéticas de la LLA-B han servido para poder definir el pronóstico de la enfermedad en función del tipo de alteraciones específicas que se determinen en el momento del diagnóstico. En la **Tabla 13** se presentan las alteraciones citogenéticas de mayor importancia en la LLA-B de las cuales se ha podido determinar su impacto pronóstico (86,87).

Tabla 12. Estratificación de riesgo de la LMA de la European LeukemiaNet según la genética (2017). Adaptada de Döhner *et al.*, 2017 (53).

Categoría de riesgo	Alteración genética
Favorable	<p>t(8;21)(q22;q21); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p><i>NPM1</i> mutada sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i>^{low 2}</p> <p>Mutación bialélica de <i>CEBPA</i></p>
Intermedio	<p><i>NPM1</i> mutada y <i>FLT3-ITD</i>^{high 2}</p> <p><i>NPM1 wild type</i> sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i>^{low} (sin alteraciones genéticas de riesgo adverso)</p> <p>t(9;11)(p21.3;123.3); <i>MLLT3-KMT2A</i></p> <p>Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas</p>
Adverso	<p>t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>t(v;11q23.3); translocaciones de <i>KMT2A</i></p> <p>t(9;22); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i></p> <p>-5 o del(5q); -7, -17/abn(17p)</p> <p>Cariotipo complejo³; Cariotipo monosómico⁴</p> <p><i>NPM1 wild type</i> y <i>FLT3-ITD</i>^{high}</p> <p><i>RUNX1, ASXL1</i> o <i>TP53</i> mutados</p>

² *Low*, ratio alélica moderada (< 0,5); *High*, ratio alélica elevada (≥ 0,5).

³ Tres o más alteraciones cromosómicas no relacionadas en ausencia de las designadas translocaciones o inversiones recurrentes de la OMS (15).

⁴ Presencia de una monosomía única (a excepción de la pérdida de los cromosomas X o Y) en asociación con al menos una monosomía adicional o una alteración cromosómica estructural.

Tabla 13. Biomarcadores genéticos de la LLA-B y su categoría de riesgo. Adaptada de Moorman, 2016 (86) y Iacobucci y Mullighan, 2017 (87).

Categoría de riesgo	Alteración genética
Favorable	Elevada hiperdiploidía ⁵ t(12;21); <i>ETV6-RUNX1</i>
Intermedio	t(1;19); <i>TCF3-PBX1</i> Translocaciones de <i>IGH</i> Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
Adverso	t(v;11q23.3); translocaciones de <i>KMT2A</i> t(9;22); <i>BCR-ABL1</i> t(17;19); <i>TCF3-HLF</i> Cariotipo complejo ⁶ ; Hipodiploidía moderada; casi haploidía ⁷ iAMP21

Para poder determinar la categoría de riesgo en el MM, se tendrán en cuenta otros factores pronósticos de la enfermedad, debido a la elevada heterogeneidad a nivel citogenético y genético que presenta la entidad. El primer marcador pronóstico determinado en MM fue el grado de signos CRAB que pudieran presentar los pacientes (155). Posteriormente, los niveles de β 2-microglobulina y albúmina se incluyeron como factores pronósticos, para poder así establecer el sistema internacional de estadificación (*International Staging System, ISS*) del MM (156). El ISS revisado (*revised ISS, R-ISS*) por el Grupo de Trabajo Internacional del Mieloma (*International Myeloma Working Group, IMWG*) (88) incluye, además, la citogenética de riesgo elevado y la presencia de unos elevados niveles séricos de lactato deshidrogenasa (**Tabla 14**).

⁵ Más de 50 cromosomas.

⁶ Cinco o más alteraciones cromosómicas.

⁷ Pérdida cromosómica masiva (entre 30-39 cromosomas y menos de 30 cromosomas, respectivamente).

Tabla 14. ISS e ISS revisado del IMGW para el mieloma múltiple. Adaptada de Palumbo *et al.*, 2015 (88).

Estadio ISS	Alteración genética
ISS I	β 2-microglobulina sérica < 3,5 mg/L; albúmina sérica \geq 3,5 g/dL
ISS II	Diferente al grado ISS I y III
ISS III	β 2-microglobulina sérica > 5,5 mg/L
R-ISS I	β 2-microglobulina sérica < 3,5 mg/L; albúmina en suero \geq 3,5 g/dL y ausencia de alteraciones genéticas de riesgo elevado (del(17p) y/o t(1;14) y/o t(14;16))
R-ISS II	Diferente al grado R-ISS I y III
R-ISS III	β 2-microglobulina sérica > 5,5 mg/L y presencia de alteraciones genéticas de riesgo elevado (del(17p) y/o t(1;14) y/o t(14;16)) o LDH sérica elevada

2.5.3. Factores pronósticos relacionados con la respuesta

Como se ha explicado en apartados anteriores, a partir de los factores pronósticos propios del paciente y de la entidad en el momento del diagnóstico, se clasifican las entidades según el riesgo asociado. En primera instancia, estos modelos de estratificación aportan una idea general del estado de la enfermedad para poder iniciar el tratamiento de los pacientes. Posteriormente, se deberán tener en cuenta los factores relacionados con la respuesta de la enfermedad, manifestada a raíz del tratamiento, para poder reevaluar y determinar la terapia adecuada.

De los factores pronósticos más importantes relacionados con la respuesta, se encuentra el estado de la ERM, siendo un factor pronóstico independiente de respuesta en la LLA-B y el MM demostrado en diversos estudios (63,115,157,158).

Tabla 15. Criterios de respuesta de la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfoblástica aguda de precursores B y el mieloma múltiple. Adaptada de Döhner *et al.*, 2017 (53); Hoelzer *et al.*, 2016 (54) y Kumar *et al.*, 2016 (113).

Leucemia mieloide aguda	
Categoría	Definición
Remisión completa sin ERM	Criterios de respuesta completa con ERM negativa determinada mediante RT-qPCR o CFM
Remisión completa	Blastos en médula ósea < 5%; ausencia de blastos circulantes y blastos con bastones de Auer; ausencia de enfermedad extramedular; recuento absoluto de neutrófilos $\geq 1,0 \times 10^9/L$; recuento de plaquetas $\geq 100 \times 10^9/L$
Remisión completa con recuperación hematológica incompleta	Criterios de RC a excepción de neutropenia residual (< $1,0 \times 10^9/L$) o trombocitopenia (< $100 \times 10^9/L$)
Estado morfológico libre de leucemia	Blastos en médula ósea < 5%; ausencia de blastos circulantes y blastos con bastones de Auer; ausencia de enfermedad extramedular; no recuperación hematológica
Remisión parcial	Criterios de RC; blastos en médula ósea entre el 5% y el 25% y disminución de los blastos del 50% respecto al pre-tratamiento
Leucemia linfoblástica aguda de precursores B	
Categoría	Definición
Remisión completa	Blastos en médula ósea no detectables por citomorfología (< 5%)
Remisión molecular completa / negatividad para la ERM	Paciente en RC con ERM no detectable mediante métodos moleculares
Respuesta molecular/ERM	Paciente en RC, ERM negativa determinada mediante CFM
Fallo molecular / ERM positiva	Paciente en RC, con ERM positiva determinada mediante CFM y RT-qPCR

Tabla 15 (continuación). Criterios de respuesta de la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfoblástica aguda de precursores B y el mieloma múltiple. Adaptada de Döhner *et al.*, 2017 (53); Hoelzer *et al.*, 2016 (54) y Kumar *et al.*, 2016 (113).

Mieloma múltiple	
Categoría	Definición
Respuesta completa molecular	RC con ERM negativa determinada mediante RT-qPCR
Respuesta completa inmunofenotípica	RC estricta con ausencia de células plasmáticas aberrantes fenotípicamente analizadas mediante CFM
Respuesta completa estricta	RC con ratio de cadenas libres normal y ausencia de células plasmáticas determinada mediante inmunohistoquímica o citometría de flujo
Respuesta completa	Proteína M sérica y en orina negativa mediante inmunofijación; desaparición de plasmacitomas y células plasmáticas en médula ósea $\leq 5\%$
Muy buena respuesta parcial	Proteína M sérica y en orina detectable mediante inmunofijación pero no mediante electroforesis o reducción $\geq 90\%$ de la proteína M sérica y $< 100\text{mg}$ en orina
Respuesta parcial	Reducción $\geq 50\%$ de la proteína M sérica y reducción $> 90\%$ o $< 200\text{mg}$ en orina

El seguimiento de la enfermedad dará lugar a unos criterios de respuesta específicos para cada entidad (**Tabla 15**). Según estos criterios, se decidirá el tratamiento a seguir por cada paciente. Cabe destacar que el estado de la ERM en la LMA aún no se tiene en cuenta para la determinación del criterio de respuesta. Sin embargo, en las últimas recomendaciones de la ELN (53), se propone la categoría RC_{ERM-} , especificada en la **Tabla 15**. Esta nueva categoría sería de gran utilidad para poder distinguir aquellos pacientes en RC con ERM positiva de aquellos con ERM negativa, ya que diversos estudios han demostrado diferencias significativas en la incidencia de recaída de la LMA entre los pacientes de ambos grupos (112,159,160).

2.6. Tratamiento

Una vez diagnosticada, caracterizada y clasificada la neoplasia, se establecerá el tratamiento más adecuado que recibirá paciente. En el caso de la LMA, la LLA-B y el MM, por lo general, el tratamiento consistirá inicialmente en una inducción basada en quimioterapia. Si el paciente no es elegible para este tipo de tratamiento se procederá a realizar medidas terapéuticas de soporte.

El esquema general de tratamiento consiste en una fase inicial de **inducción**, una fase de **consolidación**, que puede incluir un trasplante autólogo o alogénico de progenitores hematopoyéticos, y una fase de **mantenimiento**, en caso que sea recomendable. Este esquema puede variar según la enfermedad y sus características específicas, el estado del paciente y la respuesta al tratamiento.

2.6.1. Principales esquemas de tratamiento

2.6.1.1. Tratamiento general de la leucemia mieloide aguda

En los últimos años, el enfoque del tratamiento de la LMA (**Figura 12**) no ha experimentado cambios sustanciales. En este enfoque, se excluye la leucemia promielocítica aguda, ya que entrará en otros esquemas de tratamiento (161).

En primera instancia, se evalúa al paciente para determinar si es candidato a quimioterapia intensiva. La edad será un condicionante importante, así como también lo será su estado general (162–164). Si el paciente resulta no ser candidato, se le administrará quimioterapia a bajas dosis o, alternativamente, medidas terapéuticas de soporte.

La **inducción** con altas dosis de quimioterapia consiste generalmente en la administración de antraciclinas durante tres días (por ejemplo, idarubicina o daunorubicina) seguida de siete días de administración de citarabina. En caso de que el paciente no sea candidato a quimioterapia intensiva, se le administrará citarabina a bajas dosis (53). En los protocolos CETLAM12>70, del Grupo

Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM), la citarabina a bajas dosis se combina con fludarabina (165). La administración de azacitidina ha sido evaluada en ensayos clínicos y comparada con los regímenes actuales de bajas dosis (166). Los pacientes sometidos a quimioterapia a bajas dosis manifiestan respuestas insatisfactorias, por lo que, generalmente, se valora la posibilidad de administrar terapias evaluadas mediante ensayos clínicos con el objetivo de poder mejorar la respuesta al tratamiento.

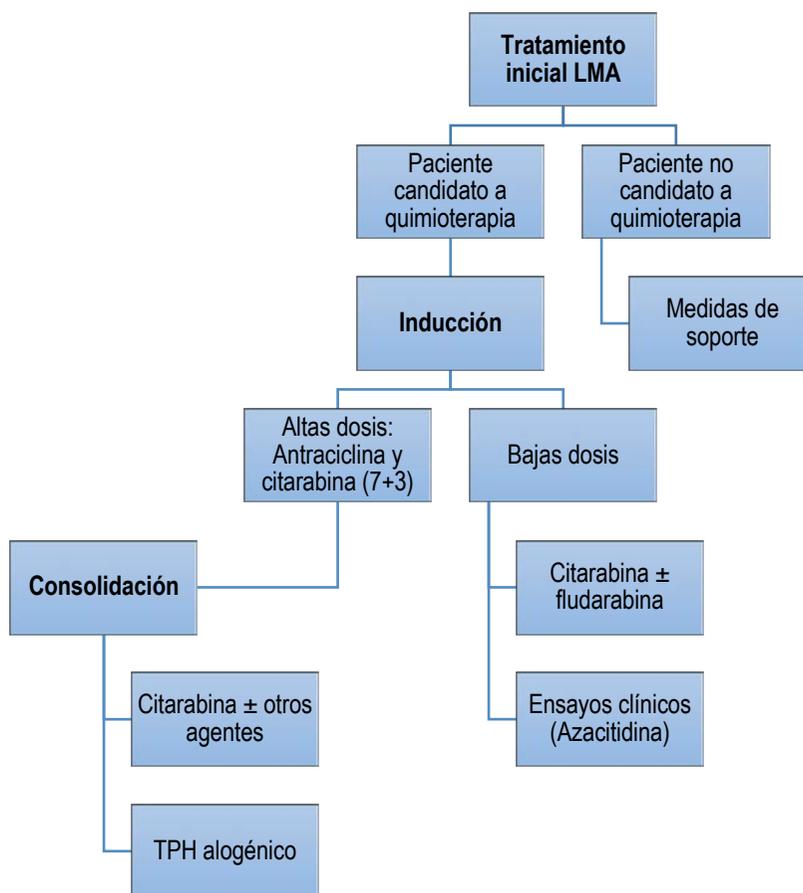


Figura 12. Esquema de tratamiento general para la leucemia mieloide aguda (53).

Una vez alcanzada la remisión del paciente, se inicia la fase de **consolidación**. Esta fase consiste en la administración de citarabina en combinación o no con otros agentes. Para aquellos pacientes elegibles, se procederá a realizar una terapia de acondicionamiento o mieloablativa seguida de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico.

La fase de **mantenimiento** no forma parte de los esquemas de tratamiento estándares de la LMA, debido a la falta de evidencia de beneficio que este tratamiento pueda suponer (167).

2.6.1.2. Tratamiento general de la leucemia linfoblástica aguda de precursores B

El esquema de tratamiento general de la LLA-B (**Figura 13**) constará de una **pre-fase** antes de la fase de inducción. En esta pre-fase se administran corticoesteroides (prednisona o dexametasona) en monoterapia o en combinación con otros fármacos (por ejemplo, vincristina o ciclofosfamida). La pre-fase permite una reducción segura de la leucemia mientras se obtienen los resultados de los análisis citogenéticos y moleculares. Posteriormente, se inicia la fase de **inducción** con el objetivo de alcanzar la RC, a poder ser con negatividad para la ERM, disminuyendo así la probabilidad de recaída (168). La mayoría de regímenes de inducción consisten en la administración de vincristina, corticoesteroides y antraciclinas (por ejemplo, idarubicina o daunorubicina). La fase de **consolidación** consistirá en la administración de elevadas dosis de metotrexato en combinación con asparaginasa a dosis intermedias para pacientes de riesgo moderado o intermedio y a dosis elevadas para pacientes con riesgo elevado. En esta fase del tratamiento, existe riesgo de recaída en pacientes de riesgo elevado o que presenten ERM positiva (169), motivo por el cual se recomienda someter a los pacientes a un TPH alogénico. En cambio, si la ERM es negativa o el riesgo de los pacientes es estándar o moderado, se procederá a

la fase de **mantenimiento**. Esta fase consiste en la administración de 6-mercaptopurina y metotrexato. La omisión de la terapia de mantenimiento empeora el pronóstico de los pacientes, sobretodo en la LLA pre-B (54). A modo profiláctico, se administra adicionalmente en todas las fases un tratamiento por vía intratecal consistente en metotrexato, citarabina y esteroides con el objetivo de evitar la infiltración de las células leucémicas en el sistema nervioso central (54).

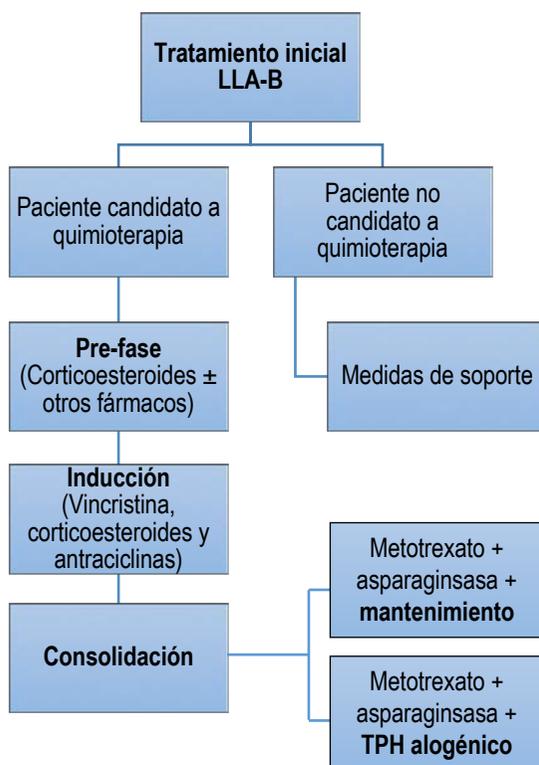


Figura 13. Esquema de tratamiento general para la leucemia linfoblástica aguda de precursores B (54).

2.6.1.3. Tratamiento general del mieloma múltiple

El tratamiento general del MM (Figura 14) estará condicionado por la elegibilidad de los pacientes para ser sometidos a un TPH autólogo. Cuando los pacientes no sean elegibles a TPH, en la fase de **inducción** se administrará bortezomib o talidomida combinado con melfalán y prednisona o lenalidomida y dexametasona a dosis moderadas.

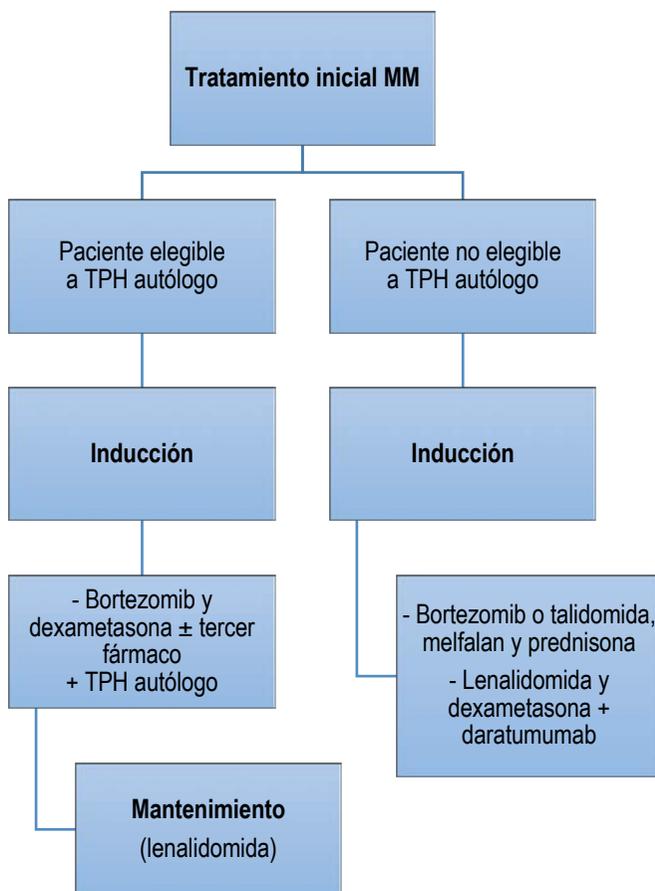


Figura 14. Esquema de tratamiento general para el mieloma múltiple (56).

En pacientes no elegibles a TPH, se ha aprobado recientemente la administración de daratumumab como primera línea de tratamiento en combinación con los

lenalidomida y dexametasona debido a la demostrada mejora en la disminución del riesgo de progresión (170). Mediante ensayos clínicos se están evaluando otras combinaciones de fármacos.

En pacientes jóvenes en buen estado general, se realiza una **inducción** seguida de un TPH autólogo. Esta inducción consiste en la administración de dosis elevadas de bortezomib y dexametasona. La administración de un tercer fármaco en esta fase, como la talidomida, se está evaluando mediante ensayos clínicos, mostrando mejores resultados (171) en comparación a las respuestas obtenidas mediante la administración de los esquemas actuales de tratamiento.

Con posterioridad al TPH autólogo, se procede a la fase de **mantenimiento** basada en la administración de lenalidomida. En pacientes no elegibles a TPH, este mantenimiento no está recomendado. La fase de **consolidación** también se omite en las recomendaciones (56), puesto que no hay evidencia de su aplicación sistemática. Cabe señalar que el tratamiento de soporte en el mieloma múltiple será de gran utilidad para manejar los signos CRAB que pueda manifestar el paciente.

2.6.2. El trasplante de progenitores hematopoyéticos

En el tratamiento de una neoplasia hematológica, así como de otras enfermedades, el trasplante de progenitores hematopoyéticos es uno de los procedimientos considerados potencialmente curativos (172). Concretamente, el TPH ha demostrado ser la mejor oportunidad para incrementar la supervivencia libre de enfermedad en la leucemia aguda y el mieloma múltiple (173–175), llegando a curar a determinados grupos de pacientes. El TPH es un procedimiento basado en la infusión intravenosa de progenitores hematopoyéticos para reestablecer el sistema hematopoyético e inmunitario del paciente. Previamente a la infusión de los progenitores, el paciente es sometido a un tratamiento de acondicionamiento para erradicar los componentes celulares del sistema

hematopoyético del paciente, así como las células neoplásicas. Los progenitores infundidos pueden proceder del propio paciente (TPH autólogo) o de un donante (TPH alogénico) (176). En relación al TPH alogénico, el donante preferiblemente debe ser un hermano/a histocompatible para los *loci* de HLA o, en su defecto, un donante HLA-idéntico no emparentado, identificado en el registro de donantes de médula ósea (177). Para aquellos pacientes sin donantes HLA-idénticos, existen tres fuentes alternativas de progenitores hematopoyéticos: [1] donantes HLA-no idénticos, debido a la ausencia de compatibilidad para alguno de los *loci* de HLA; [2] sangre de cordón umbilical; y [3] donantes haploidénticos emparentados, siendo compatibles únicamente para un haplotipo de HLA (177). Para reducir los efectos de la disparidad de los *loci* de HLA en donantes haploidéntidos, se procede a la depleción de las células T, a la selección positiva de los progenitores CD34⁺, entre otras aproximaciones (178).

Inicialmente, los progenitores hematopoyéticos, caracterizados por la expresión de CD34 y la expresión débil de CD45, se obtenían mediante punciones en la MO de ambas crestas ilíacas posteriores del donante. No obstante, este procedimiento actualmente se ha reemplazado en el trasplante autólogo y en la mayoría de trasplantes alogénicos por la obtención de los progenitores a partir de sangre periférica movilizada. Puesto que los progenitores hematopoyéticos representan una proporción muy minoritaria de las células circulantes en sangre periférica, previamente a la obtención de estas, debe realizarse un proceso de movilización de los progenitores desde la MO a la sangre periférica mediante la administración de factores estimuladores de colonias de granulocitos (*granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) que provocan la proliferación de neutrófilos y la secreción de proteasas. Las proteasas degradarán las proteínas que anclan las células madre en la MO, liberándolas de este modo hacia la circulación periférica. También se administran otros agentes movilizadores como plerixafor y

ciclofosfamida con la misma finalidad. Una vez movilizados, los progenitores se concentrarán mediante el procedimiento de leucoaféresis (179).

En la **leucemia aguda**, el TPH preferible será de tipo alogénico (53,54). Este será recomendable cuando el riesgo del trasplante sea menor al beneficio que pueda suponer. El riesgo dependerá del estado del paciente, de las características del donante y de los factores propios del trasplante. En la LMA, los pacientes de riesgo favorable no estarán indicados en primera instancia para el TPH. En cambio, en pacientes de riesgo adverso, el TPH será recomendado post-remisión para reducir el riesgo de recaída. La ERM servirá de guía al manejo. Los pacientes con ERM positiva podrán ser candidatos de recibir TPH alogénico antes experimentar una probable recaída. En LLA-B, las recomendaciones actuales indican realizar el TPH cuando la citogenética sea de riesgo elevado, cuando la ERM post-consolidación sea positiva o frente a recaídas de la enfermedad. Cabe tener en cuenta que en el trasplante alogénico, al infundirse células de un donante, los linfocitos de su sistema inmunitario reaccionan contra el receptor, causando inflamación de los tejidos (piel, hígado e intestino) y provocando así la enfermedad del injerto contra el huésped (**Figura 15**). Esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad del trasplante alogénico, aunque para combatirla se pueden administrar diversos tratamientos basados en corticoides (180,181). Por otro lado, se ha demostrado que esta reacción reduce asimismo la incidencia de recaídas post-trasplante, ya que permite erradicar células tumorales residuales después del acondicionamiento (182), generando así el efecto del injerto contra la leucemia.

En el mieloma múltiple, el TPH preferible será de tipo autólogo (56). Los candidatos serán pacientes menores de 65 años o menores de 70, siempre y cuando estén en buen estado general. Estos pacientes se someten a una fase de inducción a altas dosis y posteriormente los progenitores hematopoyéticos se

recogen desde la sangre periférica movilizada. Una vez obtenidos, se realiza un régimen de acondicionamiento, principalmente basado en la administración de melfalán, y la posterior infusión de los progenitores.

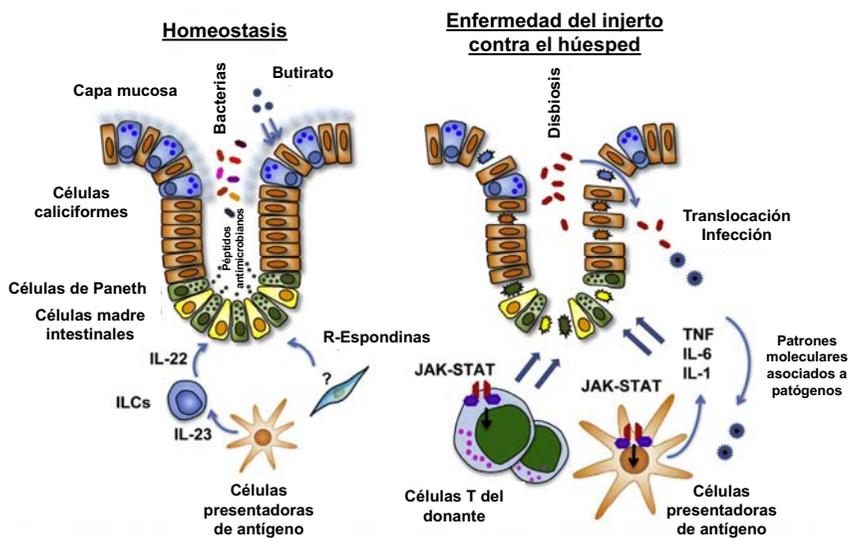


Figura 15. Proceso inmunitario en condiciones de homeostasis y en enfermedad del injerto contra el huésped. Adaptada de Teshima *et al.*, 2016 (181).

2.6.3. Terapias emergentes

Tanto la leucemia aguda como el mieloma múltiple constituyen enfermedades de una gran importancia para la investigación y exploración de nuevas terapias. El incremento del conocimiento acerca de estas enfermedades, tanto a nivel inmunofenotípico como citogenético y genético, así como del microambiente celular, permite desarrollar terapias que se han de validar previamente en ensayos clínicos para poder después ser aplicadas en los esquemas de tratamiento. A continuación, se presentan algunas de las nuevas terapias desarrolladas:

2.6.3.1. Terapias moleculares y epigenéticas

Terapias moleculares: Los inhibidores de FLT3, como la midostaurina y el sorafenib, se utilizan en pacientes de LMA con mutaciones en *FLT3* con resultados variables en ensayos clínicos (183–186). Los pacientes de LLA-B con la translocación *BCR-ABL1*, se tratan con TKIs como el imatinib combinado con quimioterapia, mostrando mejoras en las tasas de RC (187, 188). Estos inhibidores también se utilizan en el tratamiento de pacientes *BCR-ABL like* o en LMA con *BCR-ABL1*. Actualmente, se están desarrollando TKIs de nueva generación con buenos resultados (189). También se pueden encontrar otras terapias dirigidas a JAK/STAT, mTOR, o BCL2 con resultados esperanzadores (190–193).

Terapias epigenéticas: Se están desarrollando terapias para pacientes con mutaciones en genes modificadores epigenéticos (194). Entre ellos, se encuentran los inhibidores de IDH1 y IDH2, cuyos genes se encuentran mutados frecuentemente en LMA (195), que han demostrado remisiones duraderas en pacientes en recaída o refractarios (196), o inhibidores de ADN metiltransferasa para reordenamientos de *KMT2A* (197), evaluándose su administración como agente único mediante ensayos clínicos y mostrando unos resultados preliminares de eficacia moderada (198).

2.6.3.2. Inmunoterapias

Anticuerpos monoclonales: Se han desarrollado gran variedad de anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra determinados antígenos expresados en las células neoplásicas. Para la LMA, se han desarrollado anticuerpos contra CD33 y CD123 (199,200). En la LLA-B, se está aplicando rituximab, dirigido a CD20, con resultados prometedores (201), así como anticuerpos contra CD19, tales como blinatumomab (202) y contra CD22, como el inotuzumab ozogamicina (203). Para el MM, daratumumab, dirigido a CD38, fue aprobado para ser

administrado a pacientes ya tratados (204) e investigado y aprobado en el año 2018 como terapia de primera línea (170,205).

CAR-T: Los receptores de antígeno quiméricos (*chimeric antigen receptor*, CAR) son proteínas de fusión que incorporan dominios de reconocimiento de antígeno y dominios de señalización de células T (**Figura 16**) (206). Generalmente, las células T del paciente son modificadas genéticamente para reconocer antígenos determinados.

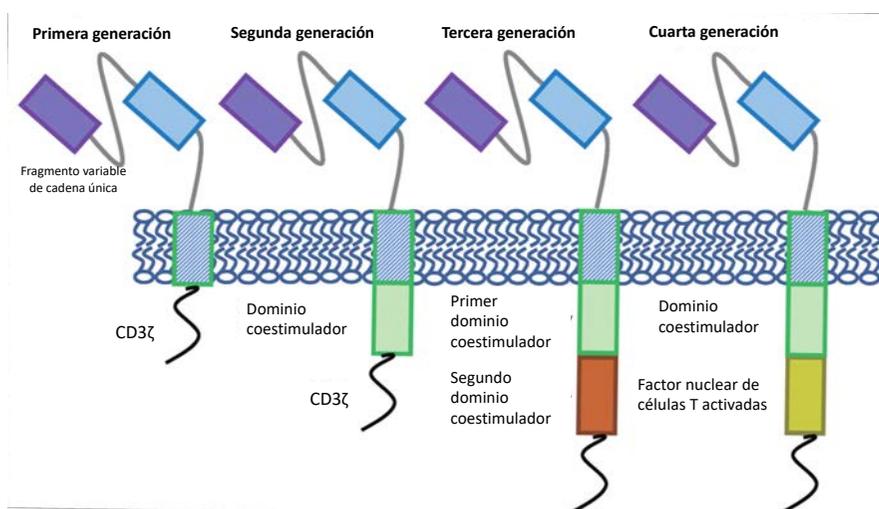


Figura 16. Generaciones de CAR-Ts y sus componentes. Adaptada de Wang *et al.*, 2018 (206).

En la LLA-B, se aprobó en el año 2017 un CAR-T dirigido a CD19 para el uso en pacientes menores de 25 años con enfermedad refractaria o en recaída. En adultos, se está aplicando en ensayos clínicos con resultados prometedores (207–209). También se han desarrollado y se están evaluando CAR-Ts dirigidos a CD22 para pacientes refractarios a la terapia con CD19-CAR-Ts (210). En la LMA, los CAR-Ts dirigidos a CD33 y CD123 están siendo utilizados en ensayos pre-clínicos

y clínicos en fases iniciales (211,212). En el MM, los ensayos están enfocados a la evaluación de CAR-Ts dirigidos al antígeno de maduración de células B (*B cell maturation antigen*, BCMA), expresado exclusivamente en células B en el proceso de diferenciación a células plasmáticas. Los primeros ensayos han obtenido también resultados prometedores (213,214).

3. MECANISMOS DE REFRACTARIEDAD DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

En las últimas décadas, se han producido múltiples avances en el conocimiento de las neoplasias hematológicas que han supuesto una serie de mejoras en relación al diagnóstico, manejo y tratamiento estas enfermedades, permitiendo de este modo incrementar la supervivencia global de los pacientes de forma significativa.

Sin embargo, uno de los mayores problemas y causas de mortalidad tanto en la leucemia aguda como en el mieloma múltiple es la recaída, producida después de haber conseguido la RC, o la refractariedad a la terapia. En esta situación, las opciones terapéuticas que se aplican a los pacientes son las siguientes: [1] volver a administrar las terapias iniciales; [2] aplicar terapias alternativas evaluadas en ensayos clínicos; y [3] valorar la posibilidad de proceder a un TPH con tal de poder erradicar la enfermedad (53,54,56).

Conocer los mecanismos de refractariedad de las enfermedades hematológicas es de gran relevancia para poder desarrollar nuevas terapias y poder predecir el riesgo de recaída o refractariedad de la enfermedad en el momento del diagnóstico. En los siguientes apartados, se comentarán algunos mecanismos estudiados relacionados con la refractariedad al tratamiento y que han sido objeto de investigación en la presente Tesis Doctoral.

3.1. Heterogeneidad intratumoral

La heterogeneidad intratumoral se define como la presencia de variaciones a nivel genético, fenotípico y funcional de las células que conforman un tumor. Diversos estudios ya pusieron de manifiesto en el pasado la existencia de esta heterogeneidad (215–219) y cada vez de forma más inequívoca gracias al desarrollo de la NGS y al análisis de célula única (220–222). Esta diversidad existente en el tumor es una de las principales causas de la refractariedad al tratamiento del cáncer, ya que las células tumorales responden a la terapia de manera diferente (223). Para explicar la causa de la existencia de la heterogeneidad intratumoral tanto en tumores sólidos como en leucemias y mielomas, existen dos modelos principales: [1] el modelo de **célula madre tumoral** (*cancer stem cell*, CSC) y [2] el modelo de **evolución clonal** (Figura 17) (224).

El **modelo de célula madre tumoral** (Figura 17a) postula que en una masa tumoral se encuentran poblaciones minoritarias de células capaces de desarrollar nuevamente el tumor (82,225) y con características de autorenovación y diferenciación (226). La propia masa tumoral puede estar formada por varios tipos celulares distintos fenotípicamente y organizados jerárquicamente, de la misma forma que en la jerarquía de los tejidos sanos, conformando así la heterogeneidad intratumoral. En el caso de la leucemia, estas células son denominadas células madre leucémicas. El primer estudio experimental de CSCs fue publicado por Bonet y Dick en el año 1997 (82), donde aislaron LSCs de LMA según el fenotipo CD34⁺/CD38⁻ y demostraron que esta subpoblación iniciaba la leucemia en ratones inmunodeficientes.

Las CSCs son diferentes según el tipo de tumor (227) y existen diversidad de métodos para detectarlas (228,229). Estos métodos pueden ser funcionales,

fenotípicos y moleculares. No obstante, su determinación supone todavía un desafío dado que su caracterización no está definida completamente.

En la leucemia mieloide aguda, las LSCs se identifican según el inmunofenotipo CD34⁺/CD38⁻, pero también se han explorado otros fenotipos asociados a las LSCs (230). Estas células son especialmente resistentes a las terapias debido a la sobreexpresión de genes de resistencia a fármacos y a su estado quiescente, que reduce los efectos de los tratamientos citotóxicos (231,232). Diversos estudios han demostrado el papel crítico de las LSCs en el pronóstico de la LMA (233–238), siendo la frecuencia de LSCs de fenotipo CD34⁺/CD38⁻ y de otros fenotipos determinada en el diagnóstico y remisión completa un factor pronóstico de supervivencia global e incidencia de recaída (239). En la LLA-B, las LSCs no se han definido inmunofenotípicamente ya que se han explorado diversos fenotipos que podrían iniciar la LLA-B (240–242). En mieloma múltiple se propone la existencia de varios tipos de CSCs. Por un lado, las CSCs quiescentes, que actúan como iniciadoras de mieloma, y por otro lado, las CSCs proliferativas, conformando así la heterogeneidad de las células plasmáticas aberrantes (243).

El modelo de evolución clonal (Figura 17b) postula que en un propio tumor se producen mutaciones genéticas diferentes, tanto de forma lineal como ramificada, generando de este modo subclones de características distintas y, por lo tanto, contribuyendo a la heterogeneidad intratumoral. Cuando se aplica el tratamiento, los subclones resistentes sobreviven, son seleccionados y proliferan posteriormente. Una de las preguntas importantes acerca de las mutaciones es conocer si se producen independientemente confiriendo al tumor una ventaja adaptativa, en cuyo caso la mutación tendría un carácter pre-adaptativo, o si, por el contrario, las mutaciones se producen como consecuencia de una adaptación de las células tumorales al ambiente, en cuyo caso la mutación tendría un carácter post-adaptativo. Tal y como postularon Luria y Delbrück en el año 1943 (244) con

sus estudios realizados en bacterias, en el caso de las neoplasias hematológicas la mayoría de subclones ya existe en el momento del diagnóstico, por lo tanto, las mutaciones producidas son pre-adaptativas. La evolución clonal ha sido estudiada sobretodo en la leucemia linfoblástica aguda de precursores B (245), mediante el análisis de muestras pareadas de LLA-B en el diagnóstico y recaída, observándose que el clon dominante era distinto (100,246). Otros estudios hechos en LMA y MM también han revelado la existencia de este proceso de evolución clonal (247–249).

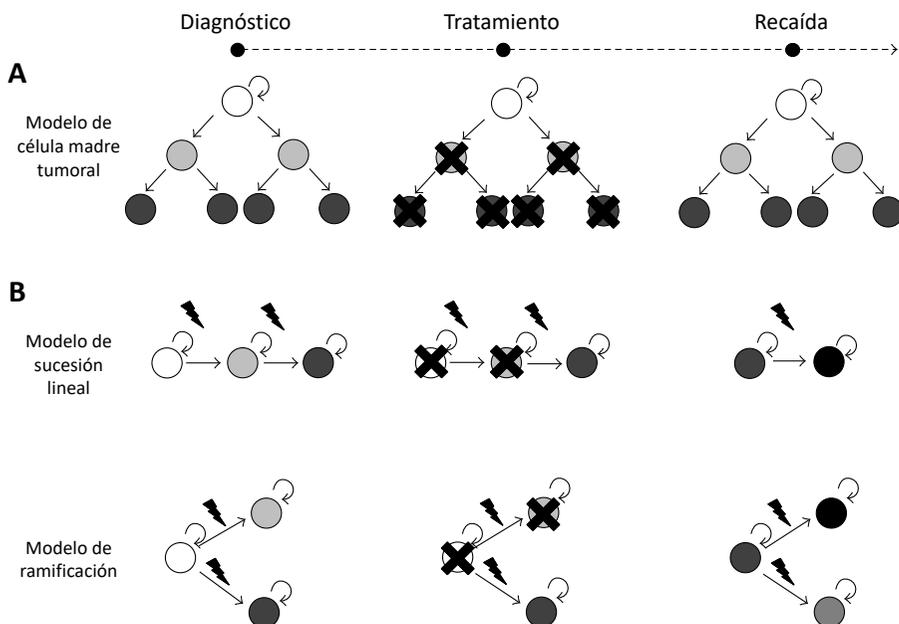


Figura 17. Modelos de heterogeneidad intratumoral y su escape al tratamiento. (A) Modelo de célula madre tumoral. (B) Modelos de evolución clonal (sucesión lineal y ramificación). Adaptada de Lang *et al.*, 2015 (224).

3.2. Supresión inmunitaria

La supresión inmunitaria por parte de las células neoplásicas y del microambiente celular es otro de los mecanismos de refractariedad de la neoplasia hematológica, así como de otros tipos de tumores, contribuyendo a su progresión (250). Existen

diversas vías por las cuales las neoplasias alteran el normal funcionamiento del sistema inmunitario del paciente. Su estudio y detección será fundamental para poder descubrir dianas terapéuticas y así mejorar los tratamientos actuales.

En rasgos generales, uno de los mecanismos de acción del sistema inmunitario consiste en regular señales positivas y negativas, prevenir enfermedades y minimizar la autoinmunidad. Además, el sistema inmunitario puede identificar, gracias a la expresión aberrante de antígenos, células potencialmente malignas. Con el objetivo de evadir al sistema inmunitario, las células neoplásicas pueden alterar estas vías. Las respuestas antitumorales son suprimidas como consecuencia de la expansión de células supresoras de origen mielóide (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs), poblaciones celulares que incluyen progenitores tempranos mieloides, células dendríticas inmaduras, neutrófilos y monocitos (251). De esta manera, las MDSCs promueven la progresión de la neoplasia, suponiendo un obstáculo para la respuesta inmunitaria natural y para propia la inmunoterapia.

Las células neoplásicas producen diversos mediadores pro-inflamatorios que activan las MDSCs y llevan a su acumulación y a su actividad inmunosupresora. Los mecanismos por los cuales las MDSCs actúan como supresoras del sistema inmunitario son diversos y pueden verse ilustrados en la **Figura 18**. Entre estos mecanismos, se encuentra la supresión de la activación de las células T, la inducción de otras poblaciones inmunosupresoras, la regulación de la inflamación del microambiente tumoral, y la promoción de la tolerancia a las células malignas por parte del sistema inmunitario (252–256).

Debido a la presencia de MDSCs en una gran variedad de tumores sólidos y neoplasias hematológicas, se han convertido en un foco importante para su investigación, valorándose como potenciales dianas terapéuticas para poder incrementar la inmunidad antitumoral. Concretamente, las MDSCs se han

detectado patológicamente en el mieloma múltiple (257), interactuando con las células plasmáticas del MM y las células efectoras inmunitarias, permitiendo así la progresión de la enfermedad.

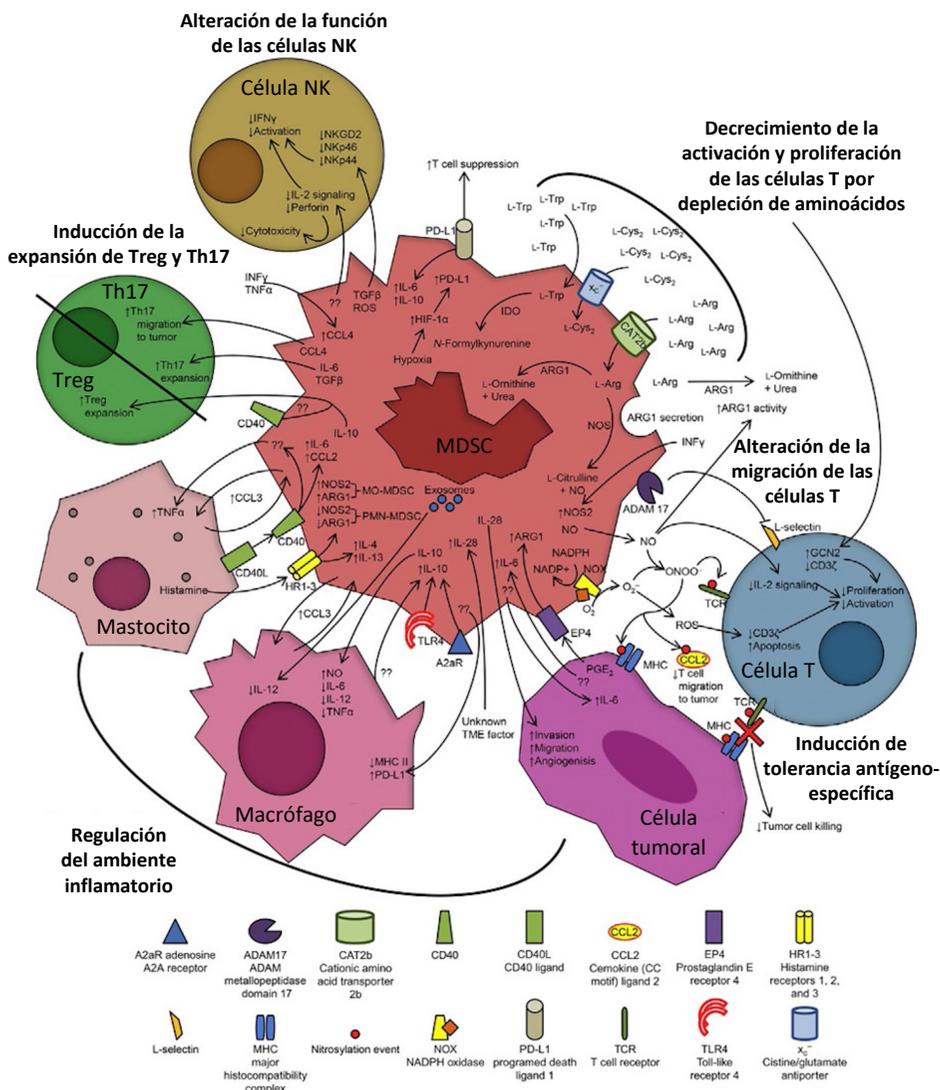


Figura 18. Las MDSCs suprimen las células T y regulan el sistema inflamatorio por diversas vías. Adaptada de Parker *et al.*, 2015 (251).

4. LA CITÓMICA FUNCIONAL PARA EL ESTUDIO DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

La citometría de flujo se ha convertido en una de las principales tecnologías utilizadas para contribuir al diagnóstico y a la clasificación de las neoplasias hematológicas. Esta tecnología es indispensable para la detección de las células malignas a nivel de célula única, la asignación del linaje clonal, la identificación de la expresión de antígenos aberrantes y la detección de poblaciones aberrantes.

Los avances en la instrumentación, la disponibilidad de nuevos fluorocromos y la necesidad de analizar diversos parámetros celulares de forma simultánea, han llevado al desarrollo de la citometría de flujo multiparamétrica (258). Mediante combinaciones de sondas conjugadas covalentemente a fluorocromos con diferentes características de excitación y emisión, se puede definir la coexpresión de diversos marcadores en una misma célula. El número máximo de parámetros a analizar está limitado por el solapamiento los espectros de emisión de los diferentes fluorocromos. Actualmente, gracias al desarrollo de nuevos fluorocromos y de programas informáticos de adquisición y análisis, se pueden encontrar citómetros de flujo que permiten analizar simultáneamente hasta 27 parámetros (61). Para el uso adecuado de esta tecnología, se requiere la utilización de controles negativos y positivos, con la finalidad de establecer los niveles de autofluorescencia, y tratando de minimizar el solapamiento de los espectros de emisión de los diferentes fluorocromos. Además, el gran volumen de datos generados requiere el desarrollo de programas de análisis especializados y de personal especialmente formado en la preparación, la adquisición y el posterior análisis (61) de los especímenes. Por otro lado, cabe destacar la emergencia de la citometría de flujo espectral, tecnología que tiene la capacidad de determinar el patrón de emisión inherente de cada molécula fluorescente para generar de este modo una huella espectral única, que permite analizar a nivel teórico más

parámetros de fluorescencia simultáneamente, reduciendo el efecto del solapamiento espectral, aun requiriendo de la preparación de los controles biológicos adecuados (61,259).

Como se ha descrito con anterioridad, la CFM permite identificar el inmunofenotipo de las células normales y patológicas para poder diagnosticar y realizar el seguimiento de las enfermedades hematológicas. Sin embargo, el inmunofenotipado, utilizado como método principal en hematología clínica, no proporciona toda la información necesaria para el estudio de estas patologías.

La **citómica**, o citometría de sistemas, consiste en el análisis molecular multiparamétrico simultáneo de la heterogeneidad celular y de los sistemas celulares (citomas) intactos, en relación con el espacio y el tiempo, y en combinación con el conocimiento adquirido mediante el exhaustivo análisis bioinformático de los resultados obtenidos. El concepto de citómica fue acuñado inicialmente en el ámbito de la botánica molecular por Davies y colaboradores en el año 2001 (260), en relación con el estudio de los componentes del citoesqueleto de las plantas. *A posteriori*, ha sido globalmente aceptado y utilizado en diversos trabajos, entre los cuales destacan los estudios de Valet y colaboradores (261–264). La citómica, por lo tanto, es la disciplina que relaciona la genómica y la proteómica con la dinámica y función celular, dependientes de estímulos extrínsecos e intrínsecos (265,266).

La citómica se puede aplicar a nivel clínico en el análisis de la heterogeneidad celular en el momento del diagnóstico de las enfermedades hematológicas, causada por una suma de exposiciones genéticas y ambientales, proporcionando así una mayor riqueza de información del estado de la enfermedad y de su evolución dependiente de la terapia (261,262,264).

Para la realización de los estudios citómicos, es necesario disponer de tecnologías que permitan realizar medidas a nivel de célula única mediante

métodos basados en la dispersión de la luz y en parámetros de fluorescencia, afectando mínimamente la función celular, en la medida de lo posible. Entre las tecnologías citómicas se encuentran la citometría de flujo multiparamétrica y tecnologías de análisis imagen, como la microscopia confocal y de excitación multifotónica, de barrido por láser, o de captura de imagen en placas mediante sistemas de alta capacidad de análisis.

La citometría de flujo permite determinar la función celular de los citomas en condiciones patológicas, en combinación con las aplicaciones más extendidas como son las del inmunofenotipado. El estudio de la función celular mediante citometría de flujo se basa en la utilización de marcadores asociados con la señalización celular, con las fases del ciclo celular, o con funciones efectoras y otras vías celulares. Para ello, además de anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos específicos, se utilizan sondas bioquímicas en presencia de agentes fluorescentes o sustratos fluorogénicos no tóxicos.

Por lo tanto, la **citómica funcional** es una herramienta que puede efectivamente proporcionar nuevos conocimientos para la investigación y evaluación de la enfermedad, así como una comprensión más profunda de las complejidades y retos en el análisis de poblaciones celulares involucradas en la refractariedad y la recaída de muchas neoplasias hematológicas.

Entre los estudios funcionales basados en CFM para la detección de las LSCs, y células altamente resistentes a la quimioterapia, se puede encontrar el análisis de la *side population* (SPop), correspondiente a células con expresión de transportadores multidroga ABCG2, que únicamente pueden ser identificadas mediante la función de expulsión de sustratos fluorescentes (267). Otro ensayo para determinar células primitivas, está basado en la detección de actividades enzimáticas características de las CSCs, tales como actividad aldehído deshidrogenasa (268). A nivel de supresión inmunitaria, se pueden preservar las

condiciones del microambiente para posteriormente determinar la respuesta a estímulos de diferentes poblaciones celulares (61). El potencial de la citometría de flujo permite a su vez adaptar ensayos funcionales originariamente desarrollados y aplicables mediante microscopía de fluorescencia, tales como el de la fosfatasa alcalina (*alkaline* phosphatase, ALP), enzima que resulta ser altamente muy activa en las células más indiferenciadas (269).

Para poder analizar la función celular, es indispensable la **preservar la muestra** en las condiciones más aproximadas a las fisiológicas manipulándola mínimamente. De este modo, el tiempo de obtención y análisis debe ser el mínimo posible, la temperatura a la que se preserva la muestra no debe sufrir alteraciones importantes, las condiciones ambientales de concentración de oxígeno deben mimetizar las del organismo, o se debe evitar cualquier tipo de fraccionamiento de los especímenes sujetos de estudio, entre otros.

El procedimiento habitual en los protocolos de diagnóstico y seguimiento de enfermedades hematológicas requiere la utilización de soluciones de lisis de eritrocitos, dado que representan una población celular muy mayoritaria con respecto a los leucocitos, población de la cual se originan las células aberrantes en la mayoría de neoplasias hematológicas. Estas soluciones de lisis pueden provocar resultados artefactuales, afectar a la funcionalidad celular, y provocar la pérdida de subpoblaciones celulares (270–272). Como alternativa, se han desarrollado protocolos *no lyse no wash* (NLNW), es decir, protocolos en los que se evitan los procedimientos de lisis eritrocitaria y de lavados celulares, con el objetivo de perturbar mínimamente la muestra a analizar. Estos métodos, siempre y cuando sea posible utilizarlos, son simples, rápidos y menos costosos que los métodos de lisado eritrocitario. Su ventaja fundamental consiste en minimizar la manipulación de la muestra, un aspecto que permite evaluar la función celular íntegramente dentro del estudio del citoma.

Existen diversos métodos para poder discriminar los eritrocitos del resto de poblaciones celulares sin tener recurrir a la utilización de procedimientos más o menos agresivos para eliminar los eritrocitos (273). Algunos se basan en la utilización de marcadores de ADN para discriminar las células nucleadas de las no nucleadas y del ruido de fondo (274,275) (**Figura 19**); y otros exploran las diferencias en la dispersión de la luz entre leucocitos, plaquetas y eritrocitos, debido al contenido en oxihemoglobina de los eritrocitos (273,276) (**Figura 20**).

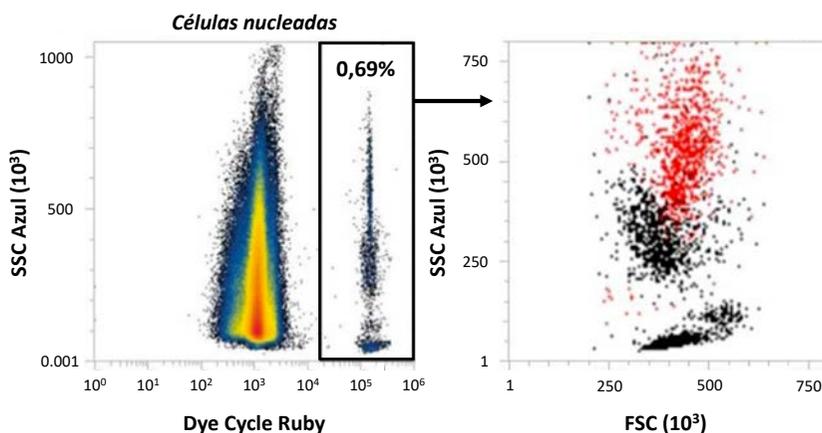


Figura 19. Método NLNW basado en el uso de marcadores de ADN (DyeCycle™ Ruby) para distinguir las células nucleadas de los eritrocitos y ruido de fondo. Los puntos señalados en rojo (*dot plot* derecho) corresponden a células necróticas. Adaptada de Petriz *et al.*, 2018 (273).

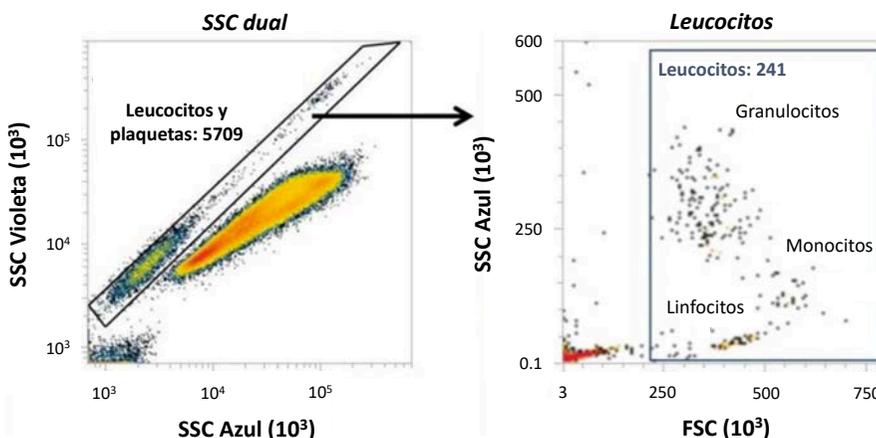


Figura 20. Método NLNW basado en las diferencias de dispersión de la luz de los eritrocitos, las plaquetas y los leucocitos. Adaptada de Petriz *et al.*, 2018 (273).

El método NLNW conlleva adquirir muestras con elevada celularidad, un factor que puede afectar al número de células que atraviesan la cámara de análisis del citómetro simultáneamente, conocido como fenómeno de coincidencia. Para posicionar las células en la cámara de análisis, la mayoría de citómetros de flujo utilizan la tecnología de enfoque hidrodinámico. El enfoque hidrodinámico utiliza el fluido acompañante para confinar las células en la cámara de análisis y alinearlas en el punto de interrogación (65). A altas velocidades en el paso de muestra o en el caso de una elevada concentración celular, se magnifica el fenómeno de coincidencia.

Para solventar esto, se han desarrollado citómetros de flujo que utilizan una tecnología hidrodinámica asistida por enfoque acústico, descrita por Goddard y Kaduchack (277). Esta tecnología refina el enfoque hidrodinámico hasta la cámara de análisis. Anteriormente, un elemento piezoeléctrico permite la aplicación del enfoque acústico al capilar por el que se conducen las células hacia el punto de interrogación, alineándolas de forma muy precisa (278).

A diferencia del enfoque hidrodinámico, el enfoque hidrodinámico asistido por enfoque acústico permite mejorar notablemente la adquisición de la muestra tanto a velocidades mínimas (del orden de 12 μl por segundo) y como a velocidades muy elevadas (del orden de 1000 μl por segundo) (**Figura 21**), reduciendo los efectos deletéreos sobre las células. Esto permite incrementar la capacidad de detección de poblaciones minoritarias, o incluso muestras con escasa celularidad, así como muestras con una elevada celularidad, reduciendo el fenómeno de coincidencia (278). Aunque los protocolos NLNW pueden ser aplicables en cualquier modelo de citómetro, es preferible que sean desarrollados en citómetros asistidos por enfoque acústico.

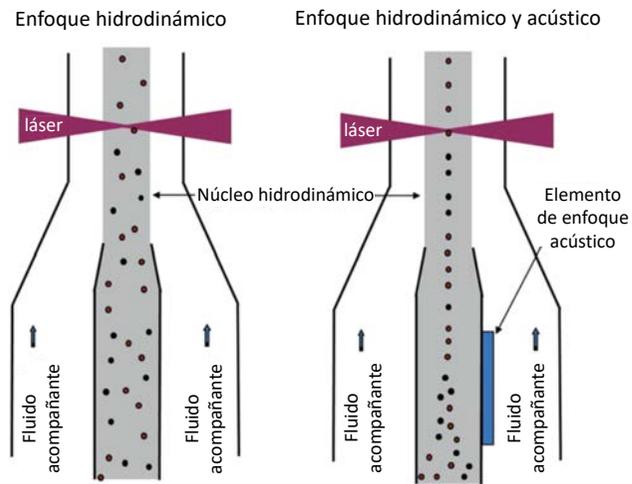


Figura 21. Comparación del enfoque hidrodinámico con el enfoque acústico a altas velocidades de análisis de muestra.
 Adaptada de Ward y Kaduchack, 2018 (278)

HIPÓTESIS

A pesar de que las nuevas estrategias terapéuticas han mejorado los resultados clínicos e incrementado la supervivencia global de los pacientes con leucemia aguda y mieloma múltiple, la mayoría acaba manifestando recaídas o enfermedad refractaria, siendo por tanto enfermedades todavía no curables.

El pronóstico estas enfermedades se determina actualmente, por un lado, basándose principalmente en las características citogenéticas y moleculares que presenta el paciente en el diagnóstico y a las características del propio paciente. No obstante, la clasificación obtenida es orientativa y no permite conocer el riesgo de recaída individual de cada paciente, así como determinar la refractariedad al tratamiento médico habitual.

Por otro lado, las técnicas de seguimiento que permiten monitorizar la enfermedad residual medible han avanzado significativamente los últimos años, siendo aplicadas para poder determinar con mayor exactitud el pronóstico post-tratamiento y tomar decisiones terapéuticas. Sin embargo, muchos pacientes sin enfermedad residual medible acaban recayendo o progresando, indicando, por tanto, que estas técnicas no aportan la información total sobre el paciente, ya sea debido al límite de resolución de las mismas o debido a que las células responsables de la posterior recaída deben de ser analizadas mediante distintas aproximaciones.

Uno de los mecanismos de refractariedad conocidos de la leucemia aguda es debido a la presencia de células madre leucémicas que contribuyen a la heterogeneidad fenotípica y funcional del tumor y a la resistencia a quimioterapia, convirtiéndose así en una importante diana terapéutica. La detección de estas puede ser compleja, dado que pueden variar sustancialmente a nivel molecular y fenotípico y a nivel individual e interindividual.

Además, el microambiente celular puede tener un papel clave en la refractariedad a la quimioterapia e inmunoterapia. Las MDSCs, aumentadas en el mieloma

Hipótesis

múltiple, contribuyen en la supresión de la respuesta inmunitaria a través del eje *programmed death-1* (PD-1) y *programmed death-ligand 1* (PD-L1), siendo, por tanto, una diana terapéutica de esta enfermedad. La detección de estas células, así como de su ligando PD-L1, debe tener una gran importancia para poder evaluar la respuesta al tratamiento.

Por lo tanto, el proyecto de Tesis Doctoral se basa en la siguiente **hipótesis**:

La citómica funcional, combinada con el inmunofenotipado, puede ser clave para detectar células relacionadas con la refractariedad al tratamiento de las neoplasias hematológicas, como son las células madre tumorales y las MDSCs. Además, la citómica funcional permite una manipulación mínima de los especímenes sujetos de estudio, así como la mimetización de las condiciones fisiológicas, contribuyendo a detectar de forma más eficiente dichas células y permitiendo el desarrollo de nuevas aproximaciones para el estudio de las implicaciones pronósticas y de la predicción del riesgo de recaída o de enfermedad refractaria. El uso de estas aproximaciones debe contribuir al desarrollo de nuevas terapias y estrategias diagnósticas.

OBJETIVOS

El objetivo y propósito principal de esta Tesis Doctoral es desarrollar nuevos sistemas alternativos para estudiar e identificar poblaciones celulares relacionadas con la refractariedad al tratamiento en la neoplasia hematológica, como las células madre tumorales y las células inmunosupresoras. Para ello, se aplicarán aproximaciones citómicas avanzadas, que permitan realizar estudios a nivel fenotípico y funcional con una perturbación mínima del espécimen y tratando de mantener las condiciones fisiológicas del microambiente, contribuyendo así a la identificación de la implicación de estas poblaciones en el origen y desarrollo de la enfermedad y a la mejora de las estrategias terapéuticas actuales.

Los objetivos secundarios son los siguientes:

1. Estudiar la actividad fosfatasa alcalina en subpoblaciones de células madre de la leucemia aguda, como método potencial para detectar aquellas poblaciones celulares asociadas a una mayor refractariedad al tratamiento.
 - 1.1. Diseñar y validar un método basado en citometría de flujo para determinar la actividad fosfatasa alcalina en combinación con el inmunofenotipo de células intactas de sangre y medula ósea utilizando sistemas de mínima perturbación.
 - 1.2. Estudiar la actividad fosfatasa alcalina en leucemias agudas refractarias y de alto riesgo para determinar dentro de una población clonal de blastos distintos niveles de actividad y su relación con la refractariedad de la enfermedad.
 - 1.3. Investigar la asociación de la actividad fosfatasa alcalina celular en el momento del diagnóstico de la leucemia mieloide aguda y el pronóstico de los pacientes.

2. Diseñar y evaluar un nuevo método de identificación de MDSCs con expresión de PD-L1 en pacientes de mieloma múltiple, potencialmente utilizable en el diagnóstico y en la elección de pacientes candidatos al tratamiento con inhibidores del *checkpoint* PD-1/PD-L1.
 - 2.1. Implementar un panel de citometría de flujo evitando el solapamiento de los espectros de emisión de los fluorocromos utilizados, para simplificar la adquisición de la muestra y el análisis posterior.
 - 2.2. Desarrollar una metodología de citómica funcional para la detección de la molécula PD-L1 en MDSCs basada en protocolos de mínima perturbación para mantener la muestra intacta y conservar la función celular.
 - 2.3. Aplicar la metodología diseñada en muestras de pacientes con mieloma múltiple para estudiar la dinámica de la molécula y predecir el éxito de la inmunoterapia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos descritos en este apartado se han utilizado en los siguientes trabajos desarrollados dentro del proyecto de Tesis Doctoral:

- **Trabajo I:** Identificación de progenitores leucémicos con elevada actividad fosfatasa alcalina y relación con la recaída y enfermedad refractaria en leucemia aguda.
- **Trabajo II:** Diseño y evaluación de un ensayo de *screening* directo para la detección de PD-L1 en MDSCs y su potencial uso en la predicción del éxito de la inmunoterapia.

1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

1.1. Pacientes

En el primer trabajo, se obtuvieron muestras de sangre periférica y de aspirados de médula ósea recogidos en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente anticoagulante de pacientes de leucemia aguda diagnosticados y tratados en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona). Para la validación de la metodología, se obtuvieron muestras de sangre periférica de donantes sanos. Para el estudio de la actividad fosfatasa en leucemias agudas refractarias, se obtuvieron muestras de aspirados de médula ósea y de sangre periférica en el diagnóstico, recaída, durante la terapia de mantenimiento, y seguimiento de pacientes de leucemia linfoblástica aguda de precursores B y leucemia mieloide aguda refractarias, tratados con protocolos del Programa Español de Tratamientos en Hematología (PETHEMA) o de CETLAM. En el último estudio, se recogieron muestras de médula ósea (n = 38) y sangre periférica (n = 5) de 43 pacientes (30 hombres y 13 mujeres; edad media de 63 años, rango 26 - 91) en el momento del diagnóstico de leucemia mieloide aguda. Se excluyeron los pacientes cuyo seguimiento fuese realizado en otros hospitales, que hubieran

fallecido inmediatamente o subsecuentemente debido a complicaciones post-diagnóstico, que hubiesen sido diagnosticados de leucemia promielocítica aguda, o que no hubiesen firmado el consentimiento informado. La mayoría de pacientes seleccionados fueron tratados de acuerdo con los protocolos CETLAM, basados en el uso de idarubicina o fludarabina en combinación con citarabina. Doce de los 43 pacientes fueron sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico. La clasificación de riesgo (favorable, intermedio o adverso) de los pacientes se asignó de acuerdo con las recomendaciones de la ELN del 2017 (53) basadas en alteraciones citogenéticas y moleculares.

En el segundo trabajo, se obtuvieron muestras de aspirados de médula ósea recogidas en tubos con EDTA como agente anticoagulante de pacientes con mieloma múltiple diagnosticados y tratados en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona). Para diseñar y validar el panel de *screening*, se emplearon 35 muestras de aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Once de estas 35 muestras fueron sometidas a procesos de fijación y permeabilización para estudiar los niveles de PD-L1 citoplasmático. Muestras adicionales de aspirados de médula ósea fueron también estimuladas diferentes tiempos con ésteres de forbol 12-miristato-13-acetato (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA). Cuatro muestras de médula ósea fueron utilizadas para los ensayos de competición con durvalumab.

Todos los pacientes incluidos en ambos trabajos proporcionaron su consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los procedimientos fueron en acuerdo con los protocolos internos del laboratorio, autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona).

1.2. Líneas celulares

En el primer trabajo se utilizaron las líneas celulares KB, LN405 y KG-1a obtenidas del laboratorio del Dr. Petriz. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio completo consistente en RPMI1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (*fetal bovine serum*, FBS), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de sodio-piruvato, 15 U/L de penicilina y 15 ng/L de estreptomicina. Se incubaron a 37 °C con un 5% de CO₂, 90% de humedad y 21% o 5% de O₂.

2. REACTIVOS

2.1. Citómetro de flujo

- Attune™ Focusing Fluid (1x) (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24904)
- Attune™ Performance Tracking Beads (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 4449754)
- Attune™ Shutdown Solution (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24975)
- Attune™ Wash Solution (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24974)

2.2. Anticuerpos monoclonales

- Anti-Human APC-CD11b, clon VIM12 (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. CD11b05)
- Anti-Human FITC-HLA-DR, clon TU36 (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. MHLDR01)
- Anti-Human PE-CD34, clon AC136 (Miltenyi Biotec, cat. no. 130-113-179)
- Anti-Human PE-CD123, clon 6H6 (CyFlow™, cat. no. AB378574)
- Anti-Human PE-PD-L1, clon MIH1 (eBioscience™, cat. no. 12-5983-42)

- Anti-Human PE-Cy7-CD33, clon WM53 (eBioscience™, cat. no. 25-0338-42)
- Anti-Human PE-Cy5-CD34, clon 581 (CyFlow™, cat. no. AG891077)
- Anti-Human PE-Cy7-CD117, clon 104D2 (CyFlow™, cat. no. AN694403)

2.3. Marcadores de ácidos nucleicos

- 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. A1310)
- Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich®, cat. no. D9542)
- Hoechst 33342 (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. H1399)
- Propidium iodide (PI) ≥ 94.0% (Sigma-Aldrich®, cat. no. P4170)
- Vybrant™ DyeCycle™ Violet (DCV) Stain (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. V35003)

2.4. Sustratos fluorogénicos, fármacos, estimuladores e inhibidores

- Alkaline Phosphatase Live Stain (APLS) (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. A14353)
- Durvalumab; MEDI4736 (AstraZeneca, cat. no. ASZ4603)
- Mitoxantrone hydrochloride (Sigma-Aldrich® cat. no. M6545)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich® cat. no. P8139)
- Verapamil hydrochloride (Sigma-Aldrich® cat. no. V4629)

2.5. Medios de cultivo, soluciones y *buffers*

- Hanks' Balanced Salt Solution (1x) (HBSS), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific GmbH, cat. no. HBSS-2A)
- RPMI 1640 w/L-Glu (Biowest, cat. no. L0500-500), suplementado con:
 - 10% suero bovino fetal; Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, cat. no. S181B-500)
 - 2 mM L-glutamina; L-Glutamine 100x (Biowest, cat. no. X0550-100)
 - 1 mM sodio piruvato; Sodium Pyruvate (Biowest, cat. no. L0642-100)
 - 15 U/L penicilina y 15 ng/L estreptomicina, Penicillin-Streptomycin 100x (Biowest, cat. no. L0022-100)
- Medio *side population* (SPop):
 - DMEM high glucose w/L-Glu (Biowest, cat. no. P0103-N5L), suplementado con:
 - 2% suero bovino fetal; Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, cat. no. S181B-500)
 - 1 mM Hepes; Hepes 99,5% (Sigma-Aldrich® cat. no. H3375)
- Buffer *side population* (SPop):
 - Hanks' Balanced Salt Solution (1x) (HBSS), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific GmbH, cat. no. HBSS-2A), suplementado con:
 - 2% suero bovino fetal; Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, cat. no. S181B-500)
 - 1 mM Hepes; Hepes 99,5% (Sigma-Aldrich® cat. no. H3375)

- Solución de lisis de cloruro de amonio 10x:
 - Agua destilada
 - 1,5 M NH_4Cl ; Ammonium Chloride (Sigma-Aldrich® cat. no. A9434)
 - 100 mM NaHCO_3 ; Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich® cat. no. S5761)
 - 1 mM $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$; EDTA, disodium salt (Calbiochem cat. no. 324503)Preparada a pH = 7,4 (ajustado con 1 N HCl y 1 N NaOH)
- Solución de lisis de formaldehído: Optilyse C Lysing Solution (Beckman Coulter, cat. no. A11895)
- Solución de etanol al 70%:
 - 72,6% EtOH; Alcohol neutro origen agrícola 96,3° (Alcoholes Gual S.A., cat. no. 64-17-5)
 - 27,4% Agua destilada
- Hanks' Balanced Salt Solution con Albúmina y Azida Sódica (HBA):
 - Hanks' Balanced Salt Solution (1x) (HBSS), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific GmbH, cat. no. HBSS-2A), suplementado con:
 - 1% Albúmina de suero bovino; Albumin, from bovine serum (Sigma-Aldrich®, cat. no. A7906)
 - 0,1% NaN_3 ; Sodium azide extra pure (Sigma-Aldrich®, cat. no. 71290)
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich®, cat. no. 20-139)

3. INSTRUMENTACIÓN

3.1. Citometría de flujo

Los citómetros de flujo utilizados en ambos trabajos del proyecto de Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- Citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™: Applied Biosystems® Attune™ Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific, discontinuado)
- Citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT: Invitrogen™ Attune™ NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24858)

3.1.1. Puesta a punto y mantenimiento

Diariamente, antes de la puesta en funcionamiento de los citómetros, se comprueba que los niveles fluídicos son los especificados y se reponen en caso de que sea necesario. También se realiza una inspección visual del puerto de inyección de la muestra, de las conexiones y de la jeringa impulsora de la muestra, para descartar posibles fugas. Una vez en funcionamiento, se inicia el programa informático del citómetro y se ejecuta la función de *start-up*, encargada de iniciar los láseres y purgar el sistema fluídico. Tras la estabilización de los láseres durante 10-15 minutos, se realiza el test de calibración (*performance test*), mediante microesferas fluorescentes de tamaño, espectros de excitación y emisión y concentración especificados por el fabricante. Una vez realizada la calibración, es posible utilizar el citómetro de acuerdo con los criterios de funcionamiento establecidos por el fabricante. Una vez realizados los experimentos, se vuelve a comprobar si los niveles fluídicos son los adecuados y se reponen en caso de que sea necesario. Seguidamente, se ejecuta la función de *shutdown*, encargada de limpiar y apagar los citómetros.

Los citómetros disponen de funciones adicionales para el mantenimiento del sistema fluídico a utilizar en caso de necesidad. La función *de-bubble* permite sustraer la posible formación de burbujas producida durante la adquisición de la muestra; la función *unclog* elimina obstrucciones producidas a lo largo del sistema fluídico que impiden la adecuada adquisición de la muestra; la función *sanitize simple injection port* desinfecta el puerto de inyección, siendo de ejecución recomendable especialmente en la adquisición de especímenes altamente contaminantes; y, la función *deep clean* permite desinfectar el sistema mediante el uso de soluciones limpiadoras y lejía.

El sistema ejecuta automáticamente la función *rinse* entre la adquisición de los especímenes. Esta función permite retirar el exceso de fluido acompañante; la función *decontaminate system* permite de forma automatizada realizar la desinfección completa del sistema y de los tanques fluídicos de forma exhaustiva, y es recomendable realizarla cada tres meses. La descontaminación de la fluídica, así como el recambio de la jeringa y de los filtros se recomienda hacerla cada seis meses.

3.1.2. Configuración de los filtros

El sistema de filtros del citómetro de flujo permite separar la luz emitida por los fluorocromos, al ser excitados mediante un láser a una longitud de onda determinada, y dirigirla a los distintos detectores. En los citómetros utilizados en esta Tesis Doctoral, los tipos de filtro existentes son: filtros de paso de banda (*bandpass*, BP), que transmiten longitudes de onda dentro de un rango concreto, rechazando aquellas fuera del rango (**Figura 22a**); filtros de paso largo (*longpass*, LP); que atenúan longitudes de onda más cortas y transmiten aquellas superiores al rango establecido (**Figura 22b**); filtros de paso corto (*shortpass*, SP), que atenúan longitudes de onda más largas y transmiten aquellas inferiores al rango establecido (**Figura 22c**); y filtros dicróicos de LP (*dichroic LP*, DLP),

caracterizados por ser filtros de que permiten transmitir la luz de un pequeño rango de longitud de onda y reflejar el resto de longitudes de onda (**Figura 22d**).

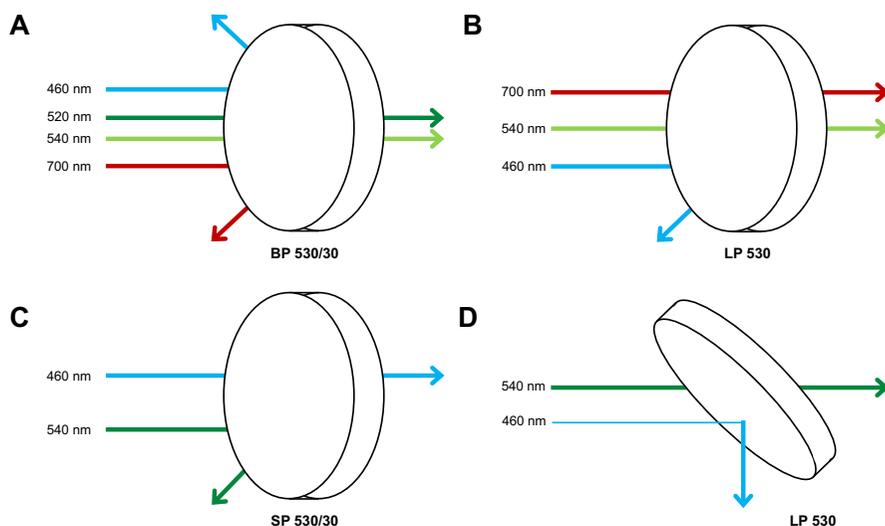


Figura 22. Tipos de filtros de los citómetros de flujo. (A) Filtro de paso de banda. (B) Filtro de paso largo. (C) Filtro de paso corto. (D) Filtro dicróico de paso largo. Adaptada de *Life Technologies Corporation*, 2014 (279).

A continuación, se especifica la combinación de filtros utilizada por cada citómetro para los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral:

3.1.2.1. Citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™

El citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ se utilizó en el primer trabajo. Los parámetros de dispersión de la luz frontal (*forward scatter*, FSC) y lateral (*side scatter*, SSC) se obtuvieron mediante la iluminación del láser violeta a 405 nm de longitud de onda y la siguiente configuración de filtros: 405/10 BP para el FSC y 410 DLP y 405/10 BP para el SSC.

Los marcadores específicos de ADN DAPI y Hoechst 33342 se excitaron con el láser violeta a 405 nm y su emisión fue recogida con 500 DLP, 410 DLP y 450/40

BP en el detector VL1. El marcador de ADN DCV se excitó con el láser violeta a 405 nm y su emisión se recogió con 500 DLP, 410 DLP y 450/40 BP en el detector VL1 y con 575 DLP y 603/48 BP en el detector VL3. El sustrato APLS, el fluorocromo PE y el PI se excitaron con el láser azul a 488 nm de longitud de onda y su emisión fue recogida con 555 DLP y 530/30 BP en el detector BL1 para APLS, 620 DLP y 574/26 BP en el detector BL2 para el PE y 620 DLP y 640 LP en el detector BL3 para el PI.

3.1.2.2. Citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT

El citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT se utilizó para realizar los estudios del primer y segundo trabajo. Para los protocolos basados en la aplicación NLNW, se utilizó el kit de filtros Invitrogen™ Attune™ No-Wash No-Lyse Filter Kit (Thermo Fisher Scientific), con el que se permitió detectar la dispersión de la luz lateral tanto a partir de la iluminación del láser azul a 488 nm (configurada por defecto) como a partir de la iluminación del láser violeta a 405 nm. El kit de filtros NLNW se utilizó como se muestra en la **Figura 23a**. La combinación de los parámetros de SSC violeta y SSC azul permite la separación de los eritrocitos del resto de células por su contenido en oxihemoglobina (**Figura 23b**). Por lo tanto, el SSC violeta se pudo obtener mediante la iluminación con el láser violeta a 405 nm y el filtro 405/10 BP en el detector VL1 y el SSC azul mediante la iluminación con el láser azul a 488 nm y el filtro 488/10 BP. El FSC se obtuvo mediante la iluminación con el láser azul a 488 nm y el filtro 488/10 BP.

Para el primer trabajo, el marcador DAPI se excitó con el láser violeta a 405 nm y su emisión se recogió con 495 DLP y 440/50 BP en el detector VL1. Los marcadores de ADN DCV y Hoechst 33342 se excitaron con el láser violeta a 405 nm y su emisión se recogió con 495 DLP y 440/50 BP en el detector VL2, ya que el detector VL1 se utilizó para recoger el SSC violeta (**Figura 23a**). El fluorocromo PE se excitó con el láser verde/amarillo a 561 nm y su emisión se recogió con 600

DLP y 585/16 BP en el detector YL1. La excitación de los tándems de PE con cianina 5 y cianina 7 se recogió con 650 DLP y 695/40 BP en el detector YL3, y 740 DLP y 780/60 BP en el detector YL4, respectivamente. La excitación del fluorocromo PE con el láser verde/amarillo evitó el solapamiento espectral con el sustrato APLS, eliminando de este modo la necesidad de realizar el procedimiento de compensación electrónica de la señal de los espectros de emisión y simplificando así el diseño experimental y la configuración del instrumento.

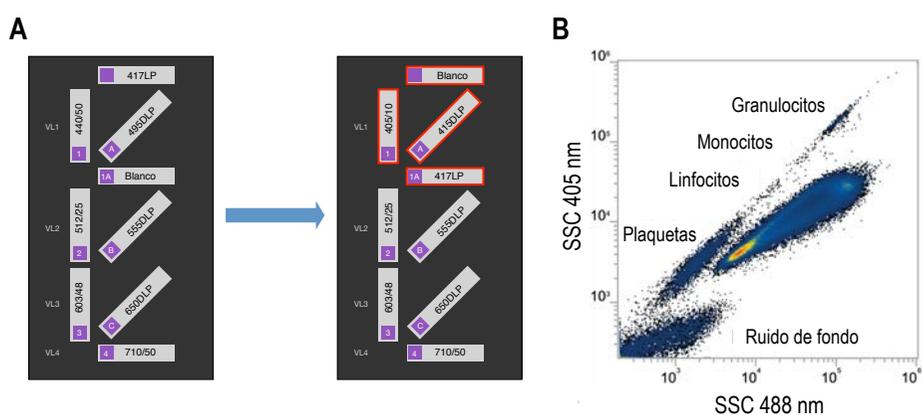


Figura 23. Uso del kit de filtros Invitrogen™ Attune™ No-Lyse No-Wash Filter Kit. (A) Configuración estándar de filtros para los detectores de la emisión producida por el láser violeta (derecha) y configuración obtenida mediante la utilización del kit para detectar el SSC mediante la iluminación con el láser violeta en el detector VL1 (izquierda). (B) Identificación de diversas poblaciones de una muestra de sangre periférica utilizando un *density plot* dual de SSC violeta versus SSC azul. Adaptada de Cossarizza *et al.*, 2017 (61).

Para el segundo trabajo, los marcadores de ADN DCV y Hoechst 33342 también se excitaron con el láser violeta a 405 nm y su emisión se recogió con 495 DLP y 440/50 BP en el detector VL2, ya que el detector VL1 se utilizó para obtener el SSC del láser violeta (**Figura 23a**). El fluorocromo FITC se excitó con el láser azul a 488 nm y su emisión se recogió con 555 DLP y 530/30 BP en el detector BL1. El fluorocromo PE se excitó con el láser verde/amarillo a 561 nm y su emisión se recogió con 600 DLP y 585/16 BP en el detector YL1. La excitación del tándem

de PE con cianina 7 se recogió con 740 DLP y 780/60 BP en el detector YL4. La sonda fluorescente 7-AAD se excitó con el láser amarillo/verde a 561 nm y su emisión se recogió con 600 DLP y 620/15 BP en el detector YL2. El fluorocromo APC se excitó con el láser rojo a 637 nm y su emisión fue recogida con 690 DLP y 670/14 BP en el detector RL1.

3.1.3. Adquisición de la muestra

En los protocolos basados en procedimientos NLNW, el umbral se estableció empíricamente mediante la positividad de DCV o Hoechst 33342, los cuales permitieron discriminar las células nucleadas de los eritrocitos y del ruido de fondo. De esta manera, esta gran cantidad de células presentes en la sangre y médula ósea no lisada fue eliminada de la detección.

Las muestras se adquirieron a una velocidad de paso de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, intentando obtener la máxima resolución de las poblaciones y evitando a la vez largos tiempos de adquisición. En la mayoría de casos, se adquirieron un mínimo de 100.000 células nucleadas, es decir, positivas para los marcadores de ADN DCV y Hoechst 33342.

Generalmente, los parámetros de dispersión de la luz frontal y lateral se presentaron en escala lineal, mientras que los parámetros de fluorescencia se presentaron en escala logarítmica.

3.1.4. Compensación electrónica de los espectros de emisión

El solapamiento de los espectros de emisión de los fluorocromos se solventó mediante la compensación electrónica de la señal, para así poder definir correctamente las poblaciones analizadas en los experimentos multicolor realizados. El valor de los solapamientos entre los espectros de emisión de los fluorocromos se calculó, según las recomendaciones actuales (61), mediante la ratio de las medias de la intensidad de fluorescencia emitidas por cada

fluorocromo en un detector secundario. Para determinar los solapamientos espectrales, en la mayoría de experimentos se utilizaron controles positivos para el marcador y controles negativos o no marcados. De esta manera, se pudieron determinar los valores de autofluorescencia y de positividad de las poblaciones para el marcador a analizar. Una vez realizados los experimentos multicolor, se comprobó que las medias de la intensidad de fluorescencia entre las diferentes poblaciones por cada pareja de fluorocromos coincidiera.

3.2. Otra instrumentación

- Incubador de normoxia: Water-Jaketed US Autoflow Automatic CO₂ incubator Modelo NU-4750E (Nuaire™, discontinuado).
- Incubador de hipoxia: Water-Jaketed US Autoflow Automatic CO₂ incubator Modelo NU-4950E (Nuaire™, discontinuado).
- Cabina de flujo: NuAire LabGard ES (Energy Saver) NU-437 Class II Biological Safety Cabinet (Nuaire™, NU-437-400E).

4. PROTOCOLOS GENERALES

4.1. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

Para determinar la actividad fosfatasa alcalina en muestras biológicas de sangre y médula ósea, se recogieron los especímenes en tubos de EDTA y se prepararon siguiendo protocolos NLNW, con el objetivo de no alterar la función de los leucocitos y células leucémicas a estudiar. Las muestras fueron analizadas entre 2 y 24 horas después de la obtención.

Inicialmente, se estableció el tiempo y la temperatura óptimos de incubación del sustrato APLS con las células a analizar. También se comprobó cómo podrían

afectar diferentes soluciones lisantes a la actividad fosfatasa alcalina en comparación con el uso de protocolos NLNW. Para ello, una vez marcada la muestra con APLS, se añadió 1 ml de solución de lisis de cloruro de amonio 1x, y paralelamente, 1 ml de solución de lisis de formaldehído. La lisis se realizó en un tiempo de 10 minutos a temperatura ambiente.

Para determinar el punto de corte de positividad y negatividad para la fluorescencia del sustrato APLS, se evaluó la actividad fosfatasa alcalina en la línea celular KG-1a, con elevada actividad para esta enzima (control positivo) y en especímenes de sangre periférica obtenidos de pacientes sanos, con actividad basal para esta enzima (control negativo). Las muestras preparadas se mezclaron en una proporción 1:25 para ser adquiridas mediante citometría de flujo.

El protocolo general consistió en incubar entre $0,5$ y $1,0 \times 10^6$ leucocitos contenidos en sangre o médula a un volumen final de $100 \mu\text{l}$ en HBSS con $1 \mu\text{l}$ APLS (5x), $10 \mu\text{l}$ de FBS y $1 \mu\text{l}$ DCV (concentración final [CF] = $50 \mu\text{M}$) o $10 \mu\text{l}$ de Hoechst 33342 (CF = $0,2 \text{ mM}$) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos en un baño dedicado y protegido de la luz. Con posterioridad, las células se marcaron con $5 \mu\text{l}$ de anticuerpo/s monoclonal/es a una concentración final de $2,5 \mu\text{g/ml}$ durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas se diluyeron en HBSS a un volumen final de $1000 \mu\text{l}$ antes de ser adquiridas por el citómetro de flujo.

4.2. Ensayos de extrusión del sustrato APLS

Para comprobar si el sustrato APLS era expulsado debido a la acción de transportadores multidroga que pudieran estar expresados en la membrana plasmática, se realizó un ensayo de extrusión utilizando la línea celular KB, que fue cultivada en presencia mitoxantrone (CF = 1 nM) para mantener la expresión constante del transportador multidroga ABCG2. Se obtuvieron 1×10^6 células de

la línea celular KB en 1 ml de DMEM y se incubaron con 1 μ l DMSO (control), con 1 μ l APLS (5x) y con la combinación de 1 μ l APLS (5x) y 5 μ l verapamil (CF = 50 μ M) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 5 μ l de yoduro de propidio (CF = 7 μ M) para excluir las células con la membrana celular comprometida y se analizaron por citometría de flujo.

4.3. Análisis de la actividad fosfatasa alcalina en la *side population*

El análisis de la SPop en la línea celular LN405 se realizó según el protocolo descrito por Petriz en el año 2013 (280). Para la detección de la actividad fosfatasa alcalina en las células de la SPop, en los últimos 20 minutos de incubación con DCV, se añadió 1 μ l de APLS (5x). Las células LN405 crecieron paralelamente en condiciones de oxígeno del 5% (hipoxia) y del 21% (normoxia).

4.4. Análisis del ciclo celular

Para realizar el análisis del ciclo celular de las células de especímenes de sangre periférica y médula ósea, se recogió el volumen necesario de muestra para obtener 1×10^6 células nucleadas y se lisó durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando una solución de lisis de cloruro de amonio 1x y añadiendo un volumen 10 veces superior al de la muestra. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con HBSS y se diluyeron en 1 ml de etanol al 70% con el objetivo de fijar y permeabilizar la membrana plasmática. Se guardaron *overnight* a -20 °C y en el momento de la preparación se volvieron a lavar dos veces con HBSS. Se diluyeron en 1 ml de HBSS y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con 2 μ l de DAPI (CF = 6 μ M) para ser adquiridas posteriormente mediante citometría de flujo. Para el análisis del ciclo celular, el parámetro de fluorescencia emitida por el DAPI se representó en escala lineal, ajustando al canal 1000 la fase

G₀/G₁ de preparaciones de leucocitos obtenidos de sangre periférica de pacientes sanos.

4.5. Determinación de PD-L1 de superficie en MDSCs

Para determinar la expresión de PD-L1 en MDSCs de médula ósea, los especímenes se recogieron en tubos de EDTA y, con el objetivo de no alterar la función de celular, se prepararon siguiendo protocolos de NLNW. Las muestras fueron analizadas entre 2 y 24 horas después de la obtención.

Inicialmente, se obtuvieron 1×10^6 células nucleadas diluidas en 100 μ l de HBA en dos tubos y ambos se marcaron con 1 μ l de DCV (CF = 50 μ M) o 10 μ l de Hoechst 33342 (CF = 0,2 mM) y 10 μ l de FBS, para bloquear uniones inespecíficas, a 37 °C durante 10 minutos en un baño dedicado y protegido de la luz. Se añadieron 900 μ l de HBA y se procedió a la estimulación celular añadiendo a un tubo 1 μ l de PMA (CF = 1,63 μ M) y al otro tubo 1 μ l de DMSO, actuando como control negativo. Se incubaron los tubos a 37 °C en un baño dedicado y protegido de la luz durante 10 minutos. También se exploraron otros tiempos de estimulación (1; 2,5; 5; 10; 30 y 60 minutos).

Una vez estimuladas, las células se centrifugaron y se aspiraron 900 μ l de sobrenadante, que fue conservado, y se añadieron 5 μ l de los anticuerpos monoclonales (CD11b, CD33, HLA-DR y PD-L1) a una concentración final de 2,5 μ g/ml y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas se diluyeron en el sobrenadante conservado a un volumen final de 1000 μ l antes de ser adquiridas mediante el citómetro de flujo.

4.6. Determinación de PD-L1 y CD11b citoplasmáticos

Para determinar la expresión de PD-L1 y CD11b a nivel citoplasmático en muestras de médula ósea, se recogió el volumen necesario de muestra para obtener 1×10^6 células nucleadas y se lisaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con solución lisante de cloruro de amonio 1x, añadiendo un volumen 10 veces superior al de la muestra. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con HBSS y se diluyeron en 1 ml de etanol al 70% con el objetivo de fijar y permeabilizar la membrana plasmática. Se guardaron *overnight* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en el momento de la preparación se volvieron a lavar dos veces con HBSS. Se diluyeron en 100 μl de HBA y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente con 2 μl de DAPI (CF = 6 μM) y 5 μl de los anticuerpos monoclonales PD-L1 y CD11b a una concentración final de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Seguidamente, se diluyeron en un volumen final de 1000 μl con HBA para adquirirlas mediante citometría de flujo. Se analizaron los niveles de PD-L1 y CD11b conjuntamente con el ciclo celular.

4.7. Ensayo de competición de anticuerpo monoclonal y fármaco para PD-L1

Para determinar si el anticuerpo anti-PD-L1 se unía al mismo sitio o a un lugar próximo de la molécula PD-L1 que durvalumab, el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 utilizado en inmunoterapia, se realizó un ensayo de competición del anticuerpo y el fármaco.

Para cada muestra, se prepararon 1×10^6 células nucleadas diluidas en 100 μl de HBA en 7 tubos y todos se marcaron con 1 μl de DCV (CF = 50 μM) o 10 μl Hoechst 33342 (CF = 0,2 mM) y 10 μl de FBS, para bloquear uniones inespecíficas, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos en un baño dedicado y protegido de la luz. Se añadieron 900 μl de HBA y se procedió a la estimulación celular añadiendo a 6 tubos 1 μl de

PMA (CF = 1,63 μM) y al tubo restante 1 μl de DMSO, actuando como control negativo. Los tubos se incubaron a 37 °C en un baño dedicado y protegido de la luz durante 5 minutos.

Una vez estimuladas, las células se centrifugaron y se aspiraron 900 μl de sobrenadante, que fue conservado. En todos los tubos se añadieron 5 μl de los anticuerpos monoclonales (CD11b, CD33, HLA-DR y PD-L1) a una concentración final de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. En los tubos estimulados en presencia de PMA se añadieron 5 μl de durvalumab a concentraciones crecientes (0; 0,025; 0,25; 2,5; 25 y 250 $\mu\text{g/ml}$). Todos los tubos se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas se diluyeron en el sobrenadante conservado a un volumen final de 1000 μl . Se añadieron 2 μl de 7-AAD a una concentración final de 1,5 μM antes de ser adquiridas en el citómetro de flujo, para poder discriminar las células con la membrana celular comprometida de aquellas con la membrana celular intacta.

5. ANÁLISIS DE DATOS

Análisis de archivos de citometría de flujo:

Todos los archivos obtenidos a partir de la adquisición de muestras en los citómetros de flujo se analizaron utilizando los siguientes programas informáticos:

- FlowJo versión 10.5.3 (Tree Star, Inc.)
- FCS Express 5 Flow Research Edition (De Novo™ Software)
- Attune™ NxT Software versión 2.6 (Applied Biosystems™)
- Attune™ Cytometric Software versión 1.2.5 (Applied Biosystems™)

Estos programas de análisis de datos de citometría de flujo permitieron determinar el número de eventos adquiridos, el porcentaje de eventos, la concentración de

eventos por microlitro de muestra adquirida, intensidad de la fluorescencia y desviación estándar robusta de la mediana de la intensidad de la fluorescencia. Para ello, se analizaron los archivos seleccionando las células de interés mediante la realización de las regiones apropiadas y aplicando estas regiones a los *density* o *contour plots*. Una vez delimitada la región de interés, se pudieron obtener los parámetros mencionados. También estos programas permitieron realizar las compensaciones electrónicas de los espectros de emisión necesarias pre- y post-adquisición y los *density* o *contour plots* representados.

Métodos estadísticos utilizados en el primer trabajo:

En el primer trabajo, se realizó el análisis de la curva de la característica operativa del receptor (*receiver operating characteristic*, ROC), el área bajo la curva y el análisis de la sensibilidad y especificidad para medir la potencia pronóstica del test de la actividad fosfatasa alcalina en la predicción de la supervivencia libre de eventos (*event-free survival*, EFS). El punto de corte óptimo se identificó de acuerdo con el índice de Youden (281), para clasificar a los pacientes en dos grupos. Las diferencias entre variables categóricas de cada grupo se compararon utilizando la prueba exacta bilateral de Fisher. Las diferencias entre variables continuas de cada grupo se compararon utilizando la prueba de la suma de rangos bilateral de Wilcoxon. El EFS y la supervivencia global (*overall survival*, OS) se estimaron mediante el método descrito por Kaplan y Meier (282). El EFS se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la progresión, recaída, muerte por cualquier causa o la última fecha de seguimiento. El OS se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa o la última fecha de seguimiento. El seguimiento de los pacientes que se sometieron a un TPH fue censurado en el momento del trasplante. Las diferencias de supervivencia de cada grupo se analizaron empleando la prueba bilateral log-rank con el método de Bonferroni para ajustar el p-valor. El análisis univariado

según el modelo de riesgo proporcional de Cox se utilizó para investigar el impacto del porcentaje de blastos ALP^{high} en el diagnóstico sobre el EFS y el OS, junto con los siguientes factores: edad, sexo, grupo de riesgo ELN 2017, porcentaje de blastos, recuento de leucocitos y tipo de LMA (*de novo* o secundaria). Los factores pronósticos para el EFS y el OS con un p-valor < 0,5 en el análisis univariado se estudiaron en el análisis multivariado según el modelo de riesgo proporcional de Cox. Un p-valor < 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático R Studio, versión 1.1.463.

Análisis de datos del segundo trabajo:

Para realizar los gráficos del segundo trabajo, se utilizaron los programas informáticos GraphPad Prism versión 4.0a (GraphPad© Software) y Microsoft® Excel® versión 2016.

RESULTADOS

Trabajo I: Identificación de progenitores leucémicos con elevada actividad fosfatasa alcalina y relación con la recaída y enfermedad refractaria en leucemia aguda

1. INTRODUCCIÓN

La fosfatasa alcalina (*alkaline phosphatase*, ALP) es una enzima de 140 kD con una estructura dimérica capaz de unir iones de zinc y magnesio en diferentes sitios de unión para estimular o inhibir su reacción catalítica. Su función principal es hidrolizar los grupos fosfato de un amplio espectro de sustratos fisiológicos. En humanos, se han identificado cuatro formas de la ALP: [1] una de ellas restringida al intestino (283), [2] una restringida a la placenta (284), [3] una restringida a células germinales y teratomas (285), y [4] otra distribuida ampliamente en hígado, huesos y riñones (286,287).

La actividad ALP fue descrita inicialmente mediante un estudio histoquímico como marcador para varios tejidos, y fue especialmente relacionada con la formación ósea en tumores osteogénicos de ratón (288). Para ello, los autores utilizaron una técnica de detección de la ALP basada en la deposición de fosfato cálcico en el sitio de la acción de la enzima. Posteriormente, se utilizó como un marcador histoquímico en las células de carcinoma embrionario, sirviendo para identificar dos formas enzimáticas relacionadas con poblaciones de células madre y con células embrionarias del ectodermo (285).

Actualmente, la actividad ALP se utiliza como marcador de células madre pluripotentes, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y células germinales embrionarias (289). Los métodos para detectar los niveles de la enzima incluyen técnicas como el *western blot*, ELISA y la utilización de sustratos cromogénicos en combinación con la inmunohistoquímica. Más recientemente, han sido desarrollados diferentes sustratos fluorescentes o quimioluminiscentes que resultan ser altamente sensibles tanto para células viables como fijadas (269). Por otro lado, los niveles de fosfatasa alcalina sérica evaluados mediante métodos bioquímicos rutinarios tienen una gran utilidad como valor de referencia, estando alterados en diversas afecciones (290,291).

La actividad ALP se encuentra alterada en numerosas patologías. Por un lado, la actividad fosfatasa alcalina neutrofilica resulta incrementa en procesos infecciosos. Además, diversos estudios han analizado la actividad ALP neutrofilica en policitemia vera (292), leucemia mieloide crónica (293) y hemoglobinuria paroxística nocturna (294).

La leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B) son neoplasias hematológicas caracterizadas por la acumulación de progenitores hematopoyéticos leucémicos en la médula ósea, con capacidad de expandirse a sangre periférica y a otros tejidos. A pesar de los avances terapéuticos actuales, la mayoría de pacientes experimenta recaídas después de la remisión o manifiesta enfermedad refractaria.

El propósito de este trabajo fue desarrollar una metodología basada en citometría de flujo para determinar la actividad fosfatasa alcalina en poblaciones de progenitores leucémicos primitivos involucrados en la recaída, la persistencia de la enfermedad y la supervivencia global en pacientes de leucemia aguda.

A continuación, se presentan los resultados de la validación de la metodología, de los primeros experimentos de la aplicación de la esta metodología en casos de pacientes con leucemia aguda refractaria, y del estudio prospectivo que consistió en el análisis de 43 pacientes en el momento del diagnóstico de leucemia mieloide aguda en el cual se investigó la asociación de la actividad ALP en el diagnóstico con el pronóstico de los mismos.

2. RESULTADOS

2.1. Desarrollo de una metodología para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina en combinación con el inmunofenotipado mediante citometría de flujo

2.1.1. APLS no resulta tóxico a nivel celular y su fluorescencia se mantiene estable en el tiempo

Con el propósito de identificar células primitivas en leucemia aguda, se modificó el método aplicado a la determinación de la actividad fosfatasa alcalina de células madre basado en la detección de un sustrato fluorogénico de la enzima (269). La técnica original, que utiliza microscopía de fluorescencia, fue adaptada para ser utilizada mediante citometría de flujo. El sustrato utilizado, denominado *Alkaline Phosphatase Live Stain* (APLS), es un sustrato permeable que difunde a través de la membrana plasmática de las células y es catalizado por la enzima fosfatasa alcalina.

En primer lugar, se comprobó que la fluorescencia emitida por el sustrato se mantuviera estable a lo largo del tiempo y que el sustrato no resultara tóxico a nivel celular. En la **Figura 24** se muestra el análisis de la detección de la fluorescencia emitida por APLS tras su incubación ($t = 0$ min) y en muestras mantenidas a temperatura ambiente y a 4 °C durante un periodo de 30, 60, 90 y 120 minutos con posterioridad a la incubación. No se observó pérdida celular dado que las concentraciones se mantuvieron constantes en las células mantenidas a temperatura ambiente ($82,32 \pm 2,26$ células/ μ l). A 4 °C, la concentración celular disminuyó a partir de 90 minutos. La mediana de la intensidad de la fluorescencia (*median fluorescence intensity*, MFI) no varió sustancialmente.

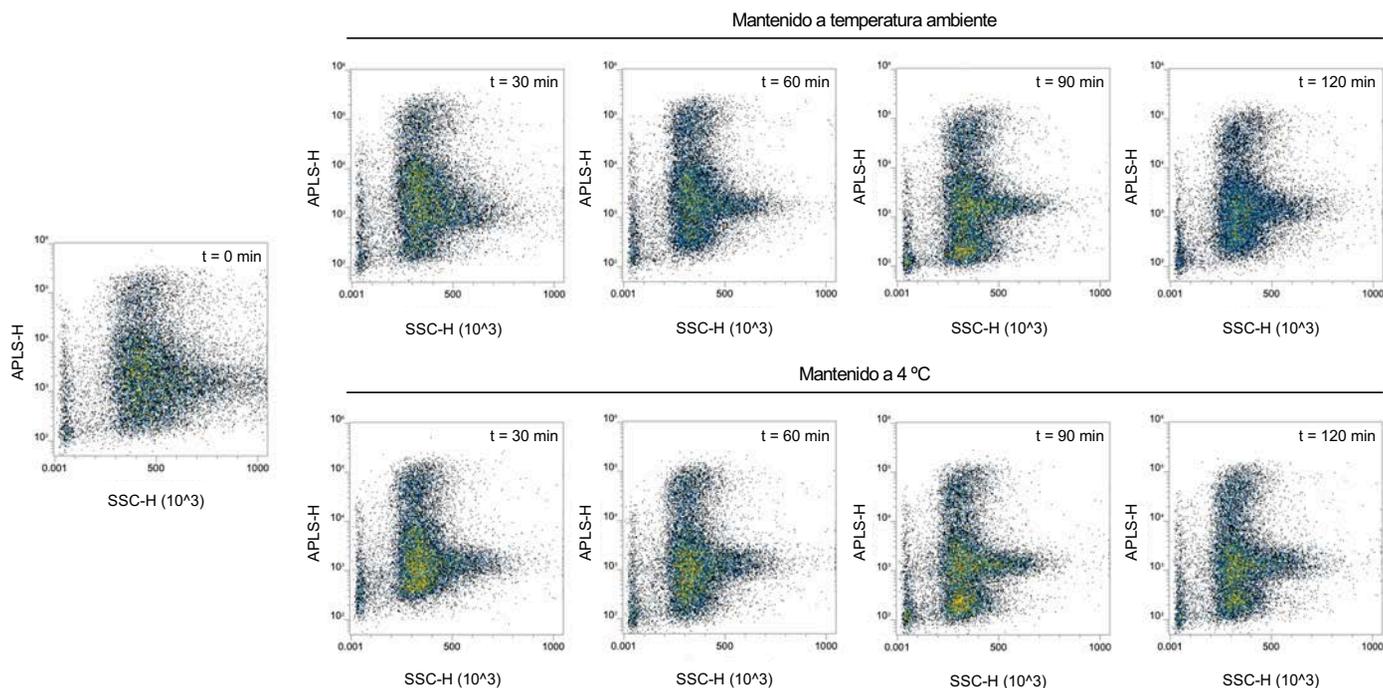


Figura 24. Estabilidad de la fluorescencia de APLS y de la concentración celular a lo largo del tiempo. Análisis mediante citometría de flujo de una muestra de sangre incubada con APLS. El análisis se realizó tras la incubación ($t = 0$) y tras un periodo de 30, 60, 90 y 120 minutos con posterioridad a la incubación, manteniendo las muestras a temperatura ambiente y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los *density plots* muestran la fluorescencia del sustrato APLS para los leucocitos respecto al *side scatter* (SSC). Los valores de concentración celular (eventos/ μl) y MFI fueron los siguientes: $t = 0$ min: 81,33 y 462665; $t = 30$ min: 80,58 y 353905 (temperatura ambiente) y 82,24 y 342117 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$); $t = 60$ min: 80,23 y 348645 (temperatura ambiente) y 83,92 y 334690 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$); $t = 90$ min: 83,66 y 351198 (temperatura ambiente) y 70,71 y 328122 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$); $t = 120$ min: 84,82 y 350860 (temperatura ambiente) y 71,22,24 y 331743 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher).

2.1.2. APLS no es extruido por el transportador multidroga ABCG2

Debido a que la mayoría de células madre primitivas y refractarias pueden expresar transportadores multidroga como ABCG2 (295), se realizó un experimento de extrusión para comprobar si el sustrato APLS podría ser expulsado por este transportador y así ser validado como marcador de células madre resistentes a la quimioterapia. La línea celular KB, transfectada con el vector de expresión para el gen *ABCG2* y cultivada en presencia de mitoxantrone para expresión constante del transportador, se incubó en ausencia de APLS (control), en presencia del sustrato (APLS), y en presencia del sustrato y de verapamil (APLS + verapamil), un inhibidor del transportador ABCG2. Tanto en ausencia como en presencia del inhibidor, la MFI de APLS se mantuvo prácticamente idéntica (358156 y 302340, respectivamente), demostrando así que el sustrato APLS no es extruido por el transportador de membrana ABCG2 (Figura 25).

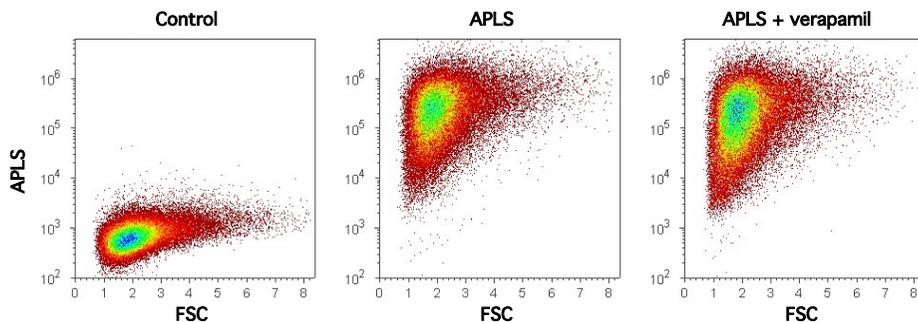


Figura 25. El sustrato APLS no es extruido por el transportador multidroga ABCG2. La línea celular KB, transfectada con el vector de expresión para el gen *ABCG2* (variante R482), fue incubada durante 1 hora en ausencia de APLS (control), en presencia del sustrato (APLS) y en presencia del sustrato y de verapamil (APLS + verapamil). Los *density plots* muestran la fluorescencia de APLS para las células KB respecto al *forward scatter* (FSC). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ (Thermo Fisher).

2.1.3. Las células de la *side population* presentan de forma diferencial actividad ALP según las concentraciones de oxígeno ambientales

La línea celular LN405 fue incubada en condiciones de hipoxia (5% de oxígeno) y en condiciones de normoxia (21% de oxígeno) de forma paralela. Las células fueron recogidas y preparadas para el análisis de las células *side population* (SPop) (280). En la **Figura 26** se muestran los resultados del análisis de la fluorescencia del sustrato APLS para células SPop en condiciones de normoxia e hipoxia.

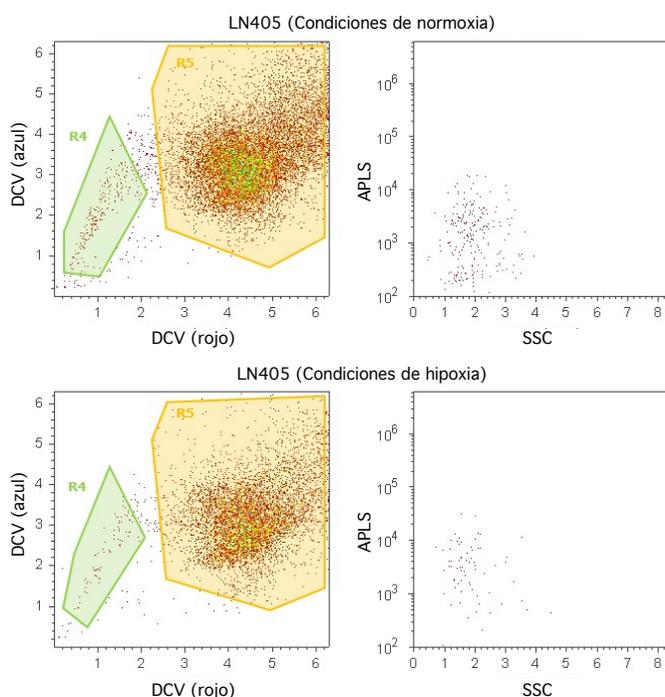


Figura 26. La actividad ALP en la *side population* presenta patrones de fluorescencia diferenciales en condiciones de normoxia e hipoxia. La línea celular LN405 fue cultivada paralelamente en condiciones de hipoxia (5% de oxígeno) y de normoxia (21% de oxígeno) y fue incubada con DyeCycle™ Violet (DCV) para el análisis de la SPop. El sustrato APLS se añadió en los últimos 20 minutos de incubación. Los *density plots* de citometría de flujo muestran la fluorescencia de APLS para la SPop (R4) respecto al SSC en condiciones de normoxia (A) e hipoxia (B). Las muestras fueron adquiridas en citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ (Thermo Fisher).

Se puede observar actividad ALP determinada por la fluorescencia emitida por el sustrato y que la MFI es diferencial según las concentraciones de oxígeno ambientales, con un valor de 1403 para condiciones de normoxia y un valor de 3251 para condiciones de hipoxia.

2.1.4. La línea celular KG-1a como control positivo de actividad fosfatasa alcalina

La línea celular KG-1a, derivada la médula ósea de una leucemia mieloide aguda de un paciente caucásico (296), se utilizó como control positivo de células con elevada actividad ALP. Las células KG-1a se incubaron con el sustrato APLS y el anticuerpo monoclonal PE-CD34 y se añadieron a la sangre periférica de un donante sano, también incubada en presencia de APLS.

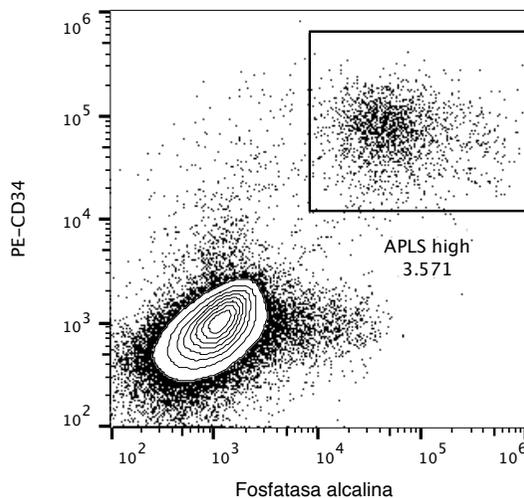


Figura 27. Determinación del punto de corte para la actividad ALP utilizando células de la línea celular KG-1a añadidas a sangre periférica de un donante sano. En términos de medición de la actividad ALP, los datos del control positivo son utilizados para demostrar que las mediciones son reproducibles. En este *contour plot* de citometría de flujo se muestran las células KG-1a (CD34⁺) con elevada actividad ALP (APLS high), separadas de las células nucleadas de la sangre del donante sano (CD34⁻) con actividad ALP basal. De esta manera, se establece el punto de corte de los casos de actividad ALP elevada y basal. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher).

En la **Figura 27** se muestra la intensidad de fluorescencia para APLS y el anticuerpo PE-CD34 tras la adición de células KG-1a, con expresión de CD34, a la sangre periférica obtenida de un donante sano. Se observa la elevada fluorescencia emitida por APLS en el control positivo y como se establece el punto de corte para los casos de actividad ALP elevada y basal.

2.1.5. Las soluciones de lisis de eritrocitos alteran la determinación de la actividad fosfatasa alcalina

En el estudio de la actividad fosfatasa alcalina en muestras biológicas de sangre y médula ósea (MO), las soluciones de lisis de eritrocitos pueden afectar a la funcionalidad celular y, por tanto, alterar a la determinación de la actividad ALP. Para determinar el efecto de estas soluciones lisantes, la línea celular KG-1a se incubó en presencia y ausencia del sustrato APLS y posteriormente se preparó utilizando las siguientes soluciones: (A) *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (aproximación NLNW); (B) una solución de lisis conteniendo cloruro de amonio; y (C) una solución de lisis conteniendo paraformaldehído.

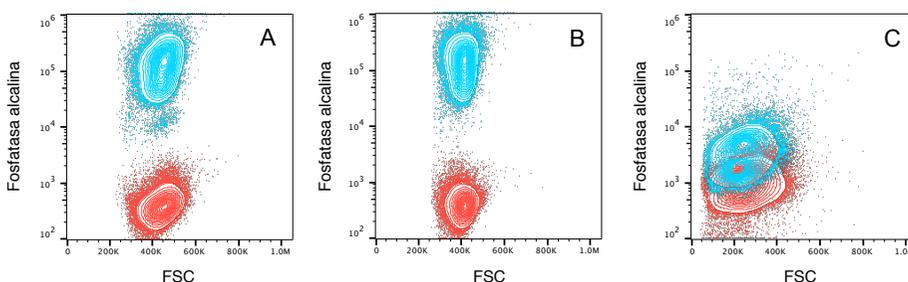


Figura 28. Efecto de diferentes soluciones lisantes de eritrocitos en la actividad ALP. La línea celular KG-1a se incubó en presencia de APLS (azul) y en ausencia de APLS (rojo) y posteriormente se preparó con una aproximación NLNW (A), con solución de lisis conteniendo cloruro de amonio (B) o con una solución de lisis conteniendo paraformaldehído (C). Los *contour plots* de citometría de flujo muestran la fluorescencia de APLS respecto al FSC de las células KG-1a. Los valores de la MFI para el APLS fueron: (A): 123191 (azul) y 376 (rojo); (B) 117339 (azul) y 367 (rojo); (C) 3189 (azul) y 1003 (rojo). Los valores del FSC fueron: (A) 408509; (B) 442631; (C) 237441. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher).

La **Figura 28** compara el análisis de la actividad fosfatasa alcalina en las células KG-1a sometidas a las diferentes soluciones lisantes de eritrocitos. La población roja corresponde a las células KG-1a en ausencia de APLS (autofluorescencia) y la población representada en color azul corresponde a las células incubadas con APLS. Se observa que la fluorescencia de APLS disminuye notablemente en las células sometidas a la solución lisante conteniendo paraformaldehído, así como el FSC, que también se ve disminuido.

2.2. Determinación de la actividad ALP en leucemias agudas refractarias

Una vez establecida la metodología para determinar la actividad fosfatasa alcalina empleando métodos basados en protocolos NLNW, se obtuvieron muestras de leucemias agudas refractarias para determinar los niveles de actividad fosfatasa en células más primitivas, en este caso, caracterizadas por la expresión del marcador CD34. A continuación se exponen los resultados representativos del análisis de la actividad ALP en pacientes con leucemias agudas refractarias.

2.2.1. Caso 1: Células CD34⁺ con elevada actividad ALP detectadas en diferentes seguimientos de una leucemia linfoblástica aguda de precursores B refractaria

A continuación, se detalla el seguimiento de una paciente de 27 años diagnosticada en mayo de 2010 de una leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B) común con cariotipo normal (46,XX) (**Caso 1**). La RT-qPCR no detectó la presencia y expresión de las isoformas de p190 (e1a2, e1a3) y p210 (b3a2, b2a2, b3a3, b2a3) de los transcritos de fusión BCR-ABL1. Los resultados de FISH fueron negativos para los reordenamientos de 11q23 (*KMT2A*), p16(9p21) (*CDKN2A*) y *TCF3/PBX1*. La expresión antigénica detectada mediante

citometría de flujo multiparamétrica (CFM) en el momento del diagnóstico proporcionó el siguiente perfil: MPO 10%, CD79a citoplasmático 85%, CD3 citoplasmático 10%, TdT 42%, cadena μ 1%, CD34 88%, CD58 95% (87% coexpresado con CD19), CD66c 70%, y CD33 18%. En noviembre de 2012 la paciente experimentó su primera recaída, con un 40% de blastos CD34⁺ en la MO con el mismo fenotipo que en el diagnóstico. En febrero de 2013 recibió un TPH alogénico, con posterioridad a la administración de una terapia de rescate basada en fludarabina, citarabina, idarubicina y G-CSF. En febrero de 2015, la paciente experimentó una segunda recaída con un 88% de blastos en MO y recibió una tercera línea de tratamiento (vincristina, prednisona y daunorubicina) que no mostró eficacia, dado que dos semanas después la leucemia todavía persistía. Entre marzo y abril de 2015 la paciente recibió una cuarta línea de tratamiento (metotrexato y citarabina) que resultó también ineficaz y fue complementada con inotuzumab ozogamicina, consiguiendo remisión completa con enfermedad residual medible (ERM) negativa.

En agosto de 2015, la paciente fue sometida a un segundo TPH alogénico. Los aspirados de MO post-trasplante fueron compatibles con remisión completa con ERM negativa (0,0044%) y 100% de quimerismo el primer mes; y remisión completa con ERM positiva (0,033%) y 100% de quimerismo al tercer mes. La expresión de CD66c en los blastos decreció del 45% al 10% en la segunda y tercera recaída, respectivamente, mientras que la expresión de CD33 incrementó al 60%. En febrero de 2016 la paciente manifestó una tercera recaída con un 82% de blastos en la MO con fenotipo de LLA-B. En marzo de 2016 las condiciones de salud de la paciente empeoraron, siendo *exitus* en abril de 2016, transcurridos seis años del diagnóstico.

La **Figura 29** muestra el cronograma de los eventos producidos desde el diagnóstico hasta el fallecimiento de la paciente denominada Caso 1.

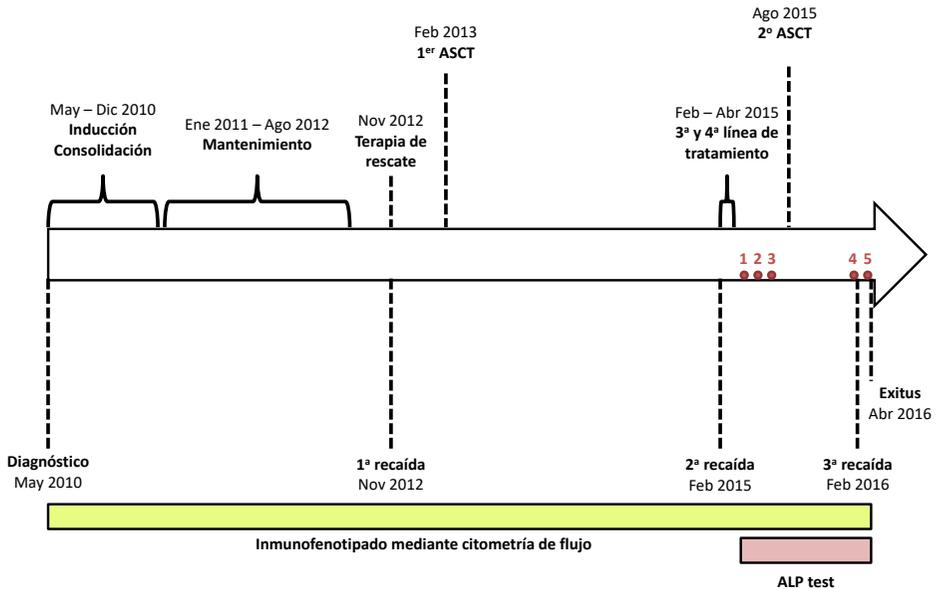


Figura 29. Cronograma de los tratamientos, intervenciones y el estado clínico de la paciente con LLA-B desde el diagnóstico hasta el exitus (Caso 1). La paciente fue inicialmente tratada con terapia de inducción basada en el protocolo PETHEMA-LLA-AR/03 para la LLA-B de alto riesgo, una terapia de consolidación y mantenimiento. Después de la primera recaída, la paciente recibió terapia de rescate (fludarabina, citarabina, idarubicina y G-CSF) y fue sometida a un TPH alogénico. Dos años después, sufrió una segunda recaída y recibió terapia de tercera y cuarta línea y un segundo TPH alogénico. Posteriormente, sufrió una tercera recaída y sus condiciones empeoraron hasta ser *exitus* en abril de 2016, seis años después del diagnóstico. Los círculos rojos numerados del 1 al 5 indican el análisis de la médula ósea para detectar la actividad fosfatasa alcalina (ALP test) en combinación con el marcaje de CD34.

La determinación de la actividad fosfatasa alcalina en combinación con el marcaje de CD34 se realizó entre mayo de 2015 y abril de 2016. Se analizaron 5 aspirados de MO paralelamente al análisis clínico. Además, mediante citometría de flujo, se analizó el ciclo celular y la ploidía de las células obtenidas de la MO. En el cuarto seguimiento, la actividad ALP se determinó también en sangre (S) periférica. Los resultados del análisis del ciclo celular en las 5 muestras de MO fueron los siguientes: 1) %G₁ = 92,5; %S = 1,97; %G₂ = 6,27; 2) %G₁ = 84,1; %S = 16; %G₂ = 0,844; 3) %G₁ = 89,7; %S = 8,56; %G₂ = 1,88; 4) %G₁ = 94; %S = 6,5; %G₂ =

0,9; 5) %G₁ = 80,2; %S = 19; %G₂ = 1,79. En el análisis ploidía reflejó un patrón diploide (índice del ADN = 1) (**Figura 30**).

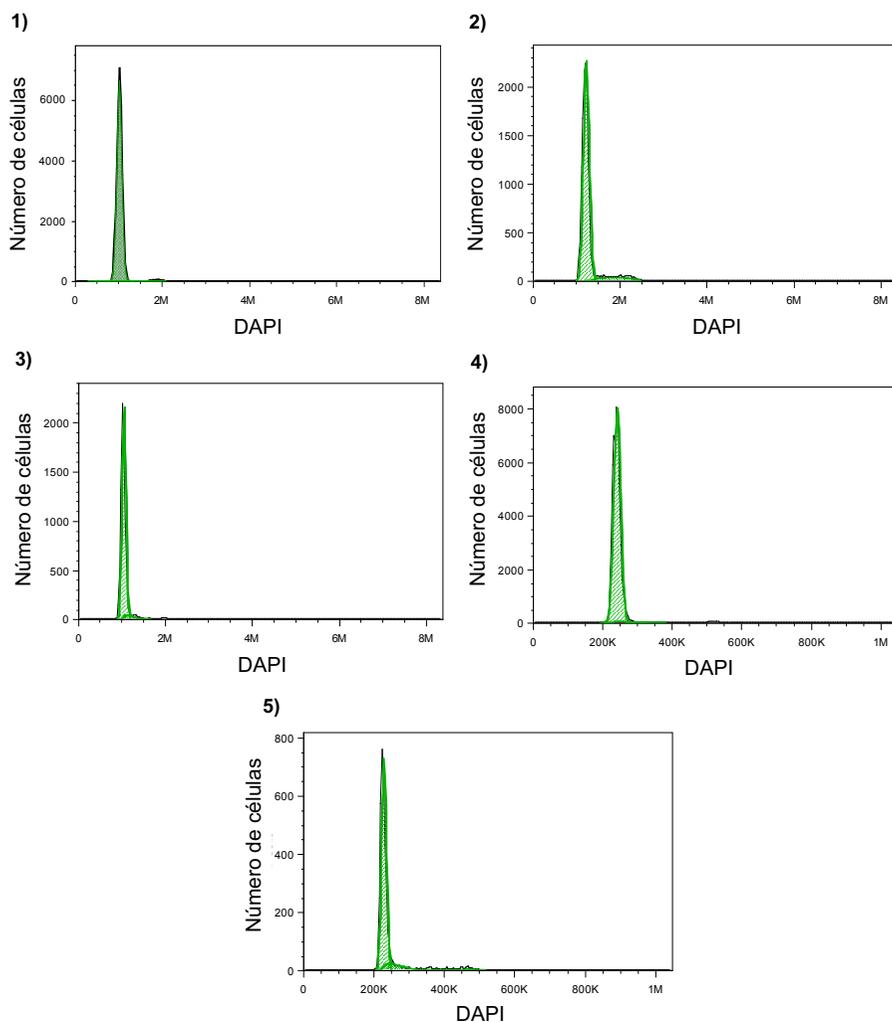


Figura 30. Análisis del ciclo celular y la ploidía en el seguimiento después de la segunda recaída, en la tercera recaída y después de la tercera recaída (Caso 1). El ciclo celular se analizó en 5 MO paralelamente al análisis de la actividad ALP. Los resultados fueron los siguientes: 1) %G₁ = 92,5; %S = 1,97; %G₂ = 6,27; 2) %G₁ = 84,1; %S = 16; %G₂ = 0,844; 3) %G₁ = 89,7; %S = 8,56; %G₂ = 1,88; 4) %G₁ = 94; %S = 6,5; %G₂ = 0,9; 5) %G₁ = 80,2; %S = 19; %G₂ = 1,79. El análisis de la ploidía reflejó un patrón diploide (índice del ADN = 1). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher).

Los resultados de la determinación de la actividad ALP para las 5 MO se presentan en la **Figura 31**, mostrando poblaciones celulares CD34⁺ con elevada actividad fosfatasa alcalina identificadas mediante regiones de selección.

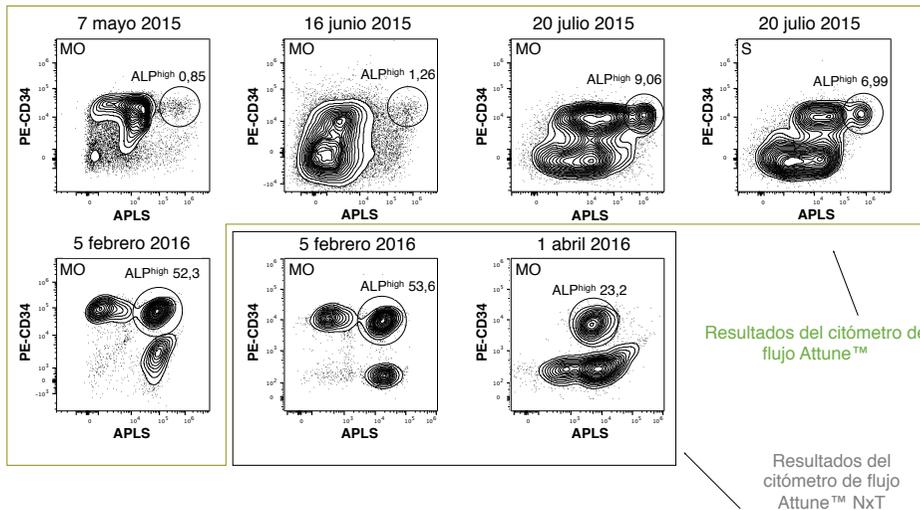


Figura 31. Células CD34⁺ de una leucemia linfoblástica aguda de precursores B refractaria mostrando elevados niveles de actividad fosfatasa alcalina (Caso 1). Contour plots de referencia para cinco muestras de aspirados de médula ósea (MO) y sangre (S) obtenidos en el último año de seguimiento del Caso 1. Las muestras no lisadas se marcaron con PE-CD34, APLS y DCV. La comparación y clasificación prospectiva de cinco muestras independientes correspondientes a la misma paciente muestran diferentes subpoblaciones de células CD34⁺. Cada región individual de selección representa células CD34⁺ con elevados niveles de actividad fosfatasa alcalina. Los resultados utilizando el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ se obtuvieron mediante excitación del láser azul para PE y APLS, mientras que los resultados utilizando citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT se obtuvieron mediante excitación dual (de láser azul para APLS y de láser verde/amarillo para PE). Las estadísticas de las regiones de selección representan el porcentaje de células CD34⁺/ALP^{high}.

La **Figura 32** muestra el análisis clínico del inmunofenotipado obtenido mediante citometría de flujo de la MO en el momento del diagnóstico, en la primera, segunda y en la tercera recaída (**Figura 32a**); y de la MO en tercera recaída y en progresión (**Figura 32b**).

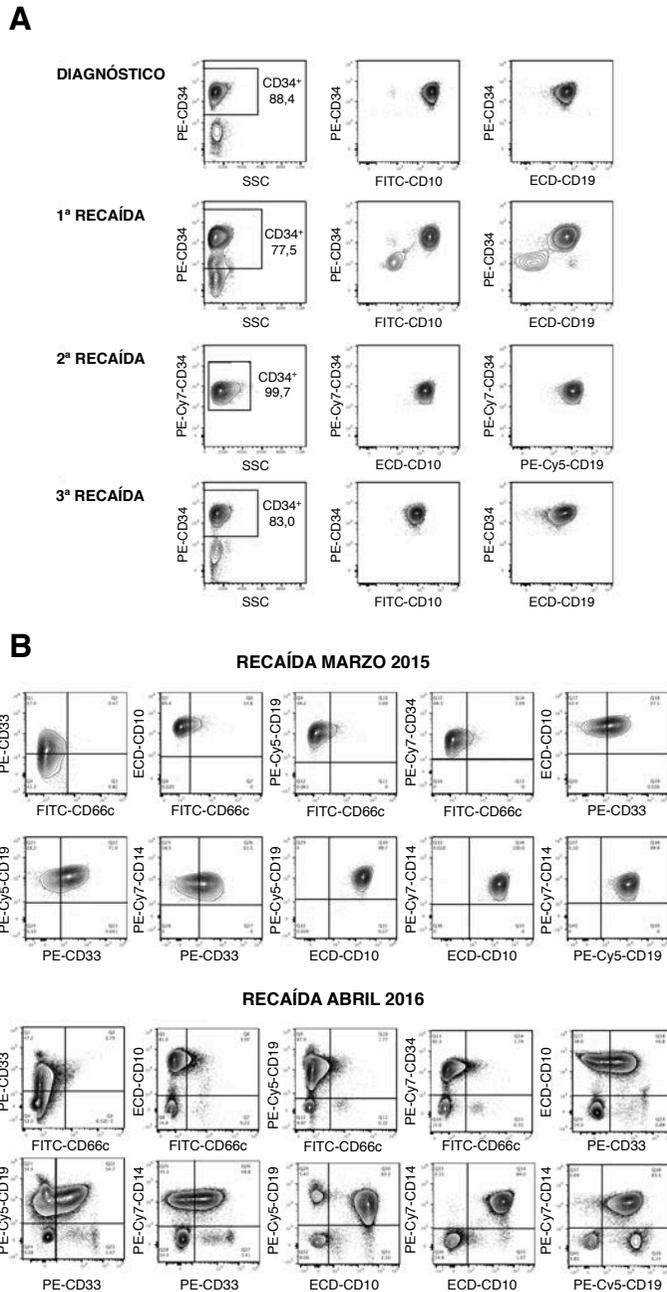


Figura 32. Poblaciones aparentemente clonales observadas en momento del diagnóstico y durante la recaída (Caso 1). Se muestran los *contour plots* del inmunofenotipado de la LLA-B para identificar poblaciones celulares en el diagnóstico y en la recaída, donde se muestra una expansión clonal de las células leucémicas CD34+/CD10+ y CD34+/CD19+ (A) y la caracterización de los linfoblastos para CD10, CD19, CD33, CD34 y CD66c en la tercera recaída (marzo 2016) y la progresión previa al *exitus* (abril 2016) (B).

2.2.2. Caso 2: Células CD34⁺ con elevada actividad ALP detectadas en el diagnóstico y la recaída de una leucemia linfoblástica aguda de precursores B refractaria

Adicionalmente, se analizaron independientemente dos aspirados de médula ósea en el momento del diagnóstico y tras la recaída de una paciente de 66 años diagnosticada en mayo de 2015 de una leucemia linfoblástica aguda B común con hiperdiploidía (54,XX) (**Caso 2**).

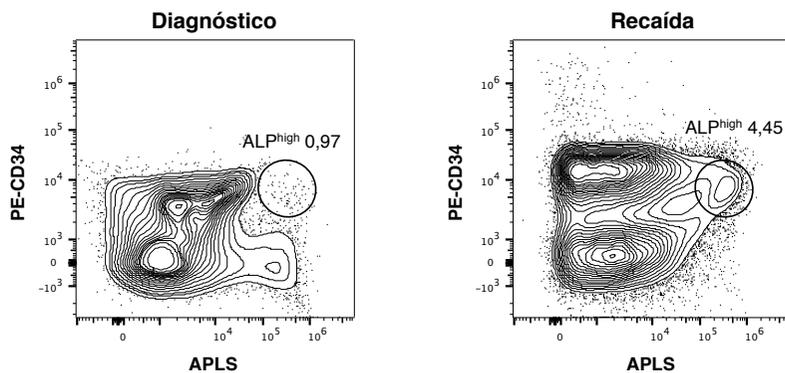


Figura 33. Células CD34⁺ con elevada actividad ALP detectadas en el diagnóstico y la recaída de una leucemia linfoblástica aguda de precursores B refractaria (**Caso 2**). *Contour plots* de referencia para dos muestras de aspirados de médula ósea obtenidos del Caso 2, mostrando el resultado del test ALP combinado con el marcaje de CD34. La comparación y clasificación prospectiva de las dos muestras correspondientes a la misma paciente muestran diferentes subpoblaciones de células CD34⁺. Cada región de selección representa células CD34⁺ con elevados niveles de actividad fosfatasa alcalina. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher). Las estadísticas de las regiones representan el porcentaje de células de la región de selección.

La RT-qPCR no detectó la presencia y expresión de los transcritos de fusión BCR-ABL1. La técnica de FISH resultó negativa para los reordenamientos de 11q23 (*KMT2A*). El inmunofenotipo determinado mediante citometría de flujo en el diagnóstico proporcionó el siguiente perfil antigénico: PAX5⁺, CD20⁺, CD34⁺, TdT⁺, CD10⁺ y CD99⁺; CD5⁻, CD3⁻, ciclina D1⁻ y BCL6⁻. La paciente siguió un tratamiento según el protocolo PETHEMA-LLA-07OLD y seis meses después

experimentó una recaída citológica. Recibió una nueva línea de terapia (vincristina y prednisona) durante dos semanas seguida de blinatumomab. Después del tratamiento, la ERM fue determinada buscando células con el LAIP establecido en el diagnóstico, obteniendo un 0,02% de células asociadas al inmunofenotipo (ERM positiva). La paciente experimentó una segunda recaída siendo *exitus* tres meses después. La determinación de la actividad ALP de las células CD34⁺ fue realizada a partir de la MO obtenida en el momento del diagnóstico y en la recaída (**Figura 33**). El análisis de la actividad ALP detecta la presencia de una población CD34⁺/ALP^{high} en ambos seguimientos analizados.

2.2.3. Casos 3-5: La actividad ALP no está restringida a células CD34⁺

Se observó que la actividad fosfatasa alcalina no estaba siempre restringida a las células leucémicas CD34⁺, sino que podría estar también incrementada en células CD34⁻. En la **Figura 34** se detalla el análisis de la actividad ALP combinada con el marcaje de CD34, donde se observan células con elevada actividad ALP tanto positivas como negativas para CD34.

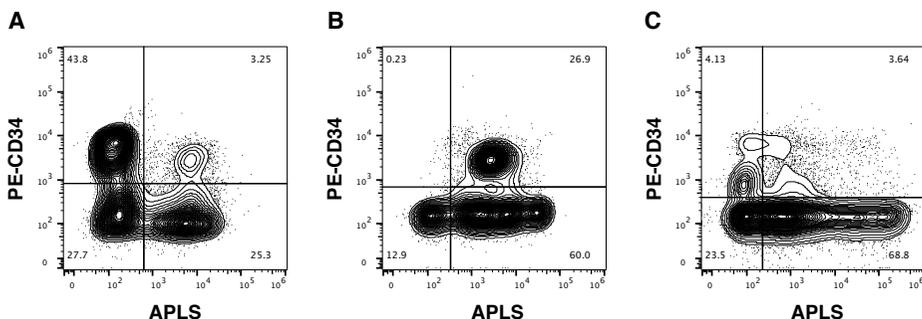


Figura 34. La actividad fosfatasa alcalina no está restringida a las células CD34 positivas.

Contour plots que representan el test ALP realizado a partir de una MO en el diagnóstico de un paciente de 61 años con un síndrome mielodisplásico que evolucionó a LMA (A); de una MO en el diagnóstico de un paciente de 78 años con una anemia refractaria con exceso de blastos que evolucionó a LMA (B); de una MO de un paciente de 12 años con una LLA pre-B durante la terapia de mantenimiento con una ERM indetectable (C). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher). Las estadísticas de las regiones representan el porcentaje de células.

La **Figura 34a** representa el test ALP de una MO en el momento del diagnóstico de un paciente de 61 años con un síndrome mielodisplásico que evolucionó a leucemia mieloide aguda. La **Figura 34b** representa el test ALP de una MO en el diagnóstico de un paciente de 78 años con una anemia refractaria con exceso de blastos que evolucionó a leucemia mieloide aguda. La **Figura 34c** representa el test ALP de una MO de un paciente de 12 años con una leucemia linfoblástica aguda pre-B durante la terapia de mantenimiento con una ERM indetectable.

2.3. Importancia de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina en el diagnóstico de la leucemia mieloide aguda

Una vez demostrada la existencia de células primitivas con elevados niveles de actividad fosfatasa alcalina en leucemias agudas refractarias, se quiso determinar la asociación de la actividad fosfatasa alcalina de los blastos más indiferenciados en el momento del diagnóstico de la leucemia mieloide aguda con la respuesta a la terapia. Concretamente, con el alcance de la remisión completa, la recaída o la persistencia de la enfermedad, y la supervivencia global. A continuación, se presentan los resultados del estudio prospectivo realizado en 43 pacientes de leucemia mieloide aguda en el momento del diagnóstico.

2.3.1. Características de los pacientes y pronóstico

Entre mayo del 2015 y mayo del 2018, un total de 106 pacientes fueron diagnosticados de leucemia mieloide aguda en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona). Después de aplicar los criterios de exclusión, se seleccionaron para este estudio 43 pacientes. Las características de los pacientes incluidos se muestran en la **Tabla 16** y en la **Tabla 17**.

Tabla 16. Características individuales de cada paciente diagnosticado de LMA y seleccionado para el estudio de la actividad fosfatasa alcalina

Paciente	Edad (años)	Sexo	Seguimiento (meses)	Tipo de LMA	Clasificación de la OMS (2017)	Pronóstico (ELN 2017)	Tipo de muestra	% Blastos	Leucocitos (x10 ⁹ /L)	Alteraciones citogenéticas
P01	81	M	2	Secundaria	LMA con maduración	Intermedio	Médula ósea	27	48,6	Cariotipo normal
P02	55	M	16	Secundaria	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Favorable	Sangre periférica	36	65,4	Cariotipo normal
P03	53	M	28	<i>De novo</i>	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Favorable	Médula ósea	28	39,7	Cariotipo normal
P04	65	M	18	<i>De novo</i>	Leucemia monoblástica/ monocítica aguda	Intermedio	Médula ósea	35	23,9	Cariotipo normal
P05	44	F	8	<i>De novo</i>	LMA con maduración	Adverso	Médula ósea	52	12,1	Cariotipo normal
P06	41	M	32	<i>De novo</i>	LMA con t(8;21)(q22;q22.1)	Favorable	Médula ósea	66	29,7	46,XY,t(8;21)(q22;q22)
P07	80	M	7	<i>De novo</i>	LMA sin maduración	Adverso	Médula ósea	78	1,1	t(11q23)
P08	54	F	31	<i>De novo</i>	Leucemia mielomonocítica aguda	Adverso	Médula ósea	43	1,7	Cariotipo complejo
P09	78	M	13	Secundaria	LMA con maduración	Intermedio	Médula ósea	27	0,5	Cariotipo normal
P10	54	M	25	<i>De novo</i>	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Favorable	Médula ósea	55	2,2	Cariotipo normal
P11	31	M	20	<i>De novo</i>	LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEPBA</i>	Favorable	Médula ósea	42	11,4	Cariotipo normal
P12	64	M	12	<i>De novo</i>	LMA con diferenciación mínima	Intermedio	Médula ósea	88	2,0	47,XY,+4
P13	43	M	28	<i>De novo</i>	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	Intermedio	Médula ósea	21	14,4	Cariotipo normal
P14	91	F	1	Secundaria	LMA con maduración	Adverso	Médula ósea	26	4,4	Cariotipo complejo
P15	64	M	28	<i>De novo</i>	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Favorable	Sangre periférica	78	35,2	Cariotipo normal
P16	73	M	1	Secundaria	Leucemia monoblástica/monocítica aguda	Intermedio	Sangre periférica	20	16,5	46,XY,add(12)(p13)
P17	39	F	22	<i>De novo</i>	LMA con <i>CBFB-MYH11</i>	Favorable	Médula ósea	78	45,90	46,XX,inv(16)(p13q22)
P18	74	M	9	Secundaria	LMA con diferenciación mínima	Adverso	Médula ósea	18	2,80	45,XY,-7
P19	76	M	15	<i>De novo</i>	LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEPBA</i>	Favorable	Médula ósea	53	104,87	Cariotipo normal

P20	75	M	14	De novo	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	Intermedio	Médula ósea	27	2,70	Cariotipo normal
P21	81	M	12	De novo	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Favorable	Médula ósea	46	12,00	Cariotipo normal
P22	26	M	28	De novo	Leucemia monoclonal/monocítica aguda	Intermedio	Médula ósea	93	8,60	46,XY,t(6;16)(q21;q22-24)
P23	80	F	8	De novo	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Intermedio	Médula ósea	63	53,30	Cariotipo normal
P24	44	F	10	De novo	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Favorable	Sangre periférica	39	91,00	Cariotipo normal
P25	73	F	4	Secundaria	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	Intermedio	Médula ósea	32	0,70	46,X,del(X)(q22q26)
P26	76	M	2	De novo	LMA con diferenciación mínima	Adverso	Médula ósea	98	127,50	Cariotipo complejo
P27	78	M	11	De novo	LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEPBA</i>	Favorable	Médula ósea	45	39,30	Cariotipo normal
P28	27	M	6	De novo	Leucemia mielomonocítica aguda	Intermedio	Médula ósea	18	5,10	46,XY,t(3;3)(q21;q26)
P29	80	M	4	Secundaria	LMA sin maduración	Intermedio	Médula ósea	76	1,30	Cariotipo normal
P30	61	M	12	De novo	LMA sin maduración	Intermedio	Médula ósea	52	87,80	46,XY,del(7)(q22)
P31	47	M	28	De novo	LMA con <i>NPM1</i> mutada	Intermedio	Médula ósea	54	5,90	Cariotipo normal
P32	71	F	5	De novo	LMA con maduración	Intermedio	Médula ósea	60	2,50	46,XX,add(16)(q24)
P33	64	F	16	De novo	Leucemia monoclonal/monocítica aguda	Adverso	Médula ósea	31	249,10	47,XX,+8
P34	44	F	3	De novo	Leucemia monoclonal/monocítica aguda	Intermedio	Médula ósea	30	5,70	Cariotipo normal
P35	79	F	3	De novo	LMA con <i>CBFB-MYH11</i>	Favorable	Médula ósea	80	7,10	47,XX,+8,inv(16)(p13q22)
P36	77	M	1	Secundaria	LMA con maduración	Intermedio	Sangre periférica	55	3,80	47,XY,+8
P37	81	F	22	Secundaria	LMA con maduración	Intermedio	Médula ósea	44	1,50	Cariotipo normal
P38	61	F	36	De novo	Leucemia mielomonocítica aguda	Intermedio	Médula ósea	71	8,50	47,XX,+8
P39	78	M	7	Secundaria	LMA con maduración	Intermedio	Médula ósea	21	3,30	47,XY,+8
P40	67	M	4	Secundaria	LMA relacionada con la terapia	Intermedio	Médula ósea	20	3,90	46,XY,del(7)(q22q36)
P41	68	M	3	Secundaria	LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	Intermedio	Médula ósea	36	5,30	46,XY,-10min
P42	48	M	16	De novo	LMA con t(8;21)(q22;q22.1);	Favorable	Médula ósea	82	12,80	47,XY,t(8;21)(q22;q22),+15
P43	75	M	2	De novo	Leucemia mielomonocítica aguda	Intermedio	Médula ósea	50	5,30	47,XY,+8

Tabla 16 (continuación). Características individuales de cada paciente diagnosticado de LMA y seleccionado para el estudio de la actividad fosfatasa alcalina

Paciente	Alteraciones moleculares	Marcadores de blastos	Tratamiento inicial	TPH alogénico	Tiempo a TPH (meses)	Tiempo a RC (meses)	Tiempo a recaída (meses)	Supervivencia (meses)	% ALP ^{High} diagnóstico
P01	No	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	1	2	0,26
P02	<i>NPM1</i> mutada	CD34-/CD117+/CD123+	Citarabina + Idarubicina	SÍ	4	7	no alcanzada	no alcanzada	1
P03	<i>NPM1</i> mutada	CD34-/CD117+/CD123+	Citarabina + Idarubicina	NO	-	2	no alcanzada	no alcanzada	1,12
P04	<i>FLT3</i> -ITD	CD34-/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	SÍ	3	1	no alcanzada	no alcanzada	1,2
P05	<i>FLT3</i> -ITD	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Idarubicina + quizatínib	NO	-	1	no alcanzada	no alcanzada	1,62
P06	No	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Idarubicina	NO	-	10	no alcanzada	no alcanzada	1,71
P07	No	CD34+/CD117+/CD123-	Azacitidina	NO	-	6	1	no alcanzada	2,65
P08	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	SÍ	5	18	no alcanzada	no alcanzada	4,96
P09	No	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	11	13	5,02
P10	<i>NPM1</i> mutada	CD34-/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	NO	-	1	no alcanzada	no alcanzada	5,35
P11	<i>CEBPA</i> mutado	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	NO	-	1	no alcanzada	no alcanzada	6,53
P12	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	NO	-	no alcanzada	3	12	8,1
P13	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	SÍ	10	3	4	no alcanzada	9,07
P14	No	CD34+/CD117+/CD123+	No	NO	-	no alcanzada	no alcanzada	1	9,53
P15	<i>NPM1</i> mutada	CD34-/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	NO	-	5	no alcanzada	no alcanzada	9,82
P16	No	CD34-/CD117-/CD123+	Decitabina	NO	-	no alcanzada	no alcanzada	1	11,98
P17	<i>KIT</i> mutado	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarubicina	SÍ	18	1	14	no alcanzada	13,83
P18	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	3	9	15,49
P19	<i>CEBPA</i> mutado	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	7	15	17,09

P20	No	CD34+/CD123+/CD117+	Azacitidina	NO	-	no alcanzada	3	14	17,64
P21	<i>NPM1</i> mutada	CD34-/CD117+/CD123+	Azacitidina	NO	-	no alcanzada	9	12	17,89
P22	No	CD34-/CD123+/CD117-	Citarabina + Idarrubicina	NO	-	9	7	28	18,33
P23	<i>NPM1</i> mutada / <i>FLT3</i> -ITD	CD34-/CD123+/CD117+	Azacitidina	NO	-	no alcanzada	1	no alcanzada	18,97
P24	<i>NPM1</i> mutada / <i>FLT3</i> -ITD	CD34-/CD117+/CD123+	Citarabina + Idarrubicina	NO	-	no alcanzada	9	10	19
P25	No	CD34+/CD117+/CD123+	Decitabina	NO	-	no alcanzada	1	4	20,75
P26	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	1	2	20,84
P27	<i>CEBPA</i> mutado	CD34+/CD123+/CD117+	Azacitidina	NO	-	no alcanzada	9	11	21,75
P28	No	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Idarrubicina	SÍ	4	no alcanzada	1	6	22,29
P29	No	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	1	4	22,89
P30	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarrubicina	SÍ	8	no alcanzada	1	12	23,76
P31	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarrubicina	SÍ	2	2	no alcanzada	no alcanzada	24,71
P32	No	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	3	5	25,34
P33	<i>FLT3</i> -ITD	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarrubicina + quizatinib	SÍ	6	6	4	no alcanzada	26,03
P34	No	CD34-/CD123+/CD117-	Citarabina + Idarrubicina	NO	-	no alcanzada	2	3	26,91
P35	<i>FLT3</i> -TKD	CD34+/CD117+/CD123+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	2	3	29,8
P36	No	CD34-/CD117+/CD123+	No	NO	-	no alcanzada	no alcanzada	1	30,39
P37	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	2	14	22	35,27
P38	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarrubicina	SÍ	6	18	29	36	35,91
P39	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	5	7	37,77
P40	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Fludarabina	NO	-	no alcanzada	1	4	54,95
P41	No	CD34+/CD117+/CD123-	Citarabina + Idarrubicina	SÍ	2	no alcanzada	1	3	95,92
P42	No	CD34+/CD123+/CD117+	Citarabina + Idarrubicina	SÍ	7	3	1	no alcanzada	96,63
P43	No	CD34+/CD117+/CD123-	Azacitidina	NO	-	no alcanzada	1	2	96,63

Tabla 17. Características agrupadas de los pacientes diagnosticados de LMA y seleccionados para el estudio de la actividad ALP

	Pacientes (n = 43), n (%)	Blastos ALP ^{high} , mediana (rango), %
Edad en el diagnóstico		
< 70 años	23 (53,5)	13,83 (1,00 - 96,63)
> 70 años	20 (46,5)	19,86 (0,26 - 96,63)
Sexo		
- Hombre	30 (69,8)	17,36 (0,26 - 96,63)
- Mujer	13 (30,2)	20,75 (1,62 - 35,91)
Tipo de LMA		
- <i>de novo</i>	30 (69,8)	18,11 (1,20 - 96,63)
- secundaria	13 (30,2)	20,75 (1,00 - 95,92)
Clasificación de la OMS (2017)		
- LMA con alteraciones genéticas recurrentes		
- LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	2 (4,7)	49,17 (1,71 - 96,63)
- LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22)	2 (4,7)	21,81 (13,83 - 29,80)
- LMA con <i>NPM1</i> mutada	8 (18,6)	13,85 (1,00 - 24,71)
- LMA con mutaciones bialélicas <i>CEBPA</i>	3 (7,0)	17,09 (6,53 - 21,75)
- LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	4 (9,3)	19,19 (9,07 - 95,92)
- LMA relacionada con la terapia	1 (2,3)	54,95 (54,95 - 54,95)
- LMA no especificada de otro modo		
- LMA con diferenciación mínima	3 (7,0)	15,49 (8,10 - 20,84)
- LMA sin maduración	3 (7,0)	22,89 (2,65 - 23,76)
- LMA con maduración	8 (18,6)	17,43 (0,26 - 37,77)
- Leucemia mielomonocítica aguda	4 (9,3)	29,10 (4,96 - 96,63)
- Leucemia monoblástica/monocítica aguda	5 (11,6)	18,33 (1,20 - 26,91)
Alteraciones citogenéticas		
- Cariotipo normal	20 (46,5)	13,45 (0,26 - 35,27)
- inv(16)(p13.1;q22)	2 (4,7)	21,81 (13,83 - 29,80)
- Monosomía 7 o del 7q	3 (7,0)	23,76 (15,49 - 54,95)
- Trisomía 8	5 (11,6)	35,91 (26,03 - 96,63)
- t(8;21)(q22;q22.1)	2 (4,7)	49,17 (1,71 - 96,63)
- t(11q23)	1 (2,3)	2,65 (2,65 - 2,65)
- Cariotipo complejo	3 (7,0)	9,53 (4,96 - 20,84)
- Otros	7 (16,3)	20,75 (8,10 - 95,92)
Alteraciones moleculares		
- <i>NPM1</i> mutada sin <i>FLT3</i> -ITD	5 (11,6)	5,35 (1,00 - 17,89)
- <i>FLT3</i> -ITD con o sin <i>NPM1</i> mutada	5 (11,6)	18,97 (1,20 - 26,03)
- <i>FLT3</i> -TKD	1 (2,3)	29,8 (29,8 - 29,8)
- <i>CEBPA</i> mutado	3 (7,0)	17,09 (6,53 - 21,75)
- <i>KIT</i> mutado	1 (2,3)	13,83 (13,83 - 13,83)
- <i>Wild type</i>	28 (65,1)	21,56 (0,26 - 96,63)
Grupo de riesgo citogenético y molecular (ELN 2017)		
- Favorable	13 (30,2)	13,83 (1,00 - 96,63)
- Intermedio	23 (53,5)	22,89 (0,26 - 96,63)
- Adverso	7 (16,3)	9,53 (1,62 - 26,03)

Tabla 17 (continuación). Características agrupadas de los pacientes diagnosticados de LMA y seleccionados para el estudio de la actividad ALP

	Pacientes (n = 43), n (%)	Blastos ALP ^{high} , mediana (rango), %
Marcadores de blastos relevantes		
- CD34+/CD123+/CD117+	28 (65,1)	20,79 (0,26 - 96,63)
- CD34+/CD123-/CD117+	3 (7,0)	95,92 (2,65 - 96,63)
- CD34-/CD123+/CD117+	9 (20,9)	9,82 (1,00 - 30,39)
- CD34-/CD123+/CD117-	3 (7,0)	18,33 (11,98 - 26,91)
Tratamiento inicial		
- CETLAM12<70*	20 (46,5)	11,82 (1,00 - 96,63)
- CETLAM12>70†	5 (11,6)	15,49 (0,26 - 35,27)
- Ensayo clínico FLUGAZA‡	11 (25,6)	21,75 (17,64 - 96,63)
- Otro§	7 (16,3)	11,98 (1,62 - 30,39)
Terapia post-remisión		
- TPH alogénico	12 (28,0)	23,02 (1,00 - 96,63)
- Otra	31 (72,0)	17,89 (0,26 - 96,63)

* Citarabina + idarubicina † Citarabina + fludarabina ‡ Citarabina + fludarabina / Azacitidina § Azacitidina / Decitabina / Citarabina + idarubicina + quizatinib o placebo / Ninguno

La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico fue de 67 años (rango 26 - 91 años). De los 43 pacientes, 20 (46,5%) tenían más de 70 años de edad y 23 (53,5%) eran menores de 70. En total, 29 (67,4%) eran hombres y 14 (32,6%), mujeres. La mediana de seguimiento para determinar la supervivencia global (*overall survival*, OS) y la supervivencia libre de eventos (*event-free survival*, EFS) fue de 12 meses. El OS y el EFS a los 30 meses de todos los pacientes fue del 21,3% y del 19%, respectivamente (**Figura 35a y 35b**). También se compararon las diferencias del OS y del EFS entre los grupos de riesgo (adverso, intermedio o favorable) en los que se incluyeron los pacientes (**Figura 35c y 35d**). El OS de los pacientes pertenecientes al grupo de riesgo favorable fue significativamente mayor respecto al OS de los pacientes de los grupos intermedio y adverso (p-valor = 0,019 y 0,032; respectivamente). El EFS de los pacientes pertenecientes al grupo de riesgo favorable fue significativamente mayor respecto al EFS de los pacientes del grupo intermedio, pero no respecto a los pacientes del grupo adverso (p-valor = 0,0027 y 0,169; respectivamente). Los

pacientes de los grupos intermedio y adverso no presentaron diferencias significativas en cuanto a OS ni a EFS (p -valor = 0,973 y 1,000; respectivamente).

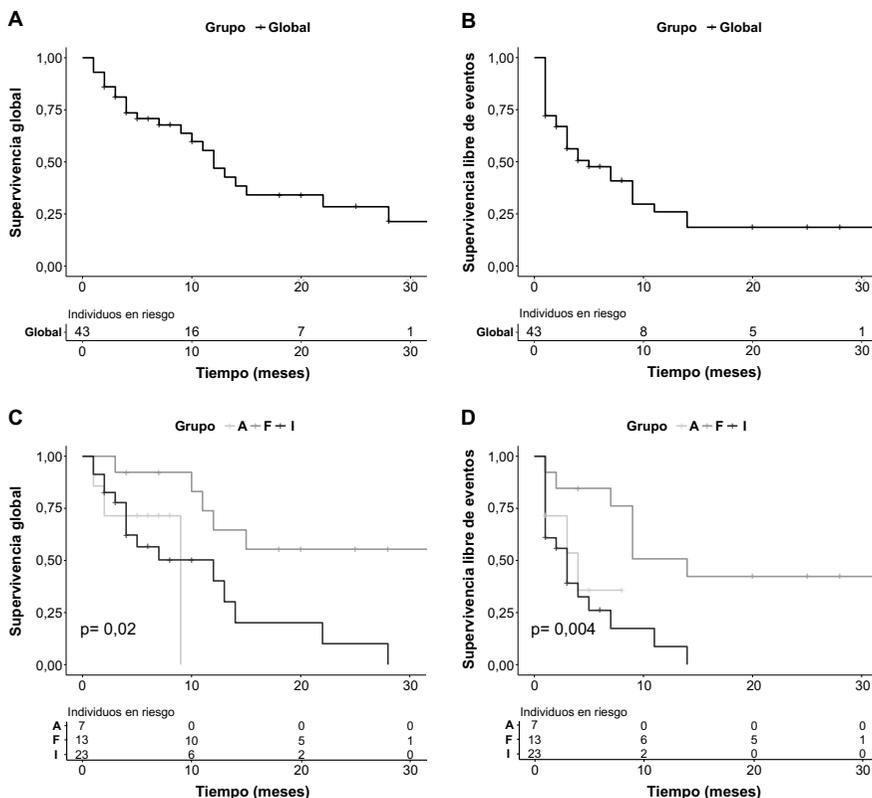


Figura 35. Curvas Kaplan-Meier estimando la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos de los pacientes con leucemia mieloide aguda. Los gráficos de las curvas Kaplan-Meier para la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos de los pacientes se muestran en A y B, respectivamente. En C y D se muestra respectivamente la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos para los pacientes agrupados según riesgo citogenético y molecular favorable (F), intermedio (I) y adverso (A) (53).

2.3.2. Diferencias de la actividad fosfatasa alcalina en pacientes con leucemia mieloide aguda: Identificación de dos grupos

Se analizaron las diferencias de la actividad fosfatasa alcalina determinada en las células leucémicas de la MO de cada paciente en el momento del diagnóstico de

LMA. En la **Tabla 16** se muestran los valores del porcentaje de blastos con actividad fosfatasa alcalina de cada paciente. La **Tabla 17** contiene la mediana y el rango de los blastos ALP^{high} en el diagnóstico de acuerdo con la edad, el sexo, el tipo de LMA (*de novo* o secundaria), la clasificación de la LMA según la OMS 2017 (15), las alteraciones citogenéticas y moleculares, el grupo de riesgo citogenético y molecular de la ELN 2017 (53), los marcadores inmunofenotípicos relevantes de blastos, el tratamiento inicial, y la terapia post-remisión.

El test de determinación de la actividad ALP de los blastos en el momento del diagnóstico fue estudiado como sistema de clasificación binario. Se analizó su precisión para determinar dos poblaciones celulares de acuerdo con sus niveles de actividad ALP y se determinó su valor predictivo para la supervivencia libre de eventos.

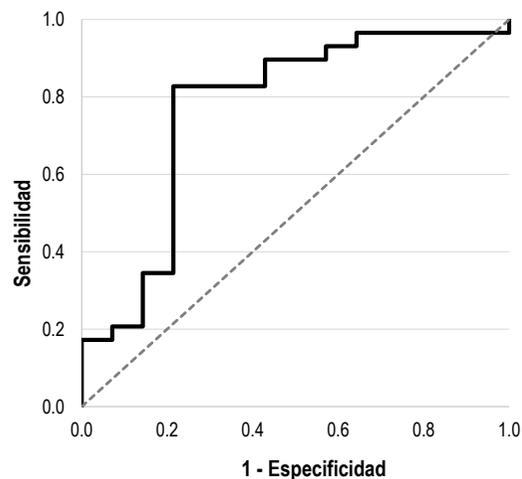


Figura 36. Curva ROC. De acuerdo con el análisis de la curva ROC, el punto de corte del 12% de blastos ALP^{high} se confirmó como el porcentaje de células leucémicas ALP^{high} para predecir la supervivencia libre de eventos de los pacientes de LMA. El análisis de la curva ROC (área bajo la curva = 0,768; 95% IC = 0,596 - 0,940; p-valor < 0,0001) permitió clasificar dos grupos de pacientes en función a su valor de actividad ALP: pacientes con más de un 12% de blastos ALP^{high} en el momento diagnóstico (Grupo A) y pacientes con menos de un 12% de blastos ALP^{high} en el momento del diagnóstico (Grupo B). El Grupo A comprendió 27 pacientes (62,8%) y el Grupo B comprendió 16 pacientes (37,2%). El punto de corte del 12% proporcionó un 83% de sensibilidad y un 79% de especificidad, y el índice de Youden superior (0,63).

Como se muestra en la **Figura 36**, el análisis de la curva de la característica operativa del receptor (*receiver operating characteristic*, ROC) (área bajo la curva = 0,768; 95% intervalo de confianza [IC] = 0,596 - 0,940; p-valor < 0,0001) permitió clasificar dos grupos de pacientes en función de la actividad ALP. El punto de corte del 12% proporcionó un 83% de sensibilidad y un 79% de especificidad, y el índice de Youden superior (0,63). Por tanto, los pacientes se clasificaron en función a ese punto de corte en dos grupos: Pacientes con más de un 12% de blastos ALP^{high} en el diagnóstico (Grupo A) y pacientes con menos de un 12% de blastos ALP^{high} en el diagnóstico (Grupo B). El Grupo A comprendió 27 pacientes (62,8%) y el Grupo B, 16 (37,2%).

2.3.3. Diferencias en la respuesta al tratamiento entre ambos grupos

En el momento del diagnóstico, los 43 pacientes incluidos en el estudio, con edad media de 63 años (rango 26 - 91), manifestaron un porcentaje medio de blastos ALP^{high} de 18,33% (rango 0,26 - 96,93). Concretamente, el porcentaje medio de blastos ALP^{high} de los 27 pacientes clasificados en el Grupo A correspondió a un 23,76% con un rango comprendido entre 13,83 y 96,63 y el de los 16 pacientes clasificados en el Grupo B correspondió a un 4,99% con un rango comprendido entre 0,26 y 11,98 (p-valor < 0,0001; 95% IC: 15,79 - 24,84).

Asimismo, se analizaron las diferencias en la respuesta al tratamiento entre ambos grupos. Siete pacientes del Grupo A (25,9%) alcanzaron la remisión completa, en contraste con los once pacientes del Grupo B (68,8%) (p-valor = 0,01; 95% IC = 1,34 - 30,99). Veinticinco pacientes del Grupo A (92,6%) recayeron o manifestaron refractariedad al tratamiento, mientras que en el Grupo B este suceso únicamente ocurrió en cinco pacientes (31,3%) (p-valor < 0,0001; 95% IC = 0,00 - 0,26). En referencia al *exitus*, en el Grupo A fallecieron 22 pacientes (81,5%) en comparación con los cinco fallecidos del Grupo B (31,3%) (p-valor = 0,002; 95% IC = 0,02 - 0,52). La **Tabla 18** resume el análisis de las diferencias

entre el Grupo A y B según la edad, el sexo, el tipo de LMA (*de novo* o secundaria), la clasificación de la LMA según la OMS 2017 (15), las alteraciones moleculares, el grupo de riesgo citogenético y molecular, los blastos y leucocitos en el diagnóstico, los marcadores inmunofenotípicos relevantes de blastos, la terapia post-remisión y la respuesta al tratamiento.

Tabla 18. Diferencias entre el Grupo A y el Grupo B, basados en el % de blastos ALP^{high} en el momento del diagnóstico

	Total (n = 43)	Grupo A (n = 27)	Grupo B (n = 16)	p-valor (95% IC)
Blastos ALP ^{high} , mediana (rango), %	18,33 (0,26 - 96,63)	23,76 (13,83 - 96,63)	4,99 (0,26 - 11,98)	< 0,0001 (15,79 - 24,84) ****
Edad, mediana (rango), años	63,0 (26 - 91)	73,0 (26 - 81)	59,5 (31 - 91)	0,38 (-5,00 - 17,00)
Sexo, n (%)				
- Hombre	30 (69,8)	17 (63,0)	13 (81,3)	0,31 (0,50 - 16,99)
- Mujer	13 (30,2)	10 (37,0)	3 (18,7)	
Tipo de LMA, n (%)				
- <i>de novo</i>	30 (69,8)	19 (70,4)	11 (68,8%)	1 (0,22 - 4,93)
- secundaria	13 (30,2)	8 (29,6)	5 (31,2%)	
Clasificación de la OMS, n (%)				
- LMA con anomalías genéticas recurrentes	15 (34,9)	9 (33,3)	6 (37,5)	1 (0,27 - 5,18)
- LMA con cambios relacionados con mielo-displasia	4 (9,3)	3 (11,1)	1 (6,3)	1 (0,00 - 7,47)
- LMA relacionada con la terapia	1 (2,3)	1 (3,7)	0 (0,0)	1 (0,00 - 65,75)
- LMA no especificada de otro modo	23 (53,5)	14 (51,9)	9 (56,2)	1 (0,29 - 4,99)
Alteraciones moleculares, n (%)				
- <i>NPM1</i> mutada sin <i>FLT3</i> -ITD	5 (11,6)	1 (3,7)	4 (25,0)	0,06 (0,71 - 441,52)
- <i>FLT3</i> -ITD con o sin <i>NPM1</i> mutada	5 (11,6)	3 (11,1)	2 (12,5)	1 (0,09 - 11,26)
- <i>NPM1 wild type</i> y <i>FLT3 wild type</i>	33 (76,8)	23 (85,2)	10 (62,5)	0,14 (0,05 - 1,58)
Grupo de riesgo ELN 2017, n (%)				
- Favorable	13 (30,2)	7 (25,9)	6 (37,5)	0,50 (0,36 - 7,82)
- Intermedio	23 (53,5)	17 (63,0)	6 (37,5)	0,12 (0,08 - 1,50)
- Adverso	7 (16,3)	3 (11,1)	4 (25,0)	0,39 (0,37 - 20,75)
Blastos, mediana (rango), %	45,0 (6,0 - 98,0)	50,0 (18,0 - 98,0)	39,0 (6,0 - 88,8)	0,35 (-7,99 - 23,00)
Leucocitos, mediana (rango), n x 10 ⁹ /L	8,5 (0,5 - 249,1)	5,9 (0,7 - 249,1)	13,3 (0,5 - 65,4)	0,93 (-10,80 - 6,60)

Tabla 18 (continuación). Diferencias entre el Grupo A y el Grupo B, basados en el % de blastos ALP^{high} en el momento del diagnóstico

	Total (n = 43)	Grupo A (n = 27)	Grupo B (n = 16)	p-valor (95% IC)
Marcadores de blastos, n (%)				
- CD34+/CD123+/CD117+	28 (65,1)	19 (70,0)	9 (56,2)	0,51 (0,12 - 2,39)
- CD34+/CD123-/CD117+	3 (7,0)	2 (7,5)	1 (6,3)	1 (0,01 - 17,38)
- CD34-/CD123+/CD117+	9 (20,9)	4 (15,0)	5 (31,2)	0,26 (0,45 - 15,67)
- CD34-/CD123+/CD117-	3 (7,0)	2 (7,5)	1 (6,3)	1 (0,01 - 17,38)
Terapia post-remisión, n (%)				
- TPH alogénico	12 (28,0)	8 (30,0)	4 (25,0)	1,0000 (0,26 - 7,00)
- Otra	31 (72,0)	19 (70,0)	12 (75,0)	
Respuesta, n (%)				
- Remisión completa	18 (41,9)	7 (25,9)	11 (68,8)	0,01 (1,34 - 30,99) *
- Recaída o refractariedad al tratamiento	30 (69,8)	25 (92,6)	5 (31,3)	< 0,0001 (0,00 - 0,26) ****
- <i>Exitus</i>	27 (62,8)	22 (81,5)	5 (31,3)	0,002 (0,02 - 0,52) **
* p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; **** p-valor < 0,0001				

2.3.4. Diferencias en la supervivencia entre ambos grupos

Se analizaron las diferencias en la supervivencia global y en la supervivencia libre de eventos entre los grupos A y B (**Figura 37**). Tanto la diferencia del OS entre el Grupo A y B, como del EFS, fueron estadísticamente significativas (p-valor = 0,018 y p-valor = 0,00036; respectivamente), siendo la supervivencia del Grupo A significativamente menor que la del Grupo B. El OS a los 25 meses de los pacientes con > 12% de blastos ALP^{high} en el momento del diagnóstico (Grupo A) resultó ser del 9%, y el EFS a los 10 meses de este grupo resultó del 10%. En contraste, el OS y el EFS en los pacientes con < 12% de blastos ALP^{high} en el momento del diagnóstico (Grupo B) resultaron ser del 58% y del 60%, respectivamente.

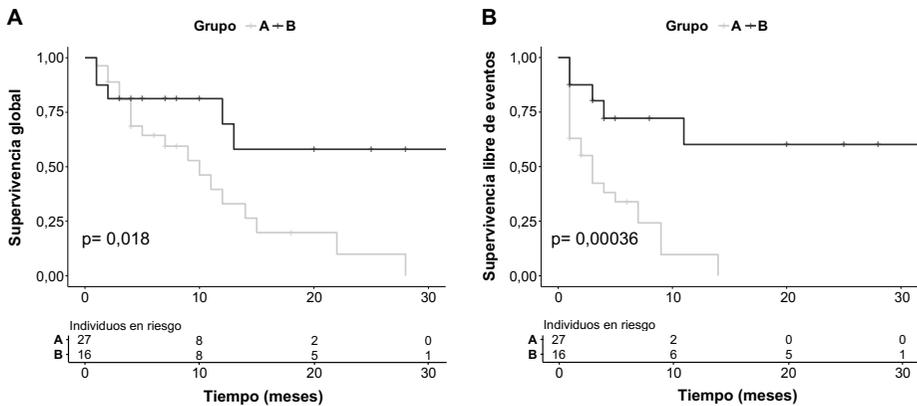


Figura 37. Curvas de Kaplan-Meier estimando la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos de los pacientes con leucemia mieloide aguda, de acuerdo con los blastos con elevada actividad fosfatasa alcalina en el momento del diagnóstico. La supervivencia después del diagnóstico se comparó entre el grupo con elevados porcentajes de blastos ALP^{high} (Grupo A) y el grupo con menores porcentajes de blastos ALP^{high} (Grupo B). Los gráficos de las curvas Kaplan-Meier mostrando la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos de los pacientes agrupados de acuerdo con los blastos con elevada actividad fosfatasa alcalina en el momento del diagnóstico se muestran en A y B, respectivamente.

2.3.5. Análisis multivariado

El modelo de riesgo proporcional de Cox se utilizó para identificar los factores asociados con el OS y el EFS de los pacientes con LMA (**Tabla 19**).

La actividad ALP en los blastos fue un predictor significativo de OS en el análisis univariado (*Hazard Ratio* [HR] = 0,32; 95% IC = 0,11 - 0,87; p-valor < 0,025). La actividad ALP en los blastos fue un predictor significativo de EFS en el análisis univariado (HR = 0,19; 95% IC = 0,17 - 0,52; p-valor = 0,0012) y en el multivariado (HR = 0,25; 95% IC = 0,09 - 0,70; p-valor < 0,0079). En análisis univariado del modelo de Cox para el OS, la edad, el grupo de riesgo favorable e intermedio, el tipo de LMA y el grupo ALP estaban asociados con un impacto significativo en la supervivencia. La edad se identificó como el único factor que retuvo significancia en el análisis multivariado. En análisis univariado del modelo de Cox para el EFS,

la edad, el grupo de riesgo favorable e intermedio y el grupo ALP estaban asociados con un impacto significativo en las progresiones y recaídas. Los únicos factores que retuvieron significancia en el análisis multivariado fueron el grupo de riesgo favorable y el grupo ALP.

Tabla 19. Análisis univariado y multivariado basado en el modelo de riesgo proporcional Cox para el OS y el EFS de los pacientes de LMA

Variable	Supervivencia global (OS)				Supervivencia libre de eventos (EFS)			
	HR Univariado (95% IC)	p-valor	HR Multivariado (95% IC)	p-valor	HR Univariado (95% IC)	p-valor	HR Multivariado (95% IC)	p-valor
Edad	1,10 (1,00 - 1,10)	0,0014**	1,04 (1,00 - 1,08)	0,0341*	1,00 (1,00 - 1,10)	0,039*	1,01 (0,99 - 1,05)	0,21
Sexo	1,40 (0,56 - 3,40)	0,48	0,58 (0,24 - 1,92)	0,47	1,00 (0,45 - 2,20)	1,00	-	-
Grupo ALP	0,32 (0,11 - 0,87)	0,025*	0,47 (0,15 - 1,34)	0,15	0,19 (0,07 - 0,52)	0,0012**	0,25 (0,09 - 0,70)	0,0079**
Tipo de LMA	4,20 (1,80 - 9,80)	0,0009***	1,50 (0,49 - 5,27)	0,43	1,60 (0,71 - 3,50)	0,27	0,48 (0,16 - 1,46)	0,20
Riesgo Favorable	0,25 (0,09 - 0,70)	0,0086**	0,33 (0,07 - 1,69)	0,18	0,24 (0,09 - 0,61)	0,0026**	0,23 (0,06 - 0,93)	0,039*
Riesgo Intermedio	2,70 (1,00 - 5,80)	0,042*	0,78 (0,19 - 3,11)	0,72	3,10 (1,40 - 6,80)	0,0053**	1,01 (0,33 - 3,12)	0,99
Riesgo Adverso	1,60 (0,44 - 5,70)	0,50	-	-	1,20 (0,41 - 3,60)	0,72	-	-
% Blastos	0,99 (0,97 - 1,00)	0,20	1,00 (0,98 - 1,03)	0,76	1,00 (0,98 - 1,00)	0,99	-	-
Leucocitos	0,99 (0,98 - 1,00)	0,46	1,00 (0,99 - 1,01)	0,94	1,00 (0,99 - 1,00)	0,64	-	-

* p-valor < 0,05; ** p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,001

Trabajo II: Diseño y evaluación de un ensayo de *screening* directo para la detección de PD-L1 en MDSCs y su potencial uso en la predicción del éxito de la inmunoterapia

1. INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea, constituyendo un microambiente crítico para la supervivencia, la expansión y la quimiorresistencia de las células del mieloma. A pesar de que las nuevas terapias han mejorado los resultados en el tratamiento de esta enfermedad, actualmente sigue siendo incurable. Para aquellos pacientes que sufren recaídas de la enfermedad o presentan refractariedad a las terapias inmunomoduladoras, a los inhibidores del proteasoma o a los anticuerpos monoclonales, las opciones terapéuticas son limitadas.

El ligando expresado en la membrana celular denominado *programmed death-ligand 1* (PD-L1) ha sido identificado como uno de los responsables de la supresión de las respuestas inmunitarias a través de la interacción con su receptor *programmed death-1* (PD-1) (297,298). En el MM, PD-L1 está expresado en las células plasmáticas aberrantes, en las células supresoras de origen mieloide (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs), y en otros tipos celulares como las células dendríticas (299). PD-1 está expresado en las células T y regula negativamente la señalización del receptor de células T (*T-cell receptor*, TCR) (300). La interacción entre PD-1 y PD-L1 disminuye la proliferación mediada por el TCR y la producción de citocinas. Por lo tanto, PD-L1 juega un papel muy importante en la evasión del sistema inmunitario y en la refractariedad al tratamiento por parte de las células tumorales, siendo considerado una diana terapéutica para esta enfermedad. Además, las MDSCs constituyen una población heterogénea que se expande durante la progresión del cáncer, la inflamación y la infección, desempeñando un papel crítico en la progresión del MM y considerándose también como una diana terapéutica del MM (301).

Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias dirigidas a la inhibición de PD-L1 y PD-1 para el tratamiento de varios cánceres humanos avanzados con resultados prometedores (302–304), demostrando que la inmunoterapia puede ser clave en el tratamiento de muchas neoplasias. En el MM, debido a que tanto las CPs malignas como las MDSCs sobreexpresan PD-L1, se han empezado a evaluar estas inmunoterapias mediante ensayos clínicos, con resultados dispares (305–310).

El propósito de este trabajo fue diseñar y evaluar una metodología de citómica funcional de *screening* para identificar MDSCs PD-L1⁺ en pacientes de mieloma múltiple para su utilización potencial en la predicción del éxito de la inmunoterapia para el MM, así como para otras neoplasias hematológicas.

A continuación, se muestran los resultados del diseño de la metodología para detectar MDSCs PD-L1⁺, de la evaluación de esta metodología en una serie de pacientes con mieloma múltiple y de los experimentos adicionales para evaluar la dinámica de la molécula PD-L1.

2. RESULTADOS

2.1. Diseño de un panel *screening* multicolor para la detección de PD-L1

Para la determinación del ligando PD-L1 en las MDSCs, se diseñó un panel de citometría de flujo que combinó la detección simultánea de 5 fluorescencias y su excitación mediante 4 láseres, reduciendo al máximo el grado de solapamiento de los espectros de emisión de los fluorocromos utilizados y, por consiguiente, la compensación electrónica de la señal de los mismos. Este panel fue diseñado para muestras preparadas mediante protocolos NLNW. En la **Figura 38** se detalla un ejemplo representativo de la plantilla de adquisición con la estrategia de

regiones y los *density plots* para determinar la expresión de PD-L1 en las MDSCs CD11b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{low/-}. La región R1 fue utilizada para discriminar células nucleadas de los eritrocitos y del ruido de fondo según el marcaje mediante DyeCycle™ Violet (DCV). R2 fue utilizada para discriminar dobletes mediante la fluorescencia de DCV. R3 fue utilizada para eliminar células apoptóticas y ruido de fondo residual. Seguidamente, se representan los *density plots* de FITC-HLA-DR, APC-CD11b, PE-PD-L1 y PE-Cy7-CD33 *versus* el SSC. Los *density plots* de fluorescencia dual son utilizados para determinar las MDSCs según el inmunofenotipo HLA-DR^{low/-}/PD-L1⁺ en R4 y CD11b⁺/CD33⁺ en R5. Las regiones de selección se aplicaron secuencialmente sobre los diferentes *density plots*.

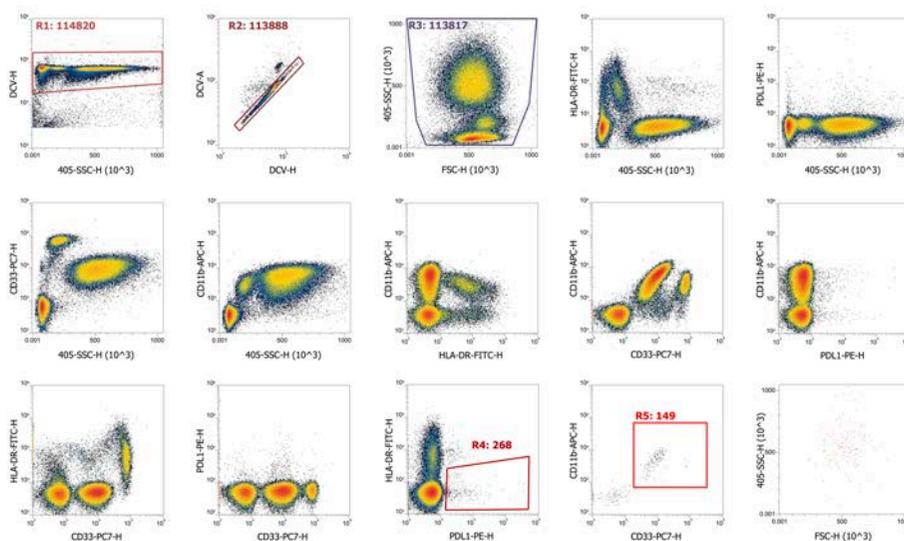


Figura 38. Plantilla de adquisición representativa para el screening de PD-L1 en las MDSCs.

La región R1 fue utilizada para discriminar células nucleadas de los eritrocitos y del ruido de fondo. R2 fue utilizada para discriminar los dobletes mediante la fluorescencia emitida por DCV. R3 fue utilizada para eliminar células apoptóticas y ruido de fondo residual. Posteriormente, se representan los *density plots* de FITC-HLA-DR, APC-CD11b, PE-PD-L1 y PE-Cy7-CD33 *versus* el SSC. Los *density plots* de fluorescencia dual son utilizados para determinar las MDSCs según el inmunofenotipo HLA-DR^{low/-}/PD-L1⁺ en R4 y CD11b⁺/CD33⁺ en R5. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher). Las regiones de selección fueron aplicadas secuencialmente sobre los *density plots*. Las estadísticas de las regiones de selección representan el recuento total de células.

2.2. PD-L1 presenta un patrón diferencial de expresión ante la estimulación en presencia de ésteres de forbol

Una vez diseñado el panel de *screening* para la detección del ligando PD-L1 en MDSCs, se analizaron muestras de médula ósea 35 de pacientes de mieloma múltiple obtenidas en diferentes seguimientos clínicos de la enfermedad (diagnóstico, seguimiento, post-tratamiento, recaída, etc.). Las muestras se prepararon sin estimulación previa al marcaje de anticuerpos y con estimulación en presencia de ésteres de forbol 12-miristato-13-acetato (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA). El incremento (*fold-change*) de las MDSCs PD-L1⁺ se calculó según la ratio entre las MDSCs PD-L1⁺ estimuladas y no estimuladas. La población de MDSCs PD-L1⁺ se calculó como el porcentaje del total de células nucleadas viables. En los 35 pacientes analizados se obtuvieron *fold-changes* de valores comprendidos entre 1 y 674 (**Figura 39a**). En la **Figura 39b** se muestran dos casos representativos de los pacientes P02 y P26. En la fila superior se representan los *density plots* del análisis de las MDSCs PD-L1⁺ del paciente 2 (P02), denominado “no respondedor” al estímulo de PMA (*fold-change* ≤ 1). La expresión de PD-L1 sin estimulación fue restringida a 644 células y con estimulación a 601 células. En contraste, en la fila inferior se representan los *density plots* del análisis de las MDSCs PD-L1⁺ del paciente 26 (P26) denominado “respondedor” al estímulo de PMA (*fold-change* > 1) debido a que la expresión de PD-L1 sin estimulación fue restringida a 882 células y con estimulación incrementó a 114752 células. De los eventos incluidos en las regiones, caracterizados por el inmunofenotipo HLA-DR^{low}/PD-L1⁺, se identificaron aquellos con doble expresión de CD11b y CD33. Los valores obtenidos se normalizaron de acuerdo con el número total de células nucleadas viables (R3, **Figura 38**) para calcular en el P02 y en el P26 los *fold-changes* de 1 y 162, respectivamente (**Figura 39a**).

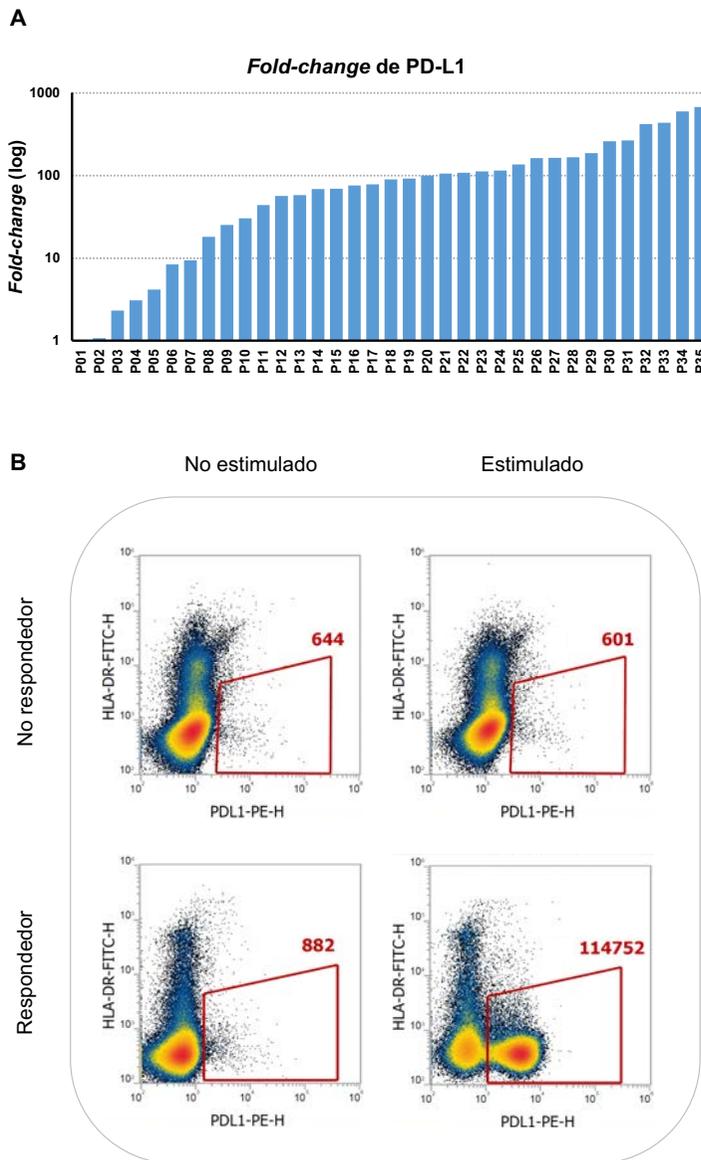


Figura 39. Fold-change de PD-L1 determinado en una serie de 35 pacientes de mieloma múltiple. El *fold-change* se calculó como la ratio entre las MDSCs PD-L1⁺ estimuladas y no estimuladas. La población de MDSCs PD-L1⁺ se calculó como porcentaje del total de células nucleadas viables. Los pacientes P01 hasta P35 mostraron una amplia variación del *fold-change* (1 a 674) (A). En (B) se muestran los *density plots* de dos casos representativos con diferente *fold-change* post-estimulación. La fila superior muestra las células del paciente 2 (P02) no respondedor al estímulo de PMA (*fold-change* = 1). La fila inferior muestra las células del paciente 26 (P26), respondedor al estímulo de PMA (*fold-change* = 162). Las estadísticas de las regiones representan el recuento total de células. Las muestras fueron adquiridas el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher).

2.3. PD-L1 no se detecta a nivel citoplasmático

El elevado *fold-change* de la molécula PD-L1 obtenido en el grupo de pacientes denominados “respondedores” (*fold-change* > 1) después del estímulo de las células en presencia de PMA, hizo plantear la posibilidad de que esos pacientes expresaran el ligando a nivel citoplasmático y que la estimulación mediante PMA provocara que esta molécula se translocara a la membrana, del mismo modo que sucede con otros marcadores, como CD11b. Para validar la hipótesis, se analizaron en 11 de los 35 pacientes los niveles de expresión de PD-L1 y de CD11b a nivel citoplasmático y se compararon con los niveles detectados en la membrana a nivel basal (sin estimulación) y después de la estimulación en presencia de PMA. En la **Figura 40** se recogen los resultados obtenidos a partir del análisis de la expresión de PD-L1 y de CD11b tanto a nivel de membrana como a nivel citoplasmático.

En la **Figura 40a** se muestra la comparativa de los valores obtenidos del porcentaje de CD11b y de PD-L1 tanto a nivel citoplasmático, como de membrana tras la estimulación. En el caso de CD11b, existe una relación proporcional entre los niveles citoplasmáticos y los de membrana después de la estimulación con PMA ($y = 0,901x + 13,73$; $R^2 = 0,7$). En el caso del ligando PD-L1, no existe una relación proporcional ($y = -1,855x + 29,47$; $R^2 \approx 0$) debido a que las células positivas para el ligando detectadas en membrana después de la estimulación no se corresponden a las detectadas a nivel citoplasmático, siendo el porcentaje de células PD-L1⁺ inferior al 3%. En la **Figura 40b** se ilustra un caso representativo (paciente 30, P30). CD11b incrementó su expresión en membrana después de la estimulación (de 9,2% a 30,0%) así como PD-L1 (de 3,6% a 16,2%). Sin embargo, a nivel citoplasmático solamente se detectaron células con expresión de CD11b (17,5%), mientras que la expresión de PD-L1 fue prácticamente indetectable (0,23%).

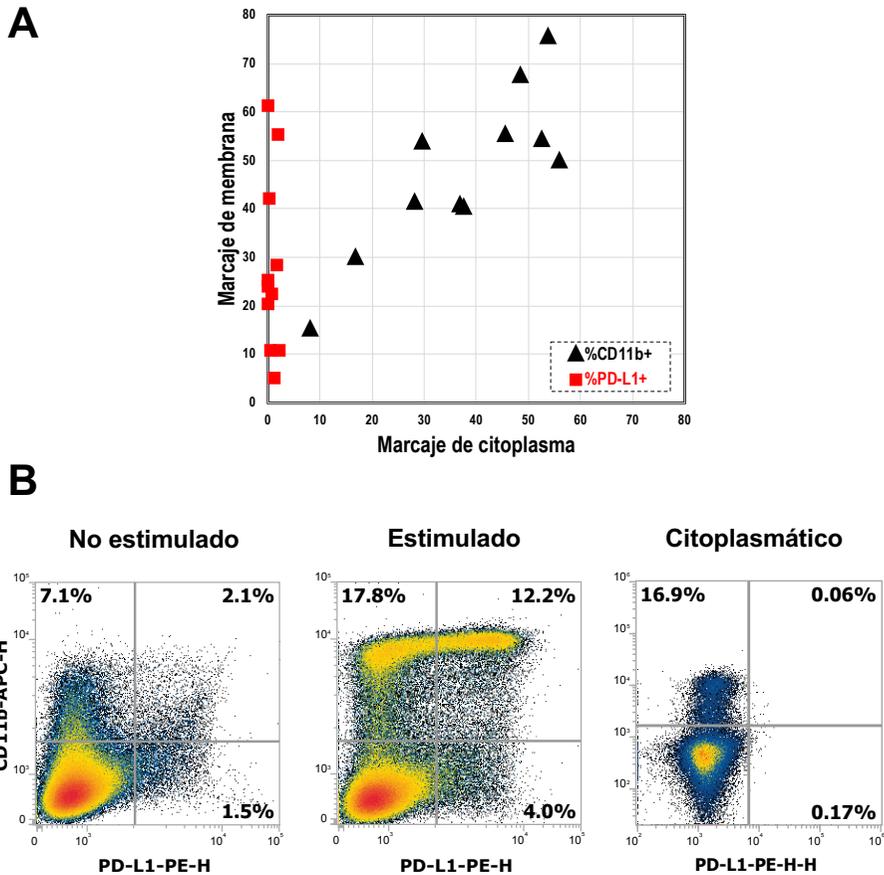


Figura 40. Análisis comparativo de la expresión de CD11b y de PD-L1 a nivel de membrana y a nivel citoplasmático. Resultados del porcentaje de CD11b⁺ y de PD-L1⁺ expresado en membrana y citoplasma en 11 pacientes de mieloma múltiple (A). Caso representativo del análisis de CD11b y PD-L1 paciente 30 (P30) a nivel de membrana no estimulado, estimulado y a nivel citoplasmático (B). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher). Las estadísticas de las regiones representan el porcentaje de células.

2.4. PD-L1 se detecta de forma diferencial según el tiempo de estimulación

Para entender el incremento de expresión del ligando PD-L1 en las MDSCs después de ser estimuladas en presencia de PMA durante 10 minutos, se

analizaron otros periodos de tiempo de estimulación, comprendidos entre 1 y 60 minutos.

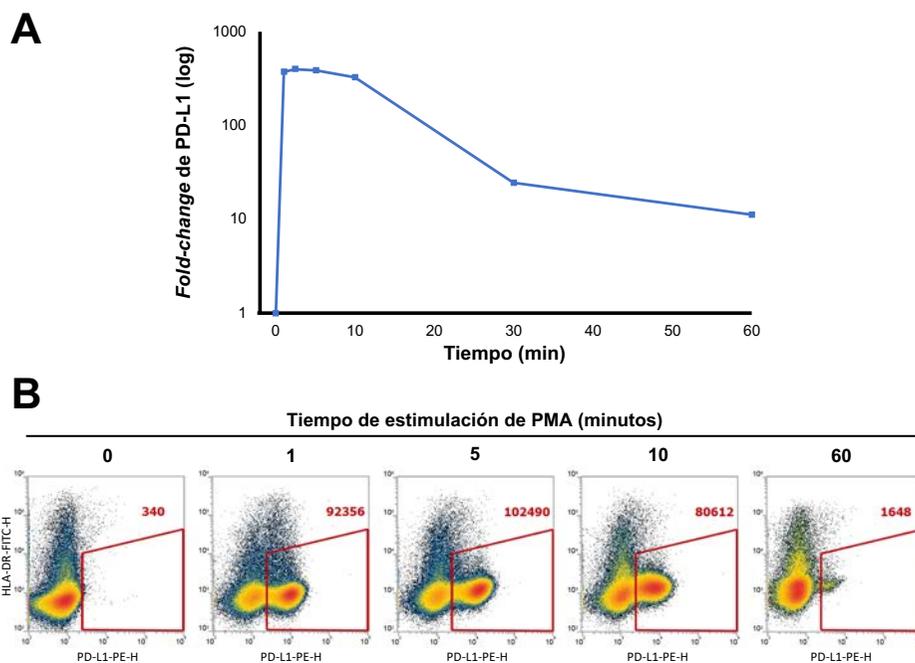


Figura 41. Fold-change del ligando PD-L1 en función del tiempo de estimulación en presencia de ésteres de forbol. Las células de la MO del paciente 35 (P35) se estimularon en presencia de PMA durante 1; 2,5; 5; 10; 30 y 60 minutos. Posteriormente, se marcaron con PE-PD-L1, APC-CD11b, FITC-HLA-DR y PE-Cy5-CD33 para determinar el porcentaje de células PD-L1 positivas en las MDSCs, definidas según el fenotipo CD11b⁺/HLA-DR^{low}/CD33⁺. Se compararon las MDSCs PD-L1⁺, relativizadas a la cantidad de células nucleadas adquiridas, con las MDSCs PD-L1⁺ sin estimular (t = 0), y se calcularon los *fold-changes* (A). En (B) se muestra un ejemplo representativo de los *density plots* de las poblaciones HLA-DR^{low}/PD-L1⁺ estimuladas 0, 1, 5, 10 y 60 minutos en presencia PMA. Las estadísticas de las regiones representan el recuento total de células. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher).

Después de diversos ensayos, se seleccionó un paciente con mieloma múltiple (P35) del cual se obtuvo el aspirado de médula ósea y se estimularon las células en presencia de PMA durante 1; 2,5; 5; 10; 30 y 60 minutos. Posteriormente, se

marcaron las células con PE-PD-L1, APC-CD11b, FITC-HLA-DR y PE-Cy5-CD33 para determinar el porcentaje de células PD-L1 positivas en las MDSCs, definidas según el fenotipo CD11b⁺/HLA-DR^{low/-}/CD33⁺. Se compararon los porcentajes de MDSCs PD-L1⁺ relativizados a la cantidad de células nucleadas adquiridas con el porcentaje de MDSCs PD-L1⁺ obtenido sin estimular las células ($t = 0$), y se calcularon los *fold-changes* (**Figura 41**). Como se observa en la **Figura 41a**, el *fold-change* máximo del ligando PD-L1 se obtiene en los primeros 5 minutos de estimulación, con una progresiva disminución hasta los 60 minutos. En la **Figura 41b**, se muestra un ejemplo representativo de las poblaciones HLA-DR^{low/-}/PD-L1⁺ estimuladas 0, 1, 5, 10 y 60 minutos en presencia de PMA.

2.5. El anticuerpo monoclonal conjugado y durvalumab compiten para un sitio de unión de PD-L1 espacialmente cercano

Para validar los resultados obtenidos y comprobar que el anticuerpo anti-PD-L1 conjugado a PE se unía al mismo sitio o a un sitio espacialmente cercano de unión de la molécula PD-L1 que durvalumab, uno de los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 utilizado para la inmunoterapia, se realizó un ensayo de competición entre anticuerpo conjugado y el anticuerpo monoclonal utilizado como fármaco.

Se estimularon diferentes aspirados de médula ósea obtenidos de pacientes de mieloma múltiple en presencia y en ausencia de PMA y, posteriormente, se añadieron los anticuerpos PE-PD-L1, APC-CD11b, FITC-HLA-DR y PE-Cy5-CD33 y concentraciones crecientes de durvalumab (de 0 a 250 ng/ μ L). Se determinaron los porcentajes de MDSCs PD-L1 positivas y se calcularon los *fold-changes* en relación al porcentaje de las muestras sin estimular. Los resultados obtenidos en 4 pacientes de mieloma múltiple son representados en la **Figura 42**. Se observa un efecto de competición entre durvalumab y el anticuerpo conjugado

por la unión al sitio de la molécula PD-L1. Sin embargo, este efecto varía según el paciente, siendo más acentuado en los pacientes P36 y P39 y prácticamente inexistente en el paciente 37 (P37).

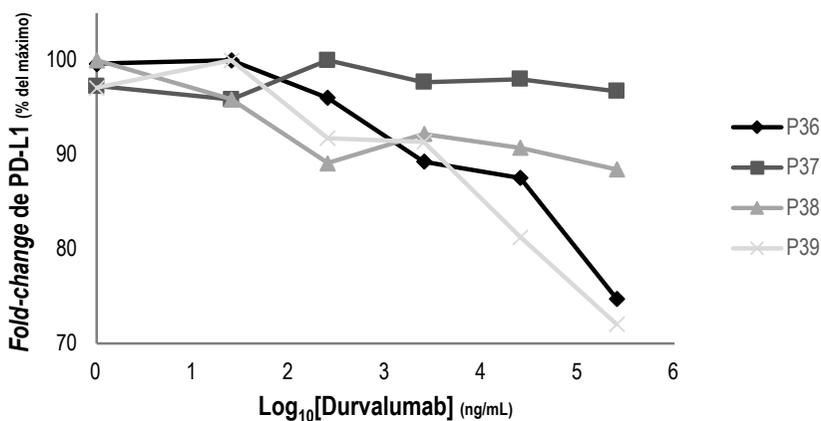


Figura 42. Ensayo de competición entre el anticuerpo fluorescente anti-PD-L1 y el anticuerpo monoclonal humanizado no fluorescente anti-PD-L1 (durvalumab), utilizado en inmunoterapia. Se estimularon diferentes aspirados de médula ósea obtenidos de 4 pacientes con MM en presencia y en ausencia de PMA y, posteriormente, se incubaron con los anticuerpos PE-PD-L1, APC-CD11b, FITC-HLA-DR y PE-Cy5-CD33 y diferentes concentraciones de durvalumab (0; 0,025; 0,25; 2,5; 25 y 250 ng/ μ L). Se determinaron los porcentajes de MDSCs PD-L1 positivas y se calcularon los *fold-changes* en relación al porcentaje de las muestras sin estimular. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher).

DISCUSIÓN

Las leucemia aguda y el mieloma múltiple son neoplasias hematológicas que tienen una incidencia notable en la población y causan asimismo una elevada mortalidad anualmente (15–17). Este hecho supone un problema muy importante para la sociedad, teniendo la investigación biomédica en este ámbito un papel clave para proporcionar mejoras en la calidad de vida de los pacientes.

Una de las principales causas de la mortalidad es la **refractoriedad al tratamiento** o la **recaída de la enfermedad** una vez se han logrado los criterios establecidos de respuesta o remisión completa (53,54,113), asumiendo, por lo tanto, que dichos criterios no se corresponden en todos los casos con estadios evolutivos más precoces de la enfermedad. La refractoriedad celular puede ser debida a la existencia de células madre tumorales (82,224,243), que tienen la capacidad de iniciar de nuevo la enfermedad, son resistentes al tratamiento, y prácticamente indetectables mediante los actuales métodos de seguimiento. Tanto la leucemia aguda como el mieloma múltiple tienen origen en CSCs (82,240–243), por lo que el modelo de célula madre tumoral queda asociado a estas entidades. Asimismo, cabe destacar el papel de la supresión inmunitaria mediada por el tumor y el microambiente celular (250,252,254), como mecanismo de escape de la enfermedad, siendo especialmente característico en el mieloma múltiple, donde las células plasmáticas (CPs) malignas así como las células supresoras de origen mielóide (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) han sido identificadas como responsables de este mecanismo de refractoriedad (299,301).

Actualmente, el **trasplante de progenitores hematopoyéticos** representa una de las opciones para incrementar la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo en el mieloma múltiple y la leucemia aguda (173–175), llegando a ser curativa en determinados grupos de pacientes. El TPH permite restaurar el sistema hematopoyético e inmunitario del paciente mediante la infusión de

progenitores sanos provenientes del propio paciente (TPH autólogo) o de un donante sano (TPH alogénico) (172,176). Por contra, este procedimiento lleva asociada una importante morbilidad y mortalidad (311), y únicamente se realiza en pacientes en buen estado general y si el riesgo del trasplante es menor que el beneficio que pueda suponer. Además, después del TPH, una parte de los pacientes de leucemia aguda acaba recayendo (312,313) y en el mieloma múltiple es muy probable que la enfermedad acabe progresando a corto o largo plazo, suponiendo un factor de mal pronóstico para los pacientes (314,315). Por lo tanto, es necesario explorar nuevas terapias e identificar nuevas dianas terapéuticas para poder definitivamente curar estas enfermedades en todo tipo de pacientes, así como implementar mejoras en las metodologías actuales de diagnóstico y seguimiento, y poder predecir el riesgo de recaída mediante la detección de las células refractarias al tratamiento.

La **medicina personalizada** combina datos clínicos, genómicos, fenotípicos, entre otros, para proporcionar estrategias terapéuticas optimizadas sobre la base de las características individuales de cada paciente. En los últimos años, las técnicas moleculares (RT-qPCR) y citogenéticas (cariotipo y FISH) han permitido caracterizar las neoplasias hematológicas y definir la estratificación de riesgo y la terapia más adecuada, permitiendo un seguimiento más eficaz de dichas enfermedades (53,86,88). Además, nuevas tecnologías emergentes como, por ejemplo, la PCR digital, los *microarrays* de expresión y la NGS, pueden suponer un avance para definir con más precisión el pronóstico de los pacientes, predecir la recaída, y orientar la terapia (103,104,139,142). La citometría de flujo multiparamétrica es una tecnología rápida, reproducible y clave en el laboratorio clínico para incrementar la sensibilidad en la detección de las enfermedades hematológicas a nivel de célula única, y especialmente para detectar enfermedad residual inmediatamente después del tratamiento o durante el seguimiento (62,120,123). La determinación de la enfermedad residual medible se considera

indispensable para monitorizar la eficacia del tratamiento y determinar el pronóstico de los pacientes una vez finalizada la terapia. Sin embargo, el límite de la sensibilidad en la detección (51,62,64), los cambios fenotípicos en la recaída debido a fenómenos de evolución clonal (123–125), la reducida e incierta frecuencia de las células madre tumorales (227), la calidad del aspirado de médula ósea, o la utilización de sangre periférica, entre otros, puede llevar a la identificación de falsos positivos o negativos.

Asimismo, los **nuevos avances en las estrategias terapéuticas** también han contribuido a un incremento en la supervivencia global de los pacientes. Los esquemas actuales de tratamiento de la leucemia aguda tienen en cuenta el estado general del paciente, siendo aquellos en buen estado los candidatos a la quimioterapia (53,54,162–164). En función de la edad del paciente, las dosis y/o intensidad de la quimioterapia pueden variar. En el mieloma múltiple, la edad y el estado de salud general serán fundamentales para determinar también la elegibilidad al TPH autólogo (56). Muchas de las estrategias terapéuticas que se han desarrollado en los últimos años están siendo evaluadas mediante ensayos clínicos, especialmente para aquellos pacientes refractarios al tratamiento, ya sea porque la terapia convencional no sea efectiva, o sobre otros pacientes que por sus características específicas hayan sido considerados elegibles (171,316,317). La investigación de estas enfermedades, así como el incremento del conocimiento sobre la biología de las mismas, ha permitido desarrollar diversos tratamientos que pueden suponer una mejora en el pronóstico de los pacientes, incluso para poder finalmente llegar a una cura para estas enfermedades. Una de las terapias emergentes es la denominada inmunoterapia, basada en la estimulación del sistema inmunitario del paciente para poder atacar y eliminar las células tumorales. Las primeras inmunoterapias desarrolladas, basadas en anticuerpos monoclonales dirigidos a receptores específicos, están produciendo resultados muy esperanzadores, como en el caso del rituximab, dirigido a CD20 y utilizado

en el tratamiento de pacientes con LLA-B (201), y que incluso han sido aprobados como terapia de primera línea para el mieloma múltiple, como es el caso del daratumumab (170,205). Otras estrategias inmunoterapéuticas están dirigidas a determinados puntos de control del sistema inmunitario para tratar de restablecer la función normal, suprimida por las células neoplásicas, como es el caso de los inhibidores del eje PD-1/PD-L1 en el mieloma múltiple (306,308,318). Por último, la terapia celular basada en CAR-Ts está suponiendo una revolución en el tratamiento de leucemias y mielomas refractarios, con diversos ensayos activos y algunos resultados prometedores (209,212,214). Sin embargo, es imprescindible seguir investigando en nuevas terapias, dado de muchos pacientes no responden al tratamiento, progresan, acaban recayendo o los efectos secundarios son deletéreos. Una de las vías de investigación reside en el estudio de la diana a la cual se dirige el tratamiento para poder definir los niveles de expresión, regulación, funcionalidad y detección.

Es de gran importancia seguir investigando e incrementar el conocimiento acerca de estas entidades, con la finalidad de aplicar la terapia adecuada y aumentar la supervivencia global de los pacientes. Los esfuerzos deben centrarse especialmente en definir las categorías y factores de riesgo en el momento del diagnóstico, así como los criterios de respuesta para determinar estadios evolutivos más precoces de la enfermedad. También es imprescindible desarrollar tecnologías de seguimiento que permitan detectar poblaciones celulares implicadas en la refractariedad y en la iniciación de la enfermedad que actualmente no se identifican mediante las aproximaciones actuales. Y, finalmente, uno de los puntos clave para el éxito de la terapia, es el estudio de la diana terapéutica a nivel individual e interindividual.

La **citómica funcional** es una tecnología de análisis celular basada en citometría de flujo multiparamétrica que permite determinar mediante diversos ensayos la

función a nivel de célula única combinándola además con el inmunofenotipo convencional. En las últimas recomendaciones de la revista *European Journal of Immunology*, publicadas en el año 2017, para el uso de citometría de flujo y separación celular en estudios inmunitarios (61) se destacan una serie de ensayos funcionales combinados con la determinación del inmunofenotipo para detectar, por ejemplo, fagocitosis, autofagia, producción de especies reactivas de oxígeno tanto a nivel mitocondrial como neutrofílico, liberación de calcio, potencial de membrana mitocondrial, vías de traducción de la señal y metabolismo linfocitario. Mediante citómica funcional, además, se pueden identificar poblaciones celulares imposibles de detectar con el inmunofenotipado convencional, como en el caso de la *side population*, compartimento celular identificado únicamente mediante citometría de flujo por su capacidad de expulsar sustratos fluorescentes mediada por el transportador multidroga ABCG2 (280), expresado en la membrana celular y relacionado con la refractariedad a la quimioterapia y el grado de inmadurez de las células madre de esta población (319).

De este modo, esta tecnología debe ser clave en la investigación y evaluación de las enfermedades hematológicas, permitiendo detectar células y mecanismos implicados en la refractariedad a los tratamientos y en la posterior progresión y/o recaída. Además, gracias a los sistemas de separación celular asociados a los citómetros de flujo, las células identificadas pueden ser separadas y purificadas, conservando su viabilidad y funcionalidad, para posteriormente realizar cultivos clonogénicos, trasplante en ratones, *microarrays* de expresión, NGS, entre otros (61).

En contraste con otras tecnologías emergentes, como son la NGS y la PCR Digital, la citómica funcional se centra en el estudio de funcionalidad de la célula viva, como integración de las complejas interacciones moleculares (261–266) en lugar de abordar la detección de múltiples marcadores a nivel molecular.

Teniendo en cuenta que las poblaciones celulares refractarias pueden ser muy minoritarias, y además, quiescentes y por tanto con niveles de expresión génica prácticamente silentes (320,321), su detección puede suponer un verdadero reto siguiendo un abordaje meramente molecular.

Sobre estos fundamentos, la presente Tesis Doctoral se ha basado en el desarrollo de nuevos sistemas citómicos avanzados con la finalidad de alterar de la manera mínimamente posible la función celular, y poder preservar las condiciones fisiológicas al máximo. En el estudio de las neoplasias hematológicas, los tejidos principalmente estudiados provienen de la médula ósea o de la sangre periférica (15). Por ese motivo, la principal estrategia para alterar mínimamente posible la función celular consistió en tratar de suprimir cualquier proceso que conllevara al fraccionamiento de la muestra, y específicamente evitando la destrucción de los eritrocitos mediante el uso de soluciones lisantes. Las soluciones de lisis de eritrocitos son utilizadas extensamente tanto a nivel de investigación como clínico. Sin embargo, su utilización puede resultar en la depleción no únicamente de las células anucleadas, sino también de las células nucleadas, en la alteración de la propia funcionalidad celular, y en la obtención de resultados artefactuales (270,272,322). Como alternativa a la utilización de estas soluciones lisantes, se han desarrollado protocolos utilizando sangre o médula total, conocidos como protocolos NLNW, del inglés *no lyse no wash* (273). Las dos estrategias principales de NLNW requieren, por un lado, marcadores fluorescentes de carácter vital específicos de ADN para discriminar las poblaciones de células nucleadas de los eritrocitos y del ruido de fondo (**Figura 19 – Introducción**); y por otro, la explotación de las diferencias entre leucocitos y eritrocitos sobre sus propiedades de dispersión de la luz lateral, para discriminar eficientemente los eritrocitos por su contenido en oxihemoglobina al absorber luz a una longitud de onda de 405 nm, emitida por el láser violeta (**Figura 20 – Introducción**) (61). En esta Tesis Doctoral, la estrategia principal para discriminar

la población de interés, las células nucleadas de origen leucocitario, ha consistido en la utilización de Vybrant™ DyeCycle™ Violet (DCV) Stain (Thermo Fisher), una sonda fluorescente, permeable y no tóxica que emite fluorescencia al unirse al ADN de doble cadena. Dado que los especímenes analizados provinieron principalmente de aspirados de médula ósea, conteniendo células nucleadas pertenecientes a la serie eritroide (323), y por tanto, con positividad para el marcador DCV, este método se combinó con el de la discriminación de los eritrocitos por las diferencias en el *side scatter* obtenido mediante la iluminación del láser violeta y del láser azul. La combinación de ambos métodos podría tener una gran aplicación en los estudios de síndromes mielodisplásicos y leucemias con un elevado componente eritroide (15).

Mediante los dos trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral, se ha puesto en evidencia la importancia de la citómica funcional para desarrollar nuevas metodologías que permitan estudiar poblaciones celulares asociadas a la refractariedad al tratamiento de las neoplasias hematológicas, de manera más eficaz. Estas metodologías podrían ser introducidas progresivamente en los procedimientos de diagnóstico y seguimiento, proporcionando un análisis más completo de la evolución de la enfermedad, teniendo especial relevancia en la determinación del pronóstico y el grupo de riesgo del paciente y permitiendo establecer estrategias terapéuticas más adecuadas que conduzcan a la cura definitiva de estas enfermedades.

En el **Primer Trabajo**, se desarrolló una metodología basada en citómica funcional para determinar la actividad fosfatasa alcalina en subpoblaciones de células madre de la leucemia aguda de manera prospectiva, y se evaluó como método potencial para detectar subpoblaciones celulares, definidas por el mismo

inmunofenotipo, que podrían estar asociadas a una mayor refractariedad al tratamiento.

La leucemia aguda, tanto la de linaje mielóide como la de linaje linfóide, se origina en el compartimento de células madre en la médula ósea. Pese a que la mayoría de pacientes adultos alcanza una respuesta completa después del tratamiento, finalmente una gran parte acaba experimentando recaídas. Una posible explicación del motivo de la reaparición de la leucemia viene dada por el modelo de célula madre leucémica. La existencia de células madre leucémicas se asocia a un peor pronóstico (235,236,238,239) debido su capacidad de sostener la enfermedad durante el tratamiento y pudiendo ser las responsables de iniciar de nuevo la leucemia una vez finalizado (82,225). En 1997, Bonnet y Dick (82) demostraron que las células leucémicas CD34⁺/CD38⁻ obtenidas de pacientes con leucemia mielóide aguda, poseían capacidades proliferativas y de diferenciación, así como propiedades de autorenovación, características de las células madre. El xenotrasplante de estas células en ratones inmunodeficientes contribuyó a la verificación de la organización jerárquica de la leucemia y de las características iniciadoras de leucemia de las LSCs CD34⁺/CD38⁻. Estudios posteriores demostraron también que células del resto de compartimentos (CD34⁺/CD38⁺ CD34⁻/CD38⁻ y CD34⁻/CD38⁺) tenían propiedades de LSCs (324,325). Por consiguiente, la heterogeneidad del compartimento de las LSCs implica que el concepto de célula madre no está asociado únicamente a una entidad celular específica determinada por el inmunofenotipo, sino que también podría estar determinada por las propias características funcionales de estas. Como resultado, el concepto de célula madre tumoral no puede ser aplicable universalmente, debido a la compleja evolución y a la heterogeneidad fenotípica las células neoplásicas con características de célula madre. En el caso de leucemia linfoblástica aguda, no existen marcadores fenotípicos para identificar las LSCs iniciadoras de la leucemia, puesto que diversos inmunofenotipos pueden

demostrar esa capacidad (240–242). Por lo tanto, el concepto de LSC y su organización jerárquica no puede ser aplicado en la LLA-B del mismo modo que en la LMA, dado que los patrones de recaída observados pueden estar asociados a una evolución clonal de las células leucémicas (245,246).

Las células iniciadoras de leucemia tienen características únicas basadas en respuestas metabólicas a fármacos, control del estrés celular, y otros aspectos clave de quiescencia y refractariedad a la quimioterapia (326,327). Sobre la base de la naturaleza clonal de la leucemia, la demostración de la existencia de células que pueden reconstituir la leucemia aguda (82,240), y la heterogeneidad intratumoral (223), se hipotetizó que la citómica funcional podría ser de gran utilidad para identificar subpoblaciones celulares implicadas con la recaída y/o refractariedad de la leucemia. Específicamente, la incrementada actividad fosfatasa alcalina en células primitivas, podría identificar células leucémicas asociadas con una mayor refractariedad y persistencia de la enfermedad.

Para ello, se desarrolló una nueva metodología con la finalidad de estudiar la actividad fosfatasa alcalina en pacientes de leucemia aguda en combinación con el inmunofenotipo de las células leucémicas, tanto en el momento del diagnóstico como en posteriores seguimientos. Para detectar la actividad fosfatasa alcalina, se utilizó un sustrato no tóxico y permeable que difunde a través de las membranas celulares y emite fluorescencia cuando es catalizado por la enzima, que se denomina *Alkaline Phosphatase Live Stain* (APLS). Este biomarcador permite visualizar eficientemente mediante microscopia de fluorescencia células madre pluripotentes (269). Por tanto, esta fluorescencia, podría ser detectada a su vez mediante citometría de flujo, permitiendo así detectar la actividad fosfatasa alcalina en combinación con el inmunofenotipo de las células leucémicas.

Con estos antecedentes, se decidió implementar un nuevo método basado en citometría de flujo para detectar la actividad fosfatasa alcalina evitando la lisis de

los eritrocitos que, de ser aplicable, permitiría combinar las propiedades funcionales con el inmunofenotipo, a la vez que se minimizan los efectos de la preparación de la muestra sobre las células de interés (273) para incluso poder identificarlas en proporciones muy minoritarias (274). La comparación de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina utilizando soluciones de lisis de eritrocitos demostró resultados deletéreos en cuanto a la funcionalidad de la enzima debidos a la utilización de soluciones de lisis conteniendo paraformaldehído, la solución de lisis más extendida para la realización del inmunofenotipado. El uso de estas soluciones provocó una reducción de la funcionalidad de la enzima casi completa, impidiendo la determinación de la actividad ALP en las muestras analizadas (**Figura 28 – Resultados Trabajo I**), resultando, por tanto, no recomendable para la identificación de células que puedan presentar elevados niveles de actividad fosfatasa alcalina.

Se demostró que el sustrato podía aplicarse para el estudio de células vivas mediante citometría de flujo, manteniendo su funcionalidad al no resultar tóxico para las células, y al no reducir la concentración celular con posterioridad a la incubación. Además, la fluorescencia del sustrato también se mantuvo estable durante el tiempo (**Figura 24 – Resultados Trabajo I**). La conservación de la funcionalidad y viabilidad que proporciona la aplicación de metodología sobre las células permitiría purificar subpoblaciones celulares en función a la actividad ALP mediante sistemas de separación celular acoplados al citómetro de flujo y estudiar sus implicaciones biológicas (61).

En otro de los ensayos realizados, se demostró que el reactivo utilizado para determinar la actividad fosfatasa alcalina no era extruido por el transportador multidroga ABCG2 (**Figura 25 – Resultados Trabajo I**). Precisamente por no ser extruido, resulta posible evitar la utilización simultánea de inhibidores específicos de los transportadores multidroga, tomando clara ventaja sobre uno de los

métodos funcionales más extendidos para identificar células madre tumorales, basado en la utilización del reactivo Aldefluor™ para evaluar la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (268,328).

Para confirmar que la incrementada actividad fosfatasa alcalina estaba relacionada con células primitivas, inmaduras y asociadas a microambientes tumorales y a una mayor refractariedad, se determinó la actividad fosfatasa alcalina en relación a la actividad de extrusión mediada por el transportador multidroga ABCG2 utilizando este sustrato en combinación con el análisis de las células de la *side population* (280), tanto en condiciones de hipoxia (5% de oxígeno) como de normoxia (21% de oxígeno) (**Figura 26 – Resultados Trabajo I**). Las células de la SPop resultaron presentar actividad fosfatasa alcalina, siendo las células cultivadas en condiciones de hipoxia (5% de oxígeno) aquellas que presentaron una mayor fluorescencia del sustrato y, por tanto, una mayor actividad fosfatasa alcalina. Estos resultados podrían relacionar la actividad fosfatasa alcalina con células primitivas con actividad de extrusión mediada por transportadores multidroga, asociada a una mayor quimiorresistencia. La actividad ALP se observó realizada especialmente en condiciones de un 5% de oxígeno, que mimetizan de forma más precisa las condiciones fisiológicas del microambiente donde podrían encontrarse estas células.

Una vez demostrado que la nueva metodología tuvo un mínimo efecto sobre la perturbación de la muestra en la evaluación de la respuesta celular y la actividad funcional de la enzima en células vivas, y que la actividad ALP estaba asociada con células primitivas y quimioresistentes, e incrementada en microambientes hipóxicos, se estudió la actividad fosfatasa alcalina en pacientes con leucemia aguda. Para ello, se inició un estudio prospectivo con la intención de poder identificar nuevas subpoblaciones celulares clínicamente relevantes, incluso aquellas muy minoritarias, que pudiesen estar asociadas a una mayor

refractoriedad al tratamiento y su posible relación con el sostenimiento de la leucemia a lo largo del tiempo.

En esta primera fase del estudio se analizó la actividad ALP en células CD34⁺ en diferentes casos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de precursores B o leucemia mieloide aguda refractarias, donde se hipotetizó que esta actividad podría estar incrementada en las células neoplásicas.

Destacamos el **Caso 1**, que correspondía a una paciente diagnosticada de LLA-B seis años atrás, con cariotipo normal y sin alteraciones moleculares, con antecedentes de refractoriedad, TPH alogénico, y habiéndose vuelto a manifestar la enfermedad en el momento del inicio del estudio de la actividad ALP. Se hicieron cinco determinaciones de actividad ALP y en todas las ocasiones se detectaron células CD34⁺/ALP^{high} (**Figura 31 – Resultados Trabajo I**), demostrando que no eran detectables mediante las técnicas habituales de inmunofenotipo (**Figura 32 – Resultados Trabajo I**). El inmunofenotipado convencional revelaba blastos leucémicos aparentemente clonales, mientras que la actividad fosfatasa alcalina demostraba una nueva heterogeneidad funcional dentro del compartimento de las células leucémicas. Una posible explicación a la detección de estas poblaciones funcionalmente heterogéneas puede radicar en la evolución clonal y en la preexistencia de subclones resistentes provenientes de células hematopoyéticas premalignas que continuamente inician la leucemia después de la remisión (245,246), siendo por tanto indetectables con los métodos desarrollados y aplicados universalmente en el inmunofenotipado de la leucemia. Además, no fueron detectadas alteraciones moleculares o citogenéticas asociadas a esta enfermedad, e inicialmente se incluyó en el grupo de riesgo intermedio según criterios citogenéticos y moleculares (86,87), aunque fue tratada según el protocolo PETHEMA-LLA-AR/03 para la LLA-B de alto riesgo, debido a un incrementado número de leucocitos en el momento del diagnóstico,

comprobandose efectivamente que el pronóstico fue desfavorable. La determinación de la actividad fosfatasa alcalina permitió detectar en todos los seguimientos realizados la población leucémica CD34⁺/ALP^{high}, como potencial responsable del pronóstico desfavorable, proporcionando una información adicional de los resultados obtenidos por el resto de aproximaciones clínicas utilizadas en el diagnóstico integrado y el seguimiento de la paciente.

Otro caso clínico que puso en evidencia la importancia de la detección de una subpoblación CD34⁺/ALP^{high} en la recaída y refractariedad de la leucemia se muestra en el **Caso 2** del estudio. Este caso correspondió a una paciente diagnosticada de LLA-B común con hiperdiploidía, incluida, por tanto, en el grupo de riesgo favorable (86,87). Las subpoblación leucémica CD34⁺/ALP^{high} se detectó tanto en el momento del diagnóstico como en el momento de la recaída después de haber alcanzado la remisión completa según los criterios actuales establecidos, un hecho que contribuye a pensar que esta subpoblación funcional guarda una estrecha relación con el fenómeno de refractariedad a la quimioterapia (**Figura 33 – Resultados Trabajo I**), a pesar de haber sido clasificada en la categoría de riesgo favorable debido a las alteraciones genéticas manifestadas en el momento del diagnóstico.

El resto de casos analizados (**casos 3-5**) sirvieron para confirmar que esta actividad enzimática, además, no está restringida únicamente a la población CD34⁺, sino que también puede estar encontrarse incrementada en poblaciones CD34⁻, confirmando que la reactividad del biomarcador no está asociada a un inmunofenotipo específico (**Figura 34 – Resultados Trabajo I**), proporcionando así un gran potencial para poder aplicar esta metodología en el estudio de múltiples neoplasias hematológicas.

Después de demostrar mediante esta nueva aproximación, la existencia de heterogeneidad en poblaciones leucémicas inmunofenotípicamente clonales en la

leucemia aguda refractaria, y su posible asociación con el mantenimiento de la leucemogénesis a largo plazo, independientemente de sus características citogenéticas y moleculares, se procedió a estudiar la posible implicación de la actividad ALP sobre el pronóstico de los pacientes diagnosticados de LMA.

En este último estudio del Trabajo I, se ha demostrado que la presencia de blastos leucémicos con elevada actividad ALP puede tener un impacto pronóstico negativo en el diagnóstico de la LMA, independientemente de otros factores relevantes en el diagnóstico y de las categorías de riesgo publicadas por la ELN en el año 2017 (53). El análisis de la actividad fosfatasa alcalina realizado sobre 43 pacientes en el momento del diagnóstico reveló diferentes perfiles de actividad detallados en la **Tabla 16 (Resultados Trabajo I)**. A su vez, se observó que aquellos pacientes con perfiles de actividad ALP más elevados alcanzaron con menor frecuencia la remisión completa, presentaron más recaídas y mayor número de *exitus*. Concretamente, mediante el análisis ROC se pudo definir efectivamente dos grupos de pacientes: El Grupo A, consistente en pacientes con más del 12% de blastos con actividad ALP; y el Grupo B, con menos del 12% de blastos con actividad ALP. Este punto de corte del 12% permitió determinar la supervivencia libre de eventos con un 83% de sensibilidad y un 79% de especificidad, y el mayor índice de Youden (0,61) (281) (**Figura 36 – Resultados Trabajo I**). De esta manera, el punto de corte establecido determinó cómo realizar el análisis del impacto de la actividad ALP sobre el pronóstico de los pacientes. En primer lugar, se comparó el Grupo A y el Grupo B según diversos factores que pueden tener un impacto pronóstico en la LMA en el momento del diagnóstico; incluyendo la edad, el sexo, el tipo de LMA, las alteraciones moleculares, la clasificación de la OMS, el grupo de riesgo de la ELN 2017, el porcentaje de blastos, el número de leucocitos, el inmunofenotipo de los blastos, la terapia post-remisión y la respuesta a la terapia (**Tabla 18 – Resultados Trabajo I**). Únicamente se obtuvieron diferencias significativas en cuando a la posterior

respuesta de los pacientes (logro de la remisión completa, recaída o refractariedad al tratamiento, y *exitus*), siendo el Grupo A (> 12% de blastos ALP^{high}) el que obtuvo peor respuesta. Cabe destacar que factores tales como la edad, el sexo, la clasificación de la OMS 2017 (15) y la clasificación de riesgo de la ELN (53) no fueron significativamente distintos entre ambos grupos. Por esta razón, quedaba demostrado que el nuevo test ALP permitía evaluar respuestas significativamente diferentes independientemente de otros factores con un impacto pronóstico relevante para la LMA en el momento del diagnóstico (53).

De manera muy interesante y a pesar de tratarse de una cohorte con un número reducido de pacientes (n = 43), cuando estos fueron clasificados según el grupo de riesgo genético y molecular de la ELN 2017 (53), se obtuvieron diferencias significativas en las curvas Kaplan-Meier tanto en la supervivencia global (**Figura 35c – Resultados Trabajo I**) como en la supervivencia libre de eventos (**Figura 35d – Resultados Trabajo I**), proporcionando representatividad a la muestra analizada. Los pacientes del grupo de riesgo favorable tuvieron un mayor OS y EFS respecto al resto de pacientes. Por lo que respecta a los grupos de riesgo intermedio y adverso, las diferencias no fueron significativas entre ellos tanto para el OS como para el EFS (p-valor = 0,973 y 1,000; respectivamente). Muy destacable fue la observación de que el porcentaje de blastos ALP^{high} del grupo de riesgo intermedio (mediana: 22,89; rango: 0,26 - 96,63) fue superior al del grupo adverso (mediana: 9,53; rango: 1,62 - 26,03) (**Tabla 17 – Resultados Trabajo I**), sugiriendo que el grupo de riesgo intermedio puede incluir pacientes con riesgo adverso. Los pacientes del grupo intermedio generalmente se definen por presentar características citogenéticas y genéticas *wild type*, por lo que la actividad fosfatasa alcalina de los blastos leucémicos podría ser un indicativo de riesgo adverso, proporcionando nueva información acerca de la entidad. En contraste, cuando se analizó el OS y el EFS según el grupo ALP, se encontraron diferencias significativas en ambos casos, siendo el Grupo A (> 12% de blastos

ALP^{high}) el que presentaba una menor supervivencia (**Figura 37 – Resultados Trabajo I**).

Sabiendo que los resultados pueden estar limitados por el sesgo del número de pacientes estudiados, el hecho que el grupo ALP permita establecer un pronóstico diferencial aun teniendo un número reducido de pacientes, pone de manifiesto las potenciales implicaciones a nivel científico y clínico sobre la relevancia de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina en la leucemia a nivel celular.

Una vez demostrado que el porcentaje elevado de blastos leucémicos con actividad fosfatasa alcalina definía a un grupo de pacientes de LMA con una menor supervivencia global y libre de eventos, se investigó si podía resultar un factor de pronóstico independiente. Para ello, se realizaron los análisis univariados y multivariados, basados en el modelo de riesgo proporcional de Cox, donde se incluyeron factores pronósticos de LMA en el diagnóstico, además del grupo ALP, para evaluar el impacto de estos factores en la supervivencia global y en la supervivencia libre de eventos (**Tabla 19 – Resultados Trabajo I**). Específicamente, la edad fue un valor asociado en todos los modelos univariados y en el multivariado para el OS, donde fue el único factor significativo. Respecto al factor de riesgo favorable, únicamente no correlacionó en el análisis multivariado para el OS. El riesgo intermedio correlacionó bien en el modelo univariado tanto para el OS como para el EFS. Finalmente, el grupo ALP fue significativo en el análisis univariado para el OS y en el univariado y multivariado para el EFS, siendo así un factor pronóstico independiente para determinar la supervivencia libre de eventos. Estos resultados ponen de manifiesto la potencial relevancia de la inclusión del grupo ALP en los grupos de riesgo basados en características citogenéticas y moleculares de la ELN, pudiendo, de este modo, predecir con más exactitud el pronóstico, especialmente en aquellos pacientes

clasificados en el grupo intermedio, que presentan una supervivencia variable (329).

Las limitaciones de este estudio de naturaleza prospectiva sobre la actividad fosfatasa alcalina en el diagnóstico de leucemia mieloide aguda incluyen el reducido número de pacientes estudiados y el corto tiempo de seguimiento. La clasificación según los factores de riesgo genéticos y moleculares de la ELN 2017 (53) ha sido validada en numerosos estudios incluyendo cohortes mayores y en nuestra cohorte de 43 pacientes no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a supervivencia global y libre de eventos para todos los grupos. A pesar de ello, este estudio ofrece evidencia a la hipótesis de que la determinación de la actividad ALP celular en el momento del diagnóstico de la leucemia puede ser utilizada para evaluar el riesgo de recaída y/o a refractariedad al tratamiento de forma efectiva.

Los resultados del tratamiento de la leucemia mieloide aguda son muy variables y aun no se pueden predecir a nivel individual (330). En caso de demostrarse definitivamente que la actividad fosfatasa alcalina a nivel celular sea un factor pronóstico en el momento del diagnóstico de la leucemia, podría contribuir a investigar cómo alcanzar el objetivo final de establecimiento de riesgo a nivel individualizado, como guía para las decisiones terapéuticas según las características de cada paciente. Asimismo, también podría resultar de gran interés estudiar si la fosfatasa alcalina expresada en células leucémicas puede considerarse como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la leucemia aguda. El desarrollo de inhibidores y moduladores de la ALP (331) podría jugar un papel importante en nuevas terapias destinadas a reducir la elevada mortalidad asociada a la heterogeneidad de esta enfermedad y caracterizada por una gran multitud de alteraciones moleculares (20). Estos resultados, a su vez, podrían ser también validados en leucemia linfoblástica aguda de precursores B, ya que en

primera instancia se demostró la presencia de células refractarias con elevada actividad ALP que persistían a lo largo del tratamiento y pudiendo ser responsables de la refractariedad y de la recaída de los pacientes. Estos estudios permiten pensar que pueden llevarse a cabo nuevas investigaciones no solamente en leucemias, linfomas o mielomas, sino también en neoplasias no hematológicas.

Las claves del hallazgo de estas poblaciones celulares asociadas a una mayor refractariedad residen en la naturaleza funcional del ensayo citómico utilizado al combinarse con el estudio del inmunofenotipado convencional, por el procesamiento y análisis inmediato de la muestra con la finalidad de mantener las condiciones experimentales más aproximadas a las fisiológicas, y por la utilización de metodologías que permiten el procesamiento de las muestras de médula ósea y sangre periférica con la mínima perturbación posible. Únicamente estos procedimientos hacen posible determinar la función celular en combinación con el inmunofenotipo con los mayores niveles de sensibilidad y precisión hoy por hoy alcanzables, por lo que podrían ser también utilizados en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad residual medible. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio han sido también dirigidos a la determinación de la actividad ALP en muestras seriadas de pacientes de LMA. En algunos casos, se han detectado células ALP^{high} en pacientes con ERM negativa determinada mediante CFM. Posteriormente, estos mismos pacientes han experimentado una recidiva de la enfermedad. A pesar de tratarse de resultados muy preliminares, podrían poner de manifiesto la importancia de la determinación de la actividad fosfatasa alcalina para predecir la recaída post-tratamiento cuando la enfermedad residual no se detecta mediante las aproximaciones actuales y poder definir nuevos criterios de respuesta adicionales mediante la determinación de la actividad ALP en el grupo de pacientes en RC_{ERM}-. Será de gran interés, por tanto, demostrar si

la actividad ALP podría ayudar a identificar pacientes con enfermedad residual indetectable.

Es por todo ello que serán necesarios nuevos estudios donde se incluyan cohortes de mayor tamaño, para determinar de forma más inequívoca si la actividad ALP en las células leucémicas primitivas está asociada al potencial riesgo de recurrencia y mortalidad en los pacientes diagnosticados de LMA. También será necesario dilucidar si las células leucémicas con elevada actividad fosfatasa alcalina pueden iniciar de nuevo la leucemia, así como las características biológicas de estas células, analizando la expresión de marcadores de células madre primitivas y su asociación con la malignidad a nivel fenotípico, genético y funcional. También será de gran importancia conocer en mayor profundidad el significado biológico del incremento de la actividad fosfatasa alcalina en las células leucémicas, para que se puedan acelerar los avances en la prevención de la leucemia, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento, así como para abrir nuevas vías de investigación sobre las poblaciones de células madre leucémicas.

Otra evidencia de las potenciales aplicaciones que tiene la citómica funcional en el estudio de las neoplasias hematológicas se demuestra en el **Segundo Trabajo** de esta Tesis Doctoral. Mediante la utilización de la citómica funcional, se trató de diseñar y evaluar una nueva metodología para identificar las células supresoras de origen mielóide con expresión de PD-L1 en pacientes con mieloma múltiple, con el objetivo de predecir el éxito de la inmunoterapia en los pacientes candidatos al tratamiento con inhibidores del *checkpoint* PD-1/PD-L1.

Generalmente, las células potencialmente malignas son identificadas por el sistema inmunitario, por ejemplo, mediante el proceso de reconocimiento de la expresión aberrante de antígenos. Una vez reconocidas, son eliminadas previamente a su proliferación, evitando el inicio del proceso neoplásico. En

muchas ocasiones, estas las células iniciadoras de tumores son capaces de evadir la acción del sistema inmunitario y progresar para desarrollar un cáncer. Este mecanismo de escape de las células malignas está relacionado con la expresión de una serie de moléculas inmunosupresoras tales como PD-L1, PD-L2, CD86 y CD80, por lo que les permite alterar el reconocimiento del sistema inmunitario. De este modo, el cáncer empieza a progresar sin restricción en su expansión. Estas moléculas reconocen receptores inhibitorios presentes en los linfocitos T como PD-1, CTLA-4, Tim-3 y LAG3, que están involucrados en la supresión de la respuesta inmunitaria anti-tumoral (332).

El objetivo de la inmunoterapia es reactivar o modificar el propio sistema inmunitario para poder evitar la estrategia de evasión de las células tumorales y poder eliminarlas. Entre las inmunoterapias más extendidas, cabe destacar la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos de superficie de las células tumorales, ampliamente aplicados en diversas neoplasias hematológicas; y el uso de células CAR-T, dirigidas también a antígenos de superficie, con resultados prometedores, aunque únicamente de aplicación en ensayos clínicos (333). Otra estrategia inmunoterapéutica muy prometedora que ha surgido en los últimos años consiste en la utilización de inhibidores de diferentes *checkpoints* del sistema inmunitario. Los *checkpoints* del sistema inmunitario están determinados por ciertas moléculas cuya interacción permite activar o inhibir la respuesta inmunitaria. Concretamente, la interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 o PD-L2 lleva a la inhibición de la activación, maduración y expansión de los linfocitos T y a la inducción de la apoptosis. El bloqueo de estas moléculas con anticuerpos monoclonales, que actúan como inhibidores del *checkpoint*, es actualmente una terapia de referencia en el tratamiento de muchos tumores sólidos (303,304) y se han puesto en marcha diferentes ensayos clínicos para su utilización en neoplasias hematológicas, como es el caso del mieloma múltiple. En el mieloma múltiple se ha documentado que PD-L1 está sobreexpresado en las células

plasmáticas malignas con respecto a las células plasmáticas de pacientes sanos (334), aunque otros estudios no han puesto de manifiesto una expresión diferencial (335). Los ensayos pre-clínicos han permitido demostrar la eficacia de la administración de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 en cultivos de células plasmáticas mielomatosas junto con células T al inducir la citotoxicidad mediada por las células T efectoras y que esta citotoxicidad se incrementa cuando se administra lenalidomida (336). A nivel de ensayos clínicos, los datos obtenidos son todavía limitados (302,305–310,337). Por ejemplo, en los estudios de Lesokhin y colaboradores (305,306) para la evaluación de nivolumab, no se alcanzó la respuesta completa o parcial y la supervivencia libre de progresión fue menor que en otras enfermedades evaluadas. Por otro lado, en los estudios de Wilson y colaboradores (307) y de Badros y colaboradores (308), la combinación de pembrolizumab con pomalidomida y dexametasona en pacientes de mieloma múltiple refractarios presentó buena seguridad y tolerancia; y en los estudios de Badros y colaboradores se obtuvieron, además, respuestas duraderas. Recientemente se ha publicado la evaluación de la combinación de pembrolizumab con pomalidomida y dexametasona mediante ensayos clínicos en fase 3 en pacientes con mieloma múltiple refractario (309) y de nuevo diagnóstico (310), mostrando perfiles de riesgo-beneficio desfavorables, aún pendientes de determinar la seguridad y la supervivencia a largo plazo para los pacientes de nuevo diagnóstico.

A pesar de que la inhibición del *checkpoint* PD-1/PD-L1 pueda resultar una estrategia inmunoterapéutica prometedora, un número importante de pacientes presenta refractariedad primaria al tratamiento, dificultando una respuesta clínica óptima (338). Los mecanismos de esta refractariedad primaria no se conocen completamente, aunque el microambiente celular puede jugar un papel clave en este mecanismo. En el mieloma múltiple, una de las características reconocidas de esta entidad es la interacción bidireccional entre el microambiente de la médula

ósea y las células plasmáticas malignas (339). La sobreexpresión de PD-L1 en células del microambiente, como las MDSCs (299,301), representa una de las estrategias por las cuales el mieloma evade al sistema inmunitario y progresa. Las MDSCs, por lo tanto, pueden presentar una función importante en relación a la refractariedad a los inhibidores del *checkpoint* PD-1/PD-L1 en el MM.

De este modo, además de estudiar la expresión de PD-L1 en las células plasmáticas malignas de mieloma múltiple, es importante tener en cuenta las células del microambiente, como las MDSCs, y el papel que pueden desempeñar en la refractariedad a la inmunoterapia y en la progresión de la enfermedad. Dado que la citometría de flujo multiparamétrica permite la detección de las MDSCs, en el segundo trabajo de la presente Tesis Doctoral se analizó la expresión en superficie de PD-L1 tras elaborar un panel de *screening* de PD-L1 en MDSCs, tal y como se muestra en la **Figura 38 (Resultados Trabajo II)**, mediante anticuerpos monoclonales unidos covalentemente a fluorocromos. El panel de *screening* diseñado consistió en la combinación de 5 fluorescencias detectadas de manera simultánea y excitación de las cuales mediante 4 láseres, con la finalidad de reducir al máximo el grado de solapamiento de los espectros de emisión de los fluorocromos utilizados y, por consiguiente, la compensación electrónica de la señal de los mismos (61). Además, se utilizaron metodologías para perturbar mínimamente la muestra, manteniendo así las células en las condiciones más aproximadas a las fisiológicas (estrategia NLNW).

La clave de la metodología desarrollada reside en la utilización de células vivas y en el propósito de intentar mimetizar las condiciones fisiológicas en el mieloma múltiple, para tratar de comprender los mecanismos de regulación del ligando PD-L1 en las MDSCs. Es por ello que esta metodología pretendió obtener información válida sobre la dinámica funcional de PD-L1. Las muestras de médula ósea de los pacientes estudiados se estimularon previamente con ésteres de forbol 12-

miristato-13-acetato (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA), con efectos sobre múltiples vías de regulación, tales como la de NF- κ B, implicada en regular la expresión inducible de PD-L1 a nivel transcripcional en melanoma (340) y en cáncer de mama (341); y en la estimulación de la producción de INF γ , involucrado en la transcripción de PD-L1 en el cáncer colorrectal (342). Debido a las características descritas del PMA, y habiendo sido utilizado con éxito en diferentes ensayos basados en citometría de flujo funcional (61), esta estrategia fue aplicada en la metodología citómica diseñada para comparar los niveles de PD-L1 entre las muestras estimuladas y no estimuladas ya que no se limitó únicamente a detectar esta población a nivel inmunofenotípico.

Los recuentos de células MDSCs de muestras estimuladas fueron en general superiores o muy superiores a los recuentos en las muestras no estimuladas, poniéndose de manifiesto el evidente efecto de la estimulación de las MDSCs en presencia de PMA. Estas diferencias permitieron obtener el *fold-change* de PD-L1 en las MDSCs por cada paciente tal y como se refleja en la **Figura 39 (Resultados Trabajo II)**. En los 35 pacientes analizados, se pudieron distinguir dos grupos: pacientes no respondedores al estímulo (*fold-change* ≤ 1), formado por 2 pacientes; y pacientes respondedores al estímulo (*fold-change* > 1), formado por 33 pacientes. En estos dos grupos se pusieron de manifiesto diferencias en la expresión de PD-L1 ante estímulos extrínsecos que permitían revelar una heterogeneidad que podría ser relevante para comprender el grado de respuesta a la inmunoterapia.

Para entender las diferencias en la detección de PD-L1 observadas tras la estimulación con PMA, se estudiaron los niveles de expresión citoplasmática de la molécula (**Figura 40 – Resultados Trabajo II**), con la finalidad de confirmar si en presencia señales estimuladoras, como las mediadas por el PMA, se translocaría a la membrana celular, cumpliendo así con su función

inmunosupresora (297,298). No obstante, los niveles de PD-L1 citoplasmático resultaron ser indetectables o inferiores en relación con los detectados a nivel de superficie después de la estimulación. Estos resultados descartaron la hipótesis inicial basada en la posible translocación de la molécula PD-L1 desde el citoplasma a la membrana celular por efecto de la estimulación en presencia de PMA. El procedimiento de estimulación celular fue realizado durante 10 minutos, por lo que cualquier fenómeno de la transcripción de PD-L1 mediado por INF γ o por NF- κ B, quedó también descartado.

Adicionalmente, se exploraron los diversos tiempos de estimulación de las células en presencia de PMA, para poder comprender la dinámica de la molécula. Los resultados revelaron que el *fold-change* máximo de la molécula se podía determinar al someter la muestra a una estimulación en presencia de PMA en un tiempo comprendido entre 1 y 5 minutos, con una progresiva disminución hasta el transcurso de una hora (**Figura 41 – Resultados Trabajo II**), lo que permitió determinar que el *fold-change* se producía de una forma muy rápida y además dependía del tiempo de estimulación.

La posible y más inequívoca explicación a estos *fold-changes* variables, asociados a cambios en la expresión y/o detección de la molécula PD-L1, residiría en la existencia de un mecanismo a nivel molecular de cambio de conformación y que, en presencia de diversos estímulos, como el mediado por PMA, produzca un desplegamiento que facilite la accesibilidad al sitio de unión de la molécula (343). De confirmarse la existencia de este mecanismo inmunoregulatorio, se podría, a su vez, trasladar a mejorar la eficacia de la inmunoterapia.

Otra potencial aplicación derivada de la metodología basada en citómica funcional para la detección de PD-L1 reside en el estudio de la interacción de las MDSCs con los anticuerpos monoclonales humanizados diseñados para la inmunoterapia basada en inhibidores de PD-L1. Los ensayos de competición entre el anticuerpo

monoclonal fluorescente utilizado en el ensayo funcional y durvalumab, un anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en la inmunoterapia para inhibir PD-L1, mostraron que ambos anticuerpos reconocerían si no el mismo, un sitio de unión espacialmente muy cercano de la molécula PD-L1 en tres de los pacientes estudiados, tal y como se refleja en la **Figura 42 (Resultados Trabajo II)**, por una reducción progresiva en la detección del anticuerpo monoclonal fluorescente coincubado en presencia de concentraciones crecientes del agente inmunoterapéutico durvalumab. En uno de los pacientes, sin embargo, no se produjo esta competitividad progresiva, por lo que estos resultados podrían obedecer a modificaciones estructurales de PD-L1 debidas a mutaciones que impidieran la unión de durvalumab y la consecuente inhibición del eje PD-L1/PD-1 (343), relacionándose, por tanto, con un posible mecanismo de refractariedad a la terapia y de este modo, y a poder predecir el éxito de la misma.

La determinación de PD-L1 en las MDSCs mediante este nuevo ensayo funcional se realizó en una limitada cohorte de pacientes con mieloma múltiple. El incremento del número de casos de la cohorte, así como la homogeneización de los puntos de análisis (diagnóstico, seguimiento, tratamiento, entre otros), podría revelar diferencias entre los grupos de pacientes respondedores y no respondedores en cuanto a la evolución de la enfermedad y a la respuesta a la inmunoterapia. Si la molécula PD-L1 cambia su plegamiento en la membrana en función de los estímulos del microambiente, los inhibidores de *checkpoint* podrían no ser completamente efectivos y se deberían desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para poder dirigirse a PD-L1 de la manera más efectiva posible e inhibir su unión a PD-1. Por lo tanto, la crítica evaluación del cambio de conformación de PD-L1 puede ayudar a definir estrategias terapéuticas más efectivas o bien a predecir la refractariedad a la terapia en presencia de inhibidores de PD-L1. Asimismo, para poder explorar mecanismos todavía desconocidos de refractariedad a estas terapias, a otros inhibidores de

checkpoint, a anticuerpos monoclonales, así como terapias con células CAR-T, se podrían utilizar idóneamente este tipo de ensayos funcionales. Por todas estas razones, será necesario desarrollar más estudios que permitan dilucidar cómo PD-L1 se pliega o despliega, y cómo esta modulación conformacional juega un papel importante en la refractariedad a la inmunoterapia.

Los dos trabajos desarrollados en la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto la importancia que tiene la citómica funcional para estudiar las enfermedades hematológicas y desarrollar metodologías aplicables al diagnóstico y seguimiento de estas entidades, así como para identificar dianas terapéuticas para tratamientos basados en inmunoterapia. Desde el descubrimiento de la tecnología del hibridoma (344), se han desarrollado muchos anticuerpos monoclonales para investigación y diagnóstico de diversas enfermedades hematológicas e inmunitarias. En los próximos años, las investigaciones deberían focalizarse en la utilidad traslacional de los nuevos marcadores biológicos disponibles, dirigidos a detectar la función celular, descubriendo así, en combinación con el inmunofenotipado mediante citometría de flujo multiparamétrica, la compleja y heterogénea biología del compartimento de las células madre y del microambiente tumoral en las neoplasias hematológicas.

CONCLUSIONES

A nivel **general**, y de manera acorde al objetivo y propósito principal de esta Tesis Doctoral, se han desarrollado nuevos sistemas citómicos alternativos para mejorar estrategias terapéuticas actuales, concluyendo lo siguiente:

- Se han aportado nuevas evidencias de la importancia de la citómica funcional en el estudio de la neoplasia hematológica, concretamente, en la identificación de subpoblaciones celulares minoritarias relacionadas con la refractariedad, proporcionando abordajes complementarios a las tecnologías actuales en la comprensión de la evolución de la enfermedad.
- La heterogeneidad poblacional y tumoral debe ser contemplada desde aproximaciones que reduzcan el sesgo producido por la depleción arbitraria de las poblaciones de interés y por la pérdida de la funcionalidad celular, consiguiéndose mediante una perturbación mínima de los sujetos de estudio, en asociación con la simplicidad de los protocolos y la inmediatez en la obtención de los resultados.

Del **Primer Trabajo** se concluye lo siguiente:

- La combinación fenotípica y funcional aporta nueva información sobre el compartimento de células madre leucémicas, siendo determinante la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina cuando es asociada a los marcadores relacionados con poblaciones más primitivas.
- Las células leucémicas con una elevada actividad fosfatasa alcalina podrían contribuir a sostener la leucemogénesis y ser las responsables de la refractariedad en la leucemia aguda.
- La detección de células leucémicas con elevada actividad fosfatasa alcalina en el momento del diagnóstico de la leucemia mieloide aguda es

un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de eventos y podría ser incluida en la estratificación de riesgo actual de la entidad.

- Los hallazgos de este trabajo ofrecen continuidad a la línea de investigación y servirán para promover el desarrollo de nuevos estudios que permitan comprender el significado biológico de las subpoblaciones celulares caracterizadas por una actividad incrementada de la enzima fosfatasa alcalina.

Del **Segundo Trabajo** se concluye lo siguiente:

- La combinación de la detección inmunofenotípica de PD-L1 sobre las MDSCs en conjunto con la estimulación celular permite obtener información válida sobre la dinámica funcional de la molécula, revelando diferencias en la reactividad de PD-L1, como reflejo de las complejas interacciones estéricas del eje PD-1/PD-L1.
- Las diferencias observadas entre pacientes respondedores y no respondedores al estímulo de PD-L1 y en los ensayos de competición con la inmunoterapia sugieren una gran plasticidad estérica de la molécula, que combinada con la existencia de mutantes para ligando, contribuya a explicar la gran heterogeneidad en el grado de respuesta a la inmunoterapia.
- Esta aproximación fenotípica y funcional puede contribuir a revelar la plasticidad estérica de otras dianas terapéuticas, siendo relevante para el desarrollo de nuevos anticuerpos humanizados y para monitorizar la eficacia de inmunoterapias basadas en CAR-Ts, anticuerpos monoclonales e inhibidores o activadores de otros ejes de control del sistema inmunitario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013 Jun;140(12):2463–7.
2. Calvi LM, Link DC. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood*. 2015 Nov 26;126(22):2443–51.
3. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol*. 1963 Dec 1;62(3):327–36.
4. Ogawa M, LaRue AC, Mehrotra M. Hematopoietic stem cells are pluripotent and not just hematopoietic. *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Jun;51(1):3–8.
5. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157–68.
6. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994 Nov;1(8):661–73.
7. Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, et al. Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells with Extended but Time-Limited Reconstitution Potential. *Cell Stem Cell*. 2010 Jan 8;6(1):48–58.
8. Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development*. 2014 Dec 15;141(24):4656–66.
9. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):193–7.
10. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997 Nov 28;91(5):661–72.
11. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Dec 1;4(12):a008250.
12. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*. 2019;195:4555–63.
13. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry*. 2004 Jul;60B(1):1–13.
14. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011 Jan 19;469(7330):314–22.
15. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). International agency for research on Cancer (IARC). Lyon; 2017. 4002 p.
16. Noone A, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015 [Internet]. National Cancer Institute. 2018 [cited 2019 Apr 9]. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/
17. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan 1;69(1):7–34.

Referencias bibliográficas

18. Kyle RA, Pierre R V., Bayrd ED. Multiple Myeloma and Acute Myelomonocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 1970 Nov 19;283(21):1121–5.
19. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002 Aug 13;100(5):1532–42.
20. Grimwade D, Mrózek K. Diagnostic and Prognostic Value of Cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011 Dec;25(6):1135–61.
21. Kulsoom B, Shamsi TS, Ahmed N, Hasnain SN. Clinical presentation of acute myeloid leukaemia - A decade-long institutional follow-up. *J Pak Med Assoc.* 2017 Dec;67(12):1837–42.
22. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002 Sep 18;100(7):2292–302.
23. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2013 May 30;368(22):2059–74.
24. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976 Aug;33(4):451–8.
25. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985 Oct;103(4):620–5.
26. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985 Sep;103(3):460–2.
27. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol.* 1991 Jul;78(3):325–9.
28. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet.* 2000 Jan 15;355(9199):165–9.
29. Skibola CF, Slager SL, Berndt SI, Lightfoot T, Sampson JN, Morton LM, et al. Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Adult Acute Lymphocytic Leukemia: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monogr.* 2014 Aug 1;2014(48):125–9.
30. Sehgal S, Mujtaba S, Gupta D, Aggarwal R, Marwaha R. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: A preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53(1):63–7.
31. Gérinière L, Bastion Y, Dumontet C, Salles G, Espinouse D, Coiffier B. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1994 May;5(5):437–40.
32. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijaykrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2009 Sep 16;41(9):1006–10.

33. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet.* 2010 Jun 9;42(6):492–4.
34. Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC, Yang W, Cheng C, Pei D, et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet.* 2013 Dec 20;45(12):1494–8.
35. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2013 Jun 1;381(9881):1943–55.
36. Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. *Oncogene.* 2004 Aug 23;23(38):6341–8.
37. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2018 Aug 21;18(8):471–84.
38. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* 2012 May;26(3):123–35.
39. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 1981 Apr;47(4):553–61.
40. Bladé J, Kyle RA. Nonsecretory myeloma, immunoglobulin D myeloma, and plasma cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999 Dec;13(6):1259–72.
41. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst.* 1982 Aug;69(2):323–8.
42. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res.* 1994 Feb;137(2 Suppl):S68-97.
43. Khuder SA, Mutgi AB. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med.* 1997 Nov;32(5):510–6.
44. Bergsagel DE, Wong O, Bergsagel PL, Alexanian R, Anderson K, Kyle RA, et al. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. *Blood.* 1999 Aug 15;94(4):1174–82.
45. Mitchell JS, Li N, Weinhold N, Försti A, Ali M, van Duin M, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. *Nat Commun.* 2016 Dec 1;7(1):12050.
46. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009 May 28;113(22):5412–7.
47. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim.* 2017 Jul 20;3:17046.
48. Ribourtout B, Zandecki M. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *Morphologie.* 2015 Jun;99(325):38–62.

Referencias bibliográficas

49. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014 Nov;15(12):e538–48.
50. Robillard N, Wuillème S, Moreau P, Béné MC. Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. *Front Immunol.* 2014;5:137.
51. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017 Oct 10;31(10):2094–103.
52. Paiva B, Puig N, Cedena MT, de Jong BG, Ruiz Y, Rapado I, et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia.* 2017 Feb 1;31(2):382–92.
53. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017 Jan 26;129(4):424–47.
54. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C, et al. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016 Apr 7;27(5):69–82.
55. Caers J, Garderet L, Kortüm KM, O'Dwyer ME, van de Donk NWCJ, Binder M, et al. European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. *Haematologica.* 2018 Nov;103(11):1772–84.
56. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos M V., Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017 Jul 1;28(4):52–61.
57. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier M-F, Courtade-Saïdi M, Vincent S, et al. Guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFA. *Cytopathology.* 2016 Oct;27(5):359–68.
58. Mihova D. Acute myeloid leukemia without maturation (FAB AML M1) [Internet]. *Pathology Outlines.* 2013 [cited 2019 Apr 9]. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaM1.html>
59. Mihova D. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) - general [Internet]. *Pathology Outlines.* 2013 [cited 2019 Apr 9]. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaALL.html>
60. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008 Jan 11;111(8):3941–67.
61. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol.* 2017;47(10).
62. Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2018;2(11):1356–66.

63. Landgren O, Devlin S, Boulad M, Mailankody S. Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Dec 5;51(12):1565–8.
64. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017 Jan 19;129(3):347–57.
65. Macey MG. Principles of Flow Cytometry. In: Macey MG, editor. *Flow Cytometry Principles and Applications*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 1–15.
66. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017 Feb 17;37(2):163–76.
67. Crosland-Taylor P. A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube. *Nature*. 1953 Jan;171(4340):37–8.
68. Mcclish M, Farrell R, Vanderpuye K, Shah KS. A Reexamination of Deep Diffused Silicon Avalanche Photodiode Gain and Quantum Efficiency. *IEEE Trans Nucl Sci*. 2006 Oct;53(5):3049–54.
69. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. In: *Biotechnology annual review*. 2005. p. 227–56.
70. McCarthy DA. Fluorochromes and Fluorescence. In: *Flow Cytometry Principles and Applications*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 59–112.
71. Mahnke Y, Chattopadhyay P, Roederer M. Publication of optimized multicolor immunofluorescence panels. *Cytom Part A*. 2010 Sep 1;77A(9):814–8.
72. Roederer M, Tárnok A. OMIPs—Orchestrating multiplexity in polychromatic science. *Cytom Part A*. 2010 Sep 1;77A(9):811–2.
73. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep 3;26(9):1908–75.
74. Kalina T, Flores-Montero J, Velden VHJ van der, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):1986.
75. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011 Apr 21;25(4):567–74.
76. Lacombe F, Bernal E, Bloxham D, Couzens S, Porta MGD, Johansson U, et al. Harmonemia: a universal strategy for flow cytometry immunophenotyping—A European LeukemiaNet WP10 study. *Leukemia*. 2016 Aug 29;30(8):1769–72.
77. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*. 1993 Nov;100(5):534–40.
78. Vial JP, Lacombe F. Immunophenotyping of acute leukemia: utility of CD45 for blast cell

- identification. *Methods Cell Biol.* 2001;64:343–58.
79. Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia.* 2000 May;14(5):816–25.
 80. Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, Deneys V, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia.* 2003 Mar 19;17(3):515–27.
 81. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T, et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Ev. *Leukemia.* 2001 Aug;15(8):1185–92.
 82. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):730–7.
 83. Rehe K, Wilson K, Bomken S, Williamson D, Irving J, den Boer ML, et al. Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO Mol Med.* 2013 Jan;5(1):38–51.
 84. Seegmiller AC, Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ. Immunophenotypic Differentiation Between Neoplastic Plasma Cells in Mature B-Cell Lymphoma vs Plasma Cell Myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2007 Feb 1;127(2):176–81.
 85. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2008 Mar 1;93(3):431–8.
 86. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2016 Apr;101(4):407–16.
 87. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017 Mar 20;35(9):975–83.
 88. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 2015 Sep 10;33(26):2863–9.
 89. Drets ME, Shaw MW. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Sep;68(9):2073–7.
 90. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN 2013 : an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, editors. Karger; 2013. 140 p.
 91. Ma H, Yang J, Xiang B, Jia Y. Acute myeloid leukemia with monosomy 7, ectopic virus integration site-1 overexpression and central diabetes insipidus: A case report. *Oncol Lett.* 2015 Jun;9(6):2459–62.
 92. Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring*

- Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:151–7.
93. Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* (80-). 1992 Oct 30;258(5083):818–21.
 94. Jarošová M, Mihál V, Holzrová M, Jedličková K, Pospíšilová D, Píkalová Z, et al. Double fusion signal BCR/ABL, detected by FISH on chromosomes 9 and 22 in a child with ALL. *Leukemia*. 2000 Jul 17;14(7):1319–22.
 95. Leoni V, Biondi A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015 Mar;100(3):295–9.
 96. Sun C, Chang L, Zhu X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(21):35445–59.
 97. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutiérrez NC, Liebisch P, O'Connor S, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2012 Aug 1;97(8):1272–7.
 98. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999 May 1;93(9):3074–80.
 99. Gaballa S, Saliba R, Oran B, Brammer JE, Chen J, Rondon G, et al. Relapse risk and survival in patients with FLT3 mutated acute myeloid leukemia undergoing stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2017 Apr;92(4):331–7.
 100. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007 Apr 7;446(7137):758–64.
 101. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, de Knecht Y, Peeters J, Jauch A, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*. 2010 Oct 7;116(14):2543–53.
 102. Lindqvist CM, Lundmark A, Nordlund J, Freyhult E, Ekman D, Almlöf JC, et al. Deep targeted sequencing in pediatric acute lymphoblastic leukemia unveils distinct mutational patterns between genetic subtypes and novel relapse-associated genes. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):64071–88.
 103. Jiménez C, Jara-Acevedo M, Corchete LA, Castillo D, Ordóñez GR, Sarasquete ME, et al. A Next-Generation Sequencing Strategy for Evaluating the Most Common Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *J Mol Diagnostics*. 2017 Jan;19(1):99–106.
 104. Handschuh L, Kaźmierczak M, Milewski M, Góralski M, Łuczak M, Wojtaszewska M, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. *Int J Oncol*. 2017 Dec 28;52(3):656–78.
 105. Hashiguchi J, Onozawa M, Okada K, Amano T, Hatanaka KC, Nishihara H, et al. Quantitative detection of IKZF1 deletion by digital PCR in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2019 Apr 20;41(2):e38–40.

Referencias bibliográficas

106. Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood*. 2012 Nov 29;120(23):4470–81.
107. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):1952–8.
108. Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, Huguet F, Boulland M-L, Leguay T, et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3739–49.
109. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, Montesinos P, Sarrà J, González-Campos J, et al. Treatment of High-Risk Philadelphia Chromosome–Negative Acute Lymphoblastic Leukemia in Adolescents and Adults According to Early Cytologic Response and Minimal Residual Disease After Consolidation Assessed by Flow Cytometry: Final Results of the PETHEMA. *J Clin Oncol*. 2014 May 20;32(15):1595–604.
110. Chen X, Xie H, Wood BL, Walter RB, Pagel JM, Becker PS, et al. Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2015 Apr 10;33(11):1258–64.
111. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic J V., Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 2016 Feb 4;374(5):422–33.
112. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Del Principe MI, Fraboni D, Panetta P, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2295–303.
113. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016 Aug;17(8):e328–46.
114. Lahuerta J-J, Paiva B, Vidriales M-B, Cordon L, Cedena M-T, Puig N, et al. Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three PETHEMA/GEM Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 2017 Sep;35(25):2900–10.
115. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma. *JAMA Oncol*. 2017 Jan 1;3(1):28–35.
116. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1275–91.
117. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2016 Jan;90(1):47–53.
118. Paiva B, Cedena M-T, Puig N, Arana P, Vidriales M-B, Cordon L, et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood*. 2016 Jun 23;127(25):3165–74.
119. Paiva B, van Dongen JJM, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal

- residual disease in multiple myeloma. *Blood*. 2015 May 14;125(20):3059–68.
120. Brüggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2017;2017(1):13–21.
 121. Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, Falk M, Renziehausen A, Troff C, et al. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *Br J Haematol*. 1999 Apr 1;105(1):241–55.
 122. Bahia DM, Yamamoto M, Chauffaille M de L, Kimura EY, Bordin JO, Filgueiras MA, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. *Haematologica*. 2001 Aug;86(8):801–6.
 123. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3574–80.
 124. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Feb 18;111(7):2548–53.
 125. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014 Feb 12;506(7488):328–33.
 126. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007 Apr 8;21(4):604–11.
 127. Jan M, Majeti R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*. 2013 Jan 10;32(2):135–40.
 128. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. *Blood*. 1997 Jan 1;89(1):219–26.
 129. Ravandi F, Jorgensen JL, Thomas DA, O'Brien S, Garris R, Faderl S, et al. Detection of MRD may predict the outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive ALL treated with tyrosine kinase inhibitors plus chemotherapy. *Blood*. 2013 Aug 15;122(7):1214–21.
 130. Chen Y, Kantarjian H, Wang H, Cortes J, Ravandi F. Acute promyelocytic leukemia: A population-based study on incidence and survival in the United States, 1975-2008. *Cancer*. 2012 Dec 1;118(23):5811–8.
 131. Sinha C, Cunningham LC, Liu PP. Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: New Prognostic Categories and Therapeutic Opportunities. *Semin Hematol*. 2015 Jul;52(3):215–22.
 132. Grimwade D, Jovanovic J V., Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, et al. Prospective

- Minimal Residual Disease Monitoring to Predict Relapse of Acute Promyelocytic Leukemia and to Direct Pre-Emptive Arsenic Trioxide Therapy. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 1;27(22):3650–8.
133. Yin JAL, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012 Oct 4;120(14):2826–35.
134. Scholl C, Schlenk RF, Eiwien K, Döhner H, Fröhling S, Döhner K, et al. The prognostic value of MLL-AF9 detection in patients with t(9;11)(p22;q23)-positive acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005 Dec;90(12):1626–34.
135. Falini B, Mecucci C, Saglio G, Coco FL, Diverio D, Brown P, et al. NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008 Mar 1;93(3):439–42.
136. Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*. 2013 Jul 4;122(1):83–92.
137. Hubmann M, Köhnke T, Hoster E, Schneider S, Dufour A, Zellmeier E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica*. 2014 Aug;99(8):1317–25.
138. Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Evaluation of Digital PCR for Absolute RNA Quantification. *PLoS One*. 2013;8(9):75296.
139. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for Digital PCR as an Accurate Molecular Diagnostic Tool. *Clin Chem*. 2014;61(1):79–88.
140. Parkin B, Londoño-Joshi A, Kang Q, Tewari M, Rhim AD, Malek SN. Ultrasensitive mutation detection identifies rare residual cells causing acute myelogenous leukemia relapse. *J Clin Invest*. 2017 Aug 21;127(9):3484–95.
141. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013 Dec;98(6):236–8.
142. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014 Jun 17;28(6):1299–307.
143. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, Gonzalez M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014 May 15;123(20):3073–9.
144. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982 Dec;5(6):649–55.
145. Palumbo A, Bringhen S, Mateos M-V, Larocca A, Facon T, Kumar SK, et al. Geriatric assessment predicts survival and toxicities in elderly myeloma patients: an International

- Myeloma Working Group report. *Blood*. 2015 Mar 26;125(13):2068–74.
146. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079–89.
 147. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.
 148. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. 2017 Mar 20;35(9):934–46.
 149. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1875–91.
 150. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Löwenberg B, Naoe T, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2019 Apr 11;133(15):1630–43.
 151. Hoelzer D, Thiel E, Löffler H, Büchner T, Ganser A, Heil G, et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 1988 Jan;71(1):123–31.
 152. Gökbuget N, Hoelzer D, Arnold R, Böhme A, Bartram CR, Freund M, et al. Treatment of Adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000 Dec;14(6):1307–25.
 153. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Richards SM, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3760–7.
 154. Lazarus HM, Richards SM, Chopra R, Litzow MR, Burnett AK, Wiernik PH, et al. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2006 Jul 15;108(2):465–72.
 155. Salmon SE, Durie BG. Clinical staging and new therapeutic approaches in multiple myeloma. *Recent results cancer Res*. 1978;65:12–20.
 156. Greipp PR, Miguel JS, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412–20.
 157. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2001 Oct 13;358(9289):1239–41.
 158. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncol*. 2017 Jul 13;3(7):e170580.
 159. Othus M, Wood BL, Stirewalt DL, Estey EH, Petersdorf SH, Appelbaum FR, et al. Effect of measurable ('minimal') residual disease (MRD) information on prediction of relapse and

- survival in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016 Oct 2;30(10):2080–3.
160. Freeman SD, Hills RK, Virgo P, Khan N, Couzens S, Dillon R, et al. Measurable Residual Disease at Induction Redefines Partial Response in Acute Myeloid Leukemia and Stratifies Outcomes in Patients at Standard Risk Without *NPM1* Mutations. *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15):1486–97.
 161. Kayser S, Schlenk RF, Platzbecker U. Management of patients with acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2018 Jun 24;32(6):1277–94.
 162. Krug U, Röllig C, Koschmieder A, Heinecke A, Sauerland MC, Schaich M, et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *Lancet*. 2010 Dec 11;376(9757):2000–8.
 163. Klepin HD, Geiger AM, Tooze JA, Kritchevsky SB, Williamson JD, Pardee TS, et al. Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2013 May 23;121(21):4287–94.
 164. Klepin HD. Geriatric perspective: how to assess fitness for chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2014 Dec 1;2014(1):8–13.
 165. Vives S, Oriol A, Piernas S, Brunet S, Clapés V, Guardia R, et al. Feasibility and efficacy of outpatient therapy with intermediate dose cytarabine, fludarabine and idarubicin for patients with acute myeloid leukaemia aged 70 or older. *Eur J Haematol*. 2015 Dec;95(6):576–82.
 166. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):562–9.
 167. Buysse M, Squifflet P, Lange BJ, Alonzo TA, Larson RA, Kolitz JE, et al. Individual patient data meta-analysis of randomized trials evaluating IL-2 monotherapy as remission maintenance therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7007–13.
 168. Patel B, Rai L, Buck G, Richards SM, Mortuza Y, Mitchell W, et al. Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukaemia: final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993. *Br J Haematol*. 2010 Jan;148(1):80–9.
 169. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005 Oct 13;107(3):1116–23.
 170. Mateos M-V, Dimopoulos MA, Cavo M, Suzuki K, Jakubowiak A, Knop S, et al. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2018 Feb 8;378(6):518–28.
 171. Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood*. 2015 May 14;125(20):3076–84.
 172. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27;354(17):1813–26.

173. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, Di Raimondo F, Ben Yehuda D, Petrucci MT, et al. Autologous Transplantation and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2014 Sep 4;371(10):895–905.
174. Østgård LSG, Lund JL, Nørgaard JM, Nørgaard M, Medeiros BC, Nielsen B, et al. Impact of Allogeneic Stem Cell Transplantation in First Complete Remission in Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Feb;24(2):314–23.
175. Dhedin N, Huynh A, Maury S, Tabrizi R, Beldjord K, Asnafi V, et al. Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015 Apr 16;125(16):2486–96.
176. Panch SR, Szymanski J, Savani BN, Stroncek DF. Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Aug;23(8):1241–9.
177. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, et al. HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N Engl J Med*. 2014 Jul 24;371(4):339–48.
178. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Jan;13(1):10–24.
179. Padmanabhan A. Cellular collection by apheresis. *Transfusion*. 2018 Feb;58:598–604.
180. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, et al. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2012 Jul;158(1):30–45.
181. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):11–6.
182. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts. *N Engl J Med*. 1979 May 10;300(19):1068–73.
183. Ravandi F, Cortes JE, Jones D, Faderl S, Garcia-Manero G, Konopleva MY, et al. Phase I/II Study of Combination Therapy With Sorafenib, Idarubicin, and Cytarabine in Younger Patients With Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1856–62.
184. Serve H, Krug U, Wagner R, Sauerland MC, Heinecke A, Brunnberg U, et al. Sorafenib in Combination With Intensive Chemotherapy in Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 1;31(25):3110–8.
185. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, Geyer S, Bloomfield CD, Dohner K, et al. The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin Prolongs Survival Compared with Placebo in Combination with Daunorubicin/Cytarabine Induction, High-Dose C Consolidation, and As Maintenance Therapy in Newly Diagnosed AML Patients Age 18-60 with FLT3 Mutations. *Blood*. 2015;126(23):6.
186. Chen Y, Pan Y, Guo Y, Zhao W, Ho WT, Wang J, et al. Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia. *Stem Cell Investig*. 2017 Jun 2;4(6):48.
187. Thomas DA, Faderl S, Cortes J, O'Brien S, Giles FJ, Kornblau SM, et al. Treatment of

- Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood*. 2004 Feb 12;103(12):4396–407.
188. de Labarthe A, Rousselot P, Huguet-Rigal F, Delabesse E, Witz F, Maury S, et al. Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1408–13.
 189. Foa R, Vitale A, Vignetti M, Meloni G, Guarini A, De Propriis MS, et al. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6521–8.
 190. Waibel M, Solomon VS, Knight DA, Ralli RA, Kim S-K, Banks K-M, et al. Combined Targeting of JAK2 and Bcl-2/Bcl-xL to Cure Mutant JAK2-Driven Malignancies and Overcome Acquired Resistance to JAK2 Inhibitors. *Cell Rep*. 2013 Nov 27;5(4):1047–59.
 191. Neri LM, Cani A, Martelli AM, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*. 2014 Apr 29;28(4):739–48.
 192. Suryani S, Bracken LS, Harvey RC, Sia KCS, Carol H, Chen I-M, et al. Evaluation of the In Vitro and In Vivo Efficacy of the JAK Inhibitor AZD1480 against JAK-Mutated Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2015 Feb 1;14(2):364–74.
 193. Tasian SK, Teachey DT, Li Y, Shen F, Harvey RC, Chen I-M, et al. Potent efficacy of combined PI3K/mTOR and JAK or ABL inhibition in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017 Jan 12;129(2):177–87.
 194. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 May 2;121(18):3563–72.
 195. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted Inhibition of Mutant IDH2 in Leukemia Cells Induces Cellular Differentiation. *Science* (80-). 2013 May 3;340(6132):622–6.
 196. DiNardo CD, Stein EM, De Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable remissions with ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML. *N Engl J Med*. 2018 Jun 21;378(25):2386–98.
 197. Chen C-W, Armstrong SA. Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. *Exp Hematol*. 2015 Aug;43(8):673–84.
 198. Stein EM, Garcia-Manero G, Rizzieri DA, Tibes R, Berdeja JG, Savona MR, et al. The DOT1L inhibitor pinometostat reduces H3K79 methylation and has modest clinical activity in adult acute leukemia. *Blood*. 2018 Jun 14;131(24):2661–9.
 199. Abdollahpour-Alitappeh M, Razavi-Vakhshourpour S, Abolhassani M. Development of a new anti-CD123 monoclonal antibody to target the human CD123 antigen as an acute myeloid leukemia cancer stem cell biomarker. *Biotechnol Appl Biochem*. 2018 Nov 30;65(6):841–7.
 200. Egan PC, Reagan JL. The return of gemtuzumab ozogamicin: a humanized anti-CD33 monoclonal antibody–drug conjugate for the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther*. 2018 Nov;11:8265–72.

201. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Sep 15;375(11):1044–53.
202. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera J-M, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2017 Mar 2;376(9):836–47.
203. Kantarjian H, Ravandi F, Short NJ, Huang X, Jain N, Sasaki K, et al. Inotuzumab ozogamicin in combination with low-intensity chemotherapy for older patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2018 Feb;19(2):240–8.
204. McKeage K. Daratumumab: First Global Approval. *Drugs*. 2016 Feb 4;76(2):275–81.
205. Facon T, Kumar S, Plesner T, Orlowski RZ, Moreau P, Bahlis N, et al. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2019 May 30;380(22):2104–15.
206. Wang J, Hu Y, Huang H. Current development of chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Stem Cell Investig*. 2018;5:44.
207. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra25.
208. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016 Apr 25;126(6):2123–38.
209. Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018 Feb;378(5):449–59.
210. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*. 2018 Jan 20;24(1):20–8.
211. Kim MY, Yu K-R, Kenderian SS, Ruella M, Chen S, Shin T-H, et al. Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. 2018 May 31;173(6):1439-1453.e19.
212. Petrov JC, Wada M, Pinz KG, Yan LE, Chen KH, Shuai X, et al. Compound CAR T-cells as a double-pronged approach for treating acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018 Jun 25;32(6):1317–26.
213. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*. 2016 Sep 29;128(13):1688–700.
214. Zhao W-H, Liu J, Wang B-Y, Chen Y-X, Cao X-M, Yang Y, et al. A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol*. 2018 Dec 20;11(1):141.

Referencias bibliográficas

215. Huxley J. Biological aspects of cancer. *Br Med J*. 1958 Aug;2(5094):494.
216. Barranco SC, Ho DHW, Drewinko B, Romsdahl MM, Humphrey RM. Differential Sensitivities of Human Melanoma Cells Grown in Vitro to Arabinosylcytosine. *Cancer Res*. 1972;32(12):2733–6.
217. Danielson KG, Anderson LW, Hosick HL. Selection and characterization in culture of mammary tumor cells with distinctive growth properties in vivo. *Cancer Res*. 1980 Jun;40(6):1812–9.
218. Dexter DL, Spremulli EN, Fligiel Z, Barbosa JA, Vogel R, VanVoorhees A, et al. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am J Med*. 1981 Dec 1;71(6):949–56.
219. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res*. 1984 Jun;44(6):2259–65.
220. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883–92.
221. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers. *Cell*. 2012 Sep 14;150(6):1121–34.
222. Kandath C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):333–9.
223. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Nov 8;15(2):81–94.
224. Lang F, Wojcik B, Rieger MA. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Stem Cells Int*. 2015 Jul 6;2015:137164.
225. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov;414(6859):105–11.
226. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Res*. 2006 Feb 15;66(4):1883–90.
227. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):283–96.
228. Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol*. 2017 Aug;232(8):2008–18.
229. Akbarzadeh M, Maroufi NF, Tazehkand AP, Akbarzadeh M, Bastani S, Safdari R, et al. Current approaches in identification and isolation of cancer stem cells. *J Cell Physiol*. 2019 Feb 11;
230. Horton SJ, Huntly BJP. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*. 2012 Jul 1;97(7):966–74.
231. Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA, et al. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to

- chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res.* 2000 Aug 15;60(16):4403–11.
232. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol.* 2007 Nov 21;25(11):1315–21.
233. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High Stem Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Predicts High Minimal Residual Disease and Poor Survival. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep 15;11(18):6520–7.
234. Bachas C, Schuurhuis GJ, Assaraf YG, Kwidama ZJ, Kelder A, Wouters F, et al. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia.* 2012 Jun 13;26(6):1313–20.
235. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, Rutten AP, Snel AN, Scholten WJ, et al. Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. Bunting KD, editor. *PLoS One.* 2014 Sep 22;9(9):e107587.
236. Bradbury C, Houlton AE, Akiki S, Gregg R, Rindl M, Khan J, et al. Prognostic value of monitoring a candidate immunophenotypic leukaemic stem/progenitor cell population in patients allografted for acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2015 Apr 26;29(4):988–91.
237. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, Abelson S, Ng SWK, Trotman-Grant A, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature.* 2017 Jul 28;547(7661):104–8.
238. Jentzsch M, Bill M, Nicolet D, Leiblein S, Schubert K, Pless M, et al. Prognostic impact of the CD34+/CD38– cell burden in patients with acute myeloid leukemia receiving allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2017 Apr;92(4):388–96.
239. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2019 May 12;33(5):1102–12.
240. Kong Y, Yoshida S, Saito Y, Doi T, Nagatoshi Y, Fukata M, et al. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38–CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia.* 2008 Jun 17;22(6):1207–13.
241. Testa U. Leukemic Stem Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. In: *Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and Future Perspectives in Translational Oncology.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 333–89.
242. Elder A, Bomken S, Wilson I, Blair HJ, Cockell S, Ponthan F, et al. Abundant and equipotent founder cells establish and maintain acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* 2017 Dec 10;31(12):2577–86.
243. Yaccoby S. Two States of Myeloma Stem Cells. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018 Jan;18(1):38–43.
244. Luria SE, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics.* 1943;28(6):491–511.
245. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med.* 2017 Oct 6;23(10):1135–45.

Referencias bibliográficas

246. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2015 Dec 19;6(1):6604.
247. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):506–10.
248. Parkin B, Ouillette P, Li Y, Keller J, Lam C, Roulston D, et al. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2013 Jan 10;121(2):369–77.
249. Corre J, Cleynen A, Robiou du Pont S, Buisson L, Bolli N, Attal M, et al. Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia*. 2018 Dec 12;32(12):2636–47.
250. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
251. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells. In: *Advances in Cancer Research*. 2015. p. 95–139.
252. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):284–90.
253. Dolcetti L, Marigo I, Mantelli B, Peranzoni E, Zanovello P, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett*. 2008 Aug 28;267(2):216–25.
254. Nagaraj S, Schrum AG, Cho H-I, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T Cell Tolerance Induced by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):3106–16.
255. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T-Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):68–77.
256. Adeegbe D, Serafini P, Bronte V, Zoso A, Ricordi C, Inverardi L. In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell Transplant*. 2011 Jul;20(6):941–54.
257. Gorgun GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):2975–87.
258. O'Donnell EA, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Netw*. 2013 Apr;13(2):43–54.
259. Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2013 Jan;Chapter 1:Unit1.27.
260. Davies E, Stankovic B, Azama K, Shibata K, Abe S. Novel components of the plant cytoskeleton: a beginning to plant 'cytomics.' *Plant Sci*. 2001 Jan 5;160(2):185–96.
261. Valet G. Predictive medicine by cytomics: potential and challenges. *J Biol Regul Homeost*

- Agents. 2002;16(2):164–7.
262. Valet GK, Tárnok A. Cytomics in predictive medicine. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2003 May 1;53B(1):1–3.
263. Valet G, Leary JF, Tárnok A. Cytomics-New technologies: Towards a human cytochrome project. *Cytom Part A*. 2004 Jun;59A(2):167–71.
264. Valet G, Murphy RF, Robinson JP, Tarnok A, Kriete A. Cytomics: From Cell States to Predictive Medicine. *Comput Syst Biol*. 2006 Jan 1;363–81.
265. Bernas T, Grégori G, Asem EK, Robinson JP. Integrating cytomics and proteomics. *Mol Cell proteomics*. 2006 Jan 1;5(1):2–13.
266. Herrera G, Diaz L, Martinez-Romero A, Gomes A, Villamón E, Callaghan RC, et al. Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicol Vitro*. 2007 Mar 1;21(2):176–82.
267. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997 Dec;3(12):1337–45.
268. Leng Z, Yang Z, Li L, Zhong X, Zhou H, Li Y, et al. A reliable method for the sorting and identification of ALDHhigh cancer stem cells by flow cytometry. *Exp Ther Med*. 2017 Oct;14(4):2801–8.
269. Singh U, Quintanilla RH, Grecian S, Gee KR, Rao MS, Lakshmiopathy U. Novel Live Alkaline Phosphatase Substrate for Identification of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports*. 2012 Sep 18;8(3):1021–9.
270. Tamul KR, O’Gorman MR, Donovan M, Schmitz JL, Folds JD. Comparison of a lysed whole blood method to purified cell preparations for lymphocyte immunophenotyping: differences between healthy controls and HIV-positive specimens. *J Immunol Methods*. 1994 Jan 3;167(1–2):237–43.
271. Greve B, Beller C, Cassens U, Sibrowski W, Severin E, Göhde W. High-Grade Loss of Leukocytes and Hematopoietic Progenitor Cells Caused by Erythrocyte-Lysing Procedures for Flow Cytometric Analyses. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003 Jun;12(3):321–30.
272. Einwallner E, Subasic A, Strasser A, Augustin D, Thalhammer R, Steiner I, et al. Lysis matters: Red cell lysis with FACS Lyse affects the flow cytometric enumeration of circulating leukemic blasts. *J Immunol Methods*. 2013 Apr 30;390(1–2):127–32.
273. Petriz J, Bradford JA, Ward MD. No lyse no wash flow cytometry for maximizing minimal sample preparation. *Methods*. 2018 Feb 1;134–135:149–63.
274. Fornas O, Garcia J, Petriz J. Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):833–6.
275. Allan RW, Ansari-Lari MA, Jordan S. DRAQ5-Based, No-Lyse, No-Wash Bone Marrow Aspirate Evaluation by Flow Cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2008 May 1;129(5):706–13.
276. Ost V, Neukammer J, Rinneberg H. Flow cytometric differentiation of erythrocytes and leukocytes in dilute whole blood by light scattering. *Cytometry*. 1998 Jul 1;32(3):191–7.

Referencias bibliográficas

277. Goddard G, Kaduchak G. Ultrasonic particle concentration in a line-driven cylindrical tube. *J Acoust Soc Am*. 2005 Jun;117(6):3440–7.
278. Ward MD, Kaduchak G. Fundamentals of Acoustic Cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2018 Apr;84(1):e36.
279. Life Technologies Corporation. Attune® Acoustic Focusing Cytometer: User Guide. 2014.
280. Petriz J. Flow Cytometry of the Side Population (SP). *Curr Protoc Cytom*. 2013 Apr 1;64(1):9.23.1-9.23.20.
281. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950 Jan;3(1):32–5.
282. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc*. 1958 Jun;53(282):457–81.
283. Hass PE, Wada HG, Herman MM, Sussman HH. Alkaline phosphatase of mouse teratoma stem cells: immunochemical and structural evidence for its identity as a somatic gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Mar;76(3):1164–8.
284. Terao M, Mintz B. Cloning and characterization of a cDNA coding for mouse placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Oct;84(20):7051–5.
285. Berstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Dec;70(12):3899–903.
286. McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes. *Biochem J*. 1979 Jul 1;181(1):67–73.
287. Seargeant LE, Stinson RA. Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature*. 1979 Sep;281(5727):152–4.
288. Kabat EA, Furth J. A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues. *Am J Pathol*. 1941 May;17(3):303-318.5.
289. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
290. Magnusson P, Sharp CA, Magnusson M, Risteli J, Davie MWJ, Larsson L. Effect of chronic renal failure on bone turnover and bone alkaline phosphatase isoforms. *Kidney Int*. 2001 Jul;60(1):257–65.
291. Blayney MJ, Pisoni RL, Bragg-Gresham JL, Bommer J, Piera L, Saito A, et al. High alkaline phosphatase levels in hemodialysis patients are associated with higher risk of hospitalization and death. *Kidney Int*. 2008 Sep;74(5):655–63.
292. Rosenblum D, Petzold SJ. Granulocyte alkaline phosphatase. Studies of purified enzymes from normal subjects and patients with polycythemia vera. *J Clin Invest*. 1973 Jul;52(7):1665–72.
293. Tsuruta T, Tani K, Hoshikaa A, Asano S. Alkaline Phosphatase, Defensin Gene Expression and Effect of Myeloid Cell Growth Factors in Normal and Leukemic Cells. *Leuk Lymphoma*. 1999 Jan 5;32(3–4):237–47.

294. Okuda K, Kanamaru A, Ueda E, Kitani T, Nagai K. Membrane expression of decay-accelerating factor on neutrophils from normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1990 Mar 1;75(5):1186–91.
295. Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012 Apr 15;83(8):1084–103.
296. Koefler HP, Billing R, Lusic AJ, Sparkes R, Golde DW. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood*. 1980 Aug;56(2):265–73.
297. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027–34.
298. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887–95.
299. Sponaas A-M, Moharrami NN, Feyzi E, Standal T, Holth Rustad E, Waage A, et al. PDL1 Expression on Plasma and Dendritic Cells in Myeloma Bone Marrow Suggests Benefit of Targeted anti PD1-PDL1 Therapy. Waisman A, editor. *PLoS One*. 2015 Oct 7;10(10):e0139867.
300. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765–72.
301. Malek E, de Lima M, Letterio JJ, Kim B-G, Finke JH, Driscoll JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells: The green light for myeloma immune escape. *Blood Rev*. 2016 Sep;30(5):341–8.
302. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
303. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1803–13.
304. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2521–32.
305. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Preliminary Results of a Phase I Study of Nivolumab (BMS-936558) in Patients with Relapsed or Refractory Lymphoid Malignancies. *Blood*. 2014;124(21).
306. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 2016 Aug 10;34(23):2698–704.
307. Wilson L, Cohen AD, Weiss BM, Vogl DT, Garfall AL, Capozzi DL, et al. Pembrolizumab in Combination with Pomalidomide and Dexamethasone (PEMBRO/POM/DEX) for

- Pomalidomide Exposed Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2016;128(22).
308. Badros A, Hyjek E, Ma N, Lesokhin A, Dogan A, Rapoport AP, et al. Pembrolizumab, pomalidomide, and low-dose dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017 Sep 7;130(10):1189–97.
309. Mateos M-V, Blacklock H, Schjesvold F, Oriol A, Simpson D, George A, et al. Pembrolizumab plus pomalidomide and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (KEYNOTE-183): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2019;
310. Usmani SZ, Schjesvold F, Oriol A, Karlin L, Cavo M, Rifkin RM, et al. Pembrolizumab plus lenalidomide and dexamethasone for patients with treatment-naive multiple myeloma (KEYNOTE-185): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2019 Jul 18;
311. Chow EJ, Cushing-Haugen KL, Cheng G-S, Boeckh M, Khera N, Lee SJ, et al. Morbidity and Mortality Differences Between Hematopoietic Cell Transplantation Survivors and Other Cancer Survivors. *J Clin Oncol*. 2016;35:306–13.
312. Acosta-Maldonado BL, Vásquez Diaz JE, Barranco GI, Valero-Saldaña LM, Rivas-Vera S. Relapsed Acute Leukemia after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*. 2015;126(23).
313. Rautenberg C, Germing U, Haas R, Kobbe G, Schroeder T. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(1):228.
314. Kumar P, Joseph N, Almaula D, Boise LH, Kaufman JL, Gleason C, et al. Patterns of Relapse Among Myeloma Patients Post-Autologous Stem Cell Transplant. *Blood*. 2016;128(22):4524.
315. Kumar SK, Dispenzieri A, Fraser R, Mingwei F, Akpek G, Cornell R, et al. Early relapse after autologous hematopoietic cell transplantation remains a poor prognostic factor in multiple myeloma but outcomes have improved over time. *Leukemia*. 2018;32(4):986–95.
316. Moreau P, Hulin C, Macro M, Caillot D, Chateix C, Roussel M, et al. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood*. 2016 May 26;127(21):2569–74.
317. Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, Rajkumar SV, Epstein J, Kahanic SP, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Feb 4;389(10068):519–27.
318. Suen H, Brown R, Yang S, Ho PJ, Gibson J, Joshua D. The failure of immune checkpoint blockade in multiple myeloma with PD-1 inhibitors in a phase 1 study. *Leukemia*. 2015 Jul 19;29(7):1621–2.
319. Gillet J-P, Efferth T, Steinbach D, Hamels J, de Longueville F, Bertholet V, et al. Microarray-based Detection of Multidrug Resistance in Human Tumor Cells by Expression Profiling of ATP-binding Cassette Transporter Genes. *Cancer Res*. 2004 Dec 15;64(24):8987–93.

320. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007 Apr 4;39(4):457–66.
321. Reddington JP, Pennings S, Meehan RR. Non-canonical functions of the DNA methylome in gene regulation. *Biochem J.* 2013 Apr 1;451(1):13–23.
322. Greve B, Beller C, Cassens U, Sibrowski W, Göhde W. The Impact of Erythrocyte Lysing Procedures on the Recovery of Hematopoietic Progenitor Cells in Flow Cytometric Analysis. *Stem Cells.* 2006 Mar;24(3):793–9.
323. Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Front Physiol.* 2017;8:1076.
324. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood.* 2010 Mar 11;115(10):1976–84.
325. Sarry J-E, Murphy K, Perry R, Sanchez P V., Secreto A, Keefer C, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *J Clin Invest.* 2011 Jan 4;121(1):384–95.
326. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature.* 2016 Dec 7;540(7633):433–7.
327. Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 2017 Jul;7(7):716–35.
328. Schuurhuis GJ, Meel MH, Wouters F, Min LA, Terwijn M, De Jonge NA, et al. Normal hematopoietic stem cells within the AML bone marrow have a distinct and higher ALDH activity level than co-existing leukemic stem cells. Pant AB, editor. *PLoS One.* 2013 Nov 11;8(11):e78897.
329. Harada Y, Nagata Y, Kihara R, Ishikawa Y, Asou N, Ohtake S, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leuk Res.* 2018 Mar;66:20–7.
330. Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematology.* 2016 Dec 1;2016(1):356–65.
331. Kuang Y, Miki K, Parr CJC, Hayashi K, Takei I, Li J, et al. Efficient, Selective Removal of Human Pluripotent Stem Cells via Ecto-Alkaline Phosphatase-Mediated Aggregation of Synthetic Peptides. *Cell Chem Biol.* 2017 Jun 22;24(6):685–94.
332. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-).* 2011 Mar 25;331(6024):1565–70.
333. Brayer JB, Pinilla-Ibarz J. Developing strategies in the immunotherapy of leukemias. *Cancer Control.* 2013 Jan;20(1):49–59.
334. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after

- stimulation with IFN- and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):296–304.
335. Paiva B, Azpilikueta A, Puig N, Ocio EM, Sharma R, Oyajobi BO, et al. PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015 Oct 17;29(10):2110–3.
336. Gorgun G, Samur MK, Cowens KB, Paula S, Bianchi G, Anderson JE, et al. Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade-Induced Immune Response in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015 Oct 15;21(20):4607–18.
337. Efebera YA, Rosko AE, Hofmeister C, Benner J, Bakan C, Stamper K, et al. First Interim Results of a Phase I/II Study of Lenalidomide in Combination with Anti-PD-1 Monoclonal Antibody MDV9300 (CT-011) in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2015;126(23).
338. Wang Q, Wu X. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *Int Immunopharmacol*. 2017 May;46:210–9.
339. Rossi M, Botta C, Correale P, Tassone P, Tagliaferri P. Immunologic microenvironment and personalized treatment in multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther*. 2013 Jun 22;13(sup1):S83–93.
340. Gowrishankar K, Gunatilake D, Gallagher SJ, Tiffen J, Rizos H, Hersey P. Inducible but Not Constitutive Expression of PD-L1 in Human Melanoma Cells Is Dependent on Activation of NF- κ B. Cheriya V, editor. *PLoS One*. 2015 Apr 6;10(4):e0123410.
341. Xue J, Chen C, Qi M, Huang Y, Wang L, Gao Y, et al. Type I γ phosphatidylinositol phosphate kinase regulates PD-L1 expression by activating NF- κ B. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):42414–27.
342. Lu C, Redd PS, Lee JR, Savage N, Liu K. The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1247135.
343. Tan S, Liu K, Chai Y, Zhang CW-H, Gao S, Gao GF, et al. Distinct PD-L1 binding characteristics of therapeutic monoclonal antibody durvalumab. *Protein Cell*. 2018 Jan 9;9(1):135–9.
344. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug;256(5517):495–7.

ANEXO

1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ASOCIADOS A LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL

1. **Rico LG**, Juncà J, Ward MD, Bradford J, Petriz J. Flow Cytometric Significance of Cellular Alkaline Phosphatase Activity in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA Oncology*. 2019; [en revisión]
2. **Rico LG**, Juncà J, Ward MD, Bradford J, Petriz J. Is alkaline phosphatase the smoking gun for highly refractory primitive leukemic cells? *Oncotarget*. 2016;7(44):72057–66.

2. OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EN LA ETAPA DE LA TESIS DOCTORAL

1. **Rico LG**, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, Bardina J, Petriz J. Acoustophoretic Orientation of Red Blood Cells for Diagnosis of Red Cell Health and Pathology. *Sci Rep*. 2018;8(1):15705.
2. **Rico LG**, Juncà J, Ward MD, Bradford J, Petriz J. Yellow–green laser-based flow cytometry for CD34+ progenitor cell counting. *Cytom Part A*. 2018;93(2):172–6.
3. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017;47(10).
4. Núñez-Espinosa C, García-Godoy MD, Ferreira I, Ríos-Kristjánsson JG, Rizo-Roca D, **Rico LG**, et al. Vybrant DyeCycle Violet stain discriminates two different subsets of CD34+ cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(1):66–71.

3. COMUNICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES DE LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL

Del Trabajo I

- Título:** Alkaline phosphatase activity as a potential predictor of relapse and refractoriness in Acute Myeloid Leukemia (AML)
Autores: Rico LG, Juncà J, Bardina J, Bistué-Rovira A, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster (con sesión *Poster Walk*)
Congreso: ESCCA 2018 Conference – Annual Conference of the European Society for Clinical Cell Analysis. Valencia, 13 - 15 setiembre 2018
- Título:** Prospective cytometric study evaluating the alkaline phosphatase activity as a potential functional biomarker of primitive malignant cells in acute leukemia
Autores: Rico LG, Juncà J, Bardina J, Bistué-Rovira A, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster
Congreso: CYTO 2018 – 33rd Congress of the International Society for Advancement in Cytometry. Prague, 28 abril - 2 mayo 2018
- Título:** Detection of endogenous alkaline phosphatase activity in intact leukemic cells
Autores: Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster
Congreso: ESCCA 2017 Conference – Annual Conference of the European Society for Clinical Cell Analysis. Thessaloniki, 24 - 27 setiembre 2017
- Título:** Detection of endogenous alkaline phosphatase activity in intact leukemic cells
Autores: Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster
Congreso: CYTO 2017 – 32nd Congress of the International Society for Advancement in Cytometry. Boston, 10 - 14 setiembre 2017

- Título:** Detection of endogenous alkaline phosphatase activity in intact leukemic cells
Autores: Rico LG, Juncà J, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster
Congreso: XV Congress of the Iberian Society of Cytometry. Lisboa, 25 - 27 mayo 2017

Del Trabajo II

- Título:** Functional flow cytometry to predict PD-L1 conformational change and improve cancer immunotherapy
Autores: Rico LG, Juncà J, Bardina J, Bistué-Rovira A, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster
Congreso: CYTO 2019 - 34th Congress of the International Society for Advancement in Cytometry. Vancouver, 22 - 26 junio 2019
- Título:** Induced PD-L1 conformational change as a key event to discover effective targeted-therapies against Myeloid-Derived Suppressor Cells in Multiple Myeloma
Autores: Rico LG, Juncà J, Bardina J, Bistué-Rovira A, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster
Congreso: ESCCA 2018 Conference – Annual Conference of the European Society for Clinical Cell Analysis. Valencia, 13 - 15 setiembre 2018
- Título:** Differential Expression of PD-L1 on Myeloid-Derived Suppressor Cells as a potential screening approach for cancer immunotherapy in Multiple Myeloma
Autores: Rico LG, Juncà J, Bardina J, Bistué-Rovira A, Ward MD, Bradford JA, Petriz J
Tipo de comunicación: Póster
Congreso: CYTO 2018 – 33rd Congress of the International Society for Advancement in Cytometry. Prague, 28 abril - 2 mayo 2018

De los Trabajos I y II

1. **Título:** Role of Functional Cytomics in Cancer Immunotherapy and Leukemia Research

Autores: Rico LG, Juncà J, Bardina J, Bistué-Rovira A, Ward MD, Bradford JA, Petriz J

Tipo de comunicación: Comunicación oral – Premio a la mejor comunicación oral

Congreso: XVI Congress of the Iberian Society of Cytometry. Salamanca, 9 - 11 mayo 2019