

TÍTULO: Profundizando en la patogenia de las citopenias post-CAR-T: presencia de clones HPN como reflejo de fallo medular

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Elena Alejo Alonso

RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto): (ajustarse al espacio disponible)

La terapia CAR-T (células T con receptor de antígeno quimérico) ha revolucionado el tratamiento de las neoplasias hematológicas y se está extendiendo a otras patologías, incluidas las enfermedades de base inmunológica. Las citopenias post-CAR-T son una de las complicaciones más frecuentes y graves a medio y largo plazo, con un importante riesgo de infecciones y sangrado y, por tanto, un aumento de la morbimortalidad. Aunque las citopenias precoces se relacionan con la quimioterapia linfodepletiva, la fisiopatología de las citopenias prolongadas sigue sin estar bien establecida, por lo que su manejo constituye un reto. Entre los factores implicados descritos hasta el momento se encuentran la reserva hematopoyética, la hematopoyesis clonal, la inflamación sistémica y el fallo medular inmunomediado.

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno clonal adquirido caracterizado por mutaciones en el gen *PIGA*. Además, se ha observado su presencia en baja proporción en otras entidades caracterizadas por fallo medular, como la anemia aplásica. En estos casos, las células con fenotipo HPN parecen escapar del ataque inmunitario, y su presencia se ha asociado con mejor respuesta al tratamiento inmunosupresor. En el contexto de la terapia CAR-T, se ha reportado la aparición de clones HPN en un alto porcentaje de pacientes, lo que sugiere un posible vínculo inmunológico en la patogenia de las citopenias prolongadas.

El presente proyecto tiene como objetivo estudiar la aparición de clones con fenotipo HPN en pacientes que desarrollan citopenias prolongadas tras la terapia CAR-T, como reflejo del fallo medular. Para ello, se llevará a cabo un estudio prospectivo para la detección y cuantificación de clones HPN mediante citometría de flujo (CMF) de alta sensibilidad en dichos pacientes. Este estudio pretende aportar nuevo conocimiento sobre la etiopatogenia de las citopenias post-CAR-T, cuya fisiopatología es aún poco comprendida. Además, considerando que los pacientes con fallo medular y presencia de clones HPN responden mejor al tratamiento inmunosupresor, la identificación de clones HPN podría abrir nuevas opciones terapéuticas que permitan reducir complicaciones, mejorar el manejo clínico y aumentar la supervivencia de estos pacientes.



ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA (Citar las referencias incluidas en el apartado siguiente) (Máximo 3 páginas)

La terapia CAR-T ha supuesto un cambio de paradigma en el tratamiento de las neoplasias hematológicas, principalmente el linfoma B difuso de célula grande, la leucemia aguda linfoblástica B y el mieloma múltiple¹⁻³. Adicionalmente, se están desarrollando, ya en fases de ensayo clínico, células CAR contra otras dianas para el tratamiento de otras neoplasias, tanto hematológicas como no hematológicas, e incluso también en enfermedades no tumorales de base inmunológica.

Uno de los principales desafíos de la terapia CAR-T es el manejo de sus toxicidades, entre las que se incluyen el síndrome de liberación de citocinas (CRS), la neurotoxicidad asociada a células inmunoefectoras (ICANS), el síndrome de activación macrófagica (MAS) y, especialmente, la toxicidad hematológica manifestada en forma de citopenias post-CAR-T⁴. Mientras que el CRS o el ICANS son complicaciones precoces tras la administración del tratamiento, las citopenias post-CAR-T constituyen la complicación más frecuente a medio y largo plazo, con una incidencia acumulada a un año de hasta el 50-60%⁵. Se trata de una complicación con una morbimortalidad importante, que sumada a la hipogammaglobulinemia y la aplasia de células B, producen un incremento notable del riesgo infeccioso⁶. A pesar de que la neutropenia y las infecciones son el problema fundamental, la trombopenia grave y el riesgo de sangrado junto con la anemia, completan el espectro de efectos de adversos que contribuyen a un aumento de la morbimortalidad en estos pacientes⁷.

Las citopenias post-CAR-T se caracterizan típicamente por un curso temporal bifásico⁸. Aunque las citopenias precoces se asocian principalmente a la quimioterapia linfodepletiva previa a la infusión, la persistencia posterior de las citopenias tiene un origen multifactorial cuyos mecanismos fisiopatológicos son en gran parte desconocidos. Es poco probable que las citopenias tardías guarden relación con la linfodeplección, por lo que, ante su aparición, deben descartarse otras causas potenciales, como recaídas, aparición de neoplasias mieloides secundarias al tratamiento o, infecciones. Sin embargo, en muchos pacientes las citopenias pueden tener un origen diferente, que pueden incluir alteraciones inmunológicas persistentes⁹ u otras causas, y en este sentido deben abrirse otras líneas de investigación para dilucidar los mecanismos que las producen.

Actualmente se acepta que la etiología de las citopenias tras la terapia CAR-T es compleja y multifactorial. Entre los factores implicados se encuentran la reducción de la reserva de células madre hematopoyéticas, condicionada por tratamientos quimioterápicos previos, el envejecimiento y la presencia de hematopoyesis clonal asociada a la edad (CHIP). Además, se ha sugerido que el entorno inflamatorio, tanto sistémico como medular, generado por la activación de las células CAR-T y la destrucción de células tumorales, además de la inflamación sistémica asociada al CRS y al ICANS, que causa un daño adicional sobre un micromedioambiente medular previamente afectado¹⁰, que podría afectar negativamente la regeneración hematopoyética. También el fallo de la médula ósea innumediado, ha sido descrito como otra de las posibles causas implicadas en las citopenias post CAR-T^{11,12}, que supondría un mecanismo fisiopatológico común con la aplasia medular.

Hasta el momento, el abordaje terapéutico de las citopenias post-CAR-T se ha centrado principalmente en el uso de factores estimulantes de la hematopoyesis, como la eritropoyetina, el G-CSF o los agentes trombopoyéticos. En determinados casos, también se ha recurrido a la reinfusión de células CD34+ autólogas (i.e., “boost” de CD34+), en aquellos pacientes que tenían células autólogas criopreservadas. En pacientes con citopenias muy graves y persistentes, se ha considerado incluso el trasplante hematopoyético alogénico como opción terapéutica⁵. Por tanto, se trata de un problema para el que hay una necesidad no resuelta en la actualidad.

La HPN es una enfermedad hematológica adquirida que se origina por mutaciones somáticas en el gen *PIGA*, el cual participa en la síntesis del anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), esencial para fijar ciertas proteínas a la membrana celular¹³. La pérdida de estas proteínas da lugar a células deficientes en GPI, que fueron identificadas por primera vez en pacientes con HPN. Sin embargo, también se ha observado la presencia de células con fenotipo HPN (es decir, con reducción o ausencia de proteínas ancladas a GPI) en baja proporción en otras patologías caracterizadas por fallo medular, como la anemia aplásica adquirida (AA) o los síndromes mielodisplásicos (SMD) de bajo riesgo^{14,15}.

Se pueden identificar clones HPN minoritarios en más del 60% de los pacientes con AA¹⁵. Se considera que, en este contexto, las células HPN logran escapar del ataque inmunitario dirigido contra las células progenitoras hematopoyéticas, lo que les confiere una ventaja proliferativa y de supervivencia frente a las células normales, favoreciendo así la presencia de estos clones¹⁶. En este sentido, se ha demostrado que la presencia de clones HPN en AA puede predecir una buena respuesta a la terapia inmunosupresora y más altas tasas de supervivencia^{17,18}.

El método de elección para el diagnóstico de la HPN es la CMF. En cuanto a su sensibilidad, estudios recientes han demostrado que la CMF de alta resolución puede detectar con precisión poblaciones menores clínicamente relevantes de células con fenotipo HPN, alcanzando niveles de sensibilidad entre 10^{-5} y 10^{-6} ^{19,20}.

En el contexto de la terapia CAR-T, se ha comunicado^{21,22} que células con fenotipo HPN pueden ser detectadas con frecuencia en la sangre periférica semanas después de la infusión de las células CAR-T, lo que podría estar en relación con un mecanismo inmunológico distinto al síndrome de liberación de citocinas en la patogénesis de la citopenia tardía post-CAR-T. Así, un trabajo reciente con 41 pacientes tratados con terapia CAR-T ha demostrado la presencia de poblaciones minoritarias de granulocitos HPN en un 83% de pacientes²².

Con estos antecedentes, consideramos de relevante importancia analizar la presencia de clones HPN en pacientes con citopenias tras la terapia CAR-T, con el objetivo de profundizar en los mecanismos fisiopatológicos implicados, lo que podría en el futuro servir de base para explorar posibles estrategias terapéuticas, incluyendo la terapia inmunosupresora.



BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE (Máximo 1 página)

1. Bishop MR, Dickinson M, Purtill D, et al. Second-Line Tisagenlecleucel or Standard Care in Aggressive B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;386(7):629-639. doi:10.1056/nejmoa2116596
2. Kansagra AJ, Frey NV, Bar M, et al. Clinical utilization of Chimeric Antigen Receptor T-cells (CAR-T) in B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)—an expert opinion from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the American Society for Blood and Marrow Transplantation (ASBMT). *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(11):1868-1880. doi:10.1038/s41409-019-0451-2
3. San-Miguel J, Dhakal B, Yong K, et al. Cilta-cel or Standard Care in Lenalidomide-Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2023;389(4):335-347. doi:10.1056/nejmoa2303379
4. Rejeski K, Subklewe M, Aljurf M, et al. Immune effector cell-associated hematotoxicity: EHA/EBMT consensus grading and best practice recommendations. Published online September 7, 2023. doi:10.5167/UZH-239032
5. Jain T, Olson TS, Locke FL. How I Treat Cytopenias after CAR T-cell Therapy. *Blood*. Published online February 17, 2023. doi:10.1182/blood.2022017415
6. Rejeski K, Perez A, Iacoboni G, et al. The CAR-HEMATOTOX risk-stratifies patients for severe infections and disease progression after CD19 CAR-T in R/R LBCL. *J Immunother Cancer*. 2022;10(5):e004475. doi:10.1136/jitc-2021-004475
7. Nagle SJ, Murphree C, Raess PW, et al. Prolonged hematologic toxicity following treatment with chimeric antigen receptor T cells in patients with hematologic malignancies. *American J Hematol*. 2021;96(4):455-461. doi:10.1002/ajh.26113
8. Fried S, Avigdor A, Bielorai B, et al. Early and late hematologic toxicity following CD19 CAR-T cells. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(10):1643-1650. doi:10.1038/s41409-019-0487-3
9. Nahas GR, Komanduri KV, Pereira D, et al. Incidence and risk factors associated with a syndrome of persistent cytopenias after CAR-T cell therapy (PCTT). *Leukemia & Lymphoma*. 2020;61(4):940-943. doi:10.1080/10428194.2019.1697814
10. Cordeiro A, Bezerra ED, Hirayama AV, et al. Late Events after Treatment with CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2020;26(1):26-33. doi:10.1016/j.bbmt.2019.08.003
11. Rejeski K, Jain MD, Shah NN, Perales MA, Subklewe M. Immune effector cell-associated haematotoxicity after CAR T-cell therapy: from mechanism to management. *The Lancet Haematology*. 2024;11(6):e459-e470. doi:10.1016/s2352-3026(24)00077-2
12. Palacios-Berraquero ML, Rodriguez-Marquez P, Calleja-Cervantes ME, et al. Molecular mechanisms promoting long-term cytopenia after BCMA CAR-T therapy in multiple myeloma. *Blood Advances*. 2024;8(21):5479-5492. doi:10.1182/bloodadvances.2023012522
13. Hill A, DeZern AE, Kinoshita T, Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3(1). doi:10.1038/nrdp.2017.28
14. Shah YB, Priore SF, Li Y, et al. The predictive value of PNH clones, 6p CN-LOH, and clonal TCR gene rearrangement for aplastic anemia diagnosis. *Blood Advances*. 2021;5(16):3216-3226. doi:10.1182/bloodadvances.2021004201
15. Fattizzo B, Ireland R, Dunlop A, et al. Clinical and prognostic significance of small paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia. *Leukemia*. 2021;35(11):3223-3231. doi:10.1038/s41375-021-01190-9
16. Babushok DV. When does a PNH clone have clinical significance? *Hematology*. 2021;2021(1):143-152. doi:10.1182/hematology.2021000245
17. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*. 2006;107(4):1308-1314. doi:10.1182/blood-2005-06-2485
18. Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol*. 2014;164(4):546-554. doi:10.1111/bjh.12661
19. Richards SJ, Whitby L, Cullen MJ, et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry Part B Clinical*. 2009;76B(1):47-55. doi:10.1002/cyto.b.20438
20. Hosokawa K, Ishiyama K, Ikemoto T, et al. The clinical significance of PNH-phenotype cells accounting for < 0.01% of total granulocytes detected by the Clinical and Laboratory Standards Institute methods in patients with bone marrow failure. *Ann Hematol*. 2021;100(8):1975-1982. doi:10.1007/s00277-020-04314-w
21. Yoshihara K, Matsuda I, Utsunomiya N, et al. High Prevalence of PNH-phenotype Cells in Patients Who Received CD19-targeted CAR T-cell Therapy. *HemaSphere*. 2021;5(9):e628. doi:10.1097/hs9.0000000000000628
22. Yuki Nukii, Hosokawa K, Yoshida A. Immune-driven selection and frequent detection of PHN clones in post-CAR-T therapy hematopoietic failure. In: Milan; 2025.



HIPÓTESIS (Ajustarse al espacio disponible)

La presencia de clones HPN en pacientes que presentan citopenias prolongadas tras la terapia con células CAR-T podría explicarse por un fallo medular de base inmunológica. Considerando que en patologías como la AA o SMD de bajo riesgo los clones HPN minoritarios son frecuentes y se asocian con un escape inmunológico y una mejor respuesta a la terapia inmunosupresora, es plausible pensar que un fenómeno similar pueda estar ocurriendo en el contexto de las citopenias post-CAR-T. Por tanto, planteamos que la detección de estos clones mediante CMF de alta resolución podría contribuir a avanzar en la comprensión de los mecanismos implicados subyacentes de las citopenias prolongadas, abriendo así la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas para estos pacientes.

OBJETIVOS (ajustarse al espacio disponible)

El **objetivo general** del presente proyecto de investigación es evaluar la presencia de clones con fenotipo HPN en pacientes con citopenias persistentes tras la terapia con células CAR-T como reflejo de fallo medular post-CAR-T.

Los **objetivos específicos** son, por lo tanto:

- 1) Investigar la frecuencia de detección de clones HPN en pacientes que reciben tratamiento con células CAR-T.
- 2) Determinar el tamaño del clon HPN y evaluar específicamente su presencia en las líneas de granulocitos, monocitos, eritrocitos y linfocitos.
- 3) Analizar la asociación entre la presencia de clones HPN y su tamaño, con parámetros clínicos como la aparición, duración y severidad de las citopenias, requerimientos transfusionales e incidencia de infecciones.
- 4) Explorar el posible valor pronóstico de los clones HPN en términos de respuesta a tratamientos y de supervivencia.



METODOLOGÍA (Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio) (Máximo 4 páginas)

Diseño y sujetos de estudio

El presente proyecto de investigación es un estudio prospectivo, en el que se va a analizar la presencia de clones HPN en los pacientes tratados con células CAR-T en el Hospital Universitario de Salamanca que desarrollen citopenias prolongadas tras dicha terapia, definida como granulocitos <1000/microL y/o plaquetas \leq 75,000/microL que aparecen a partir de la 2ª semana tras tratamiento CAR-T y tienen una duración mínima de 2 semanas.

Se incluirán en el estudio todos los pacientes que cumplan este criterio y hayan recibido tratamiento en el CAUSA, por lo que es esperable que de acuerdo con la frecuencia descrita en la literatura y confirmada en la experiencia de nuestro centro, se incluyan a lo largo de 1 año alrededor de 50 pacientes. Además, se incluirán como controles 10 pacientes que hayan recibido terapia CAR-T y no hayan desarrollado citopenias.

Tras la firma del consentimiento informado (CI) y su inclusión en el estudio, se obtendrán de forma secuencial muestras de sangre periférica, con un calendario programado de 5 muestras con intervalos de 3 semanas para cada paciente incluido en el estudio, que coincidirán con las visitas de revisión programadas. Los controles se analizarán en el día+100 de la terapia CAR-T, con una única muestra. Las consideraciones de perspectiva de género, éticas y de confidencialidad de los datos se encuentran detalladas en sus apartados correspondientes.

Metodología

Detección de clones HPN mediante CMF

1. Detección de granulocitos y monocitos con fenotipo HPN

Se extraerá sangre periférica (5 mL) en un tubo de EDTA. Con el objetivo de adquirir un suficiente número de células para alcanzar un nivel de sensibilidad entre 10^{-5} y 10^{-6} , se realizará una lisis bulk de 3ml de muestra. El botón celular obtenido se marcará con técnicas de inmunofluorescencia directa convencional, empleando la siguiente combinación de AcMo (anticuerpos monoclonales): FLAER-FITC (5 μ L), CD64-PE (10 μ L), CD33-PerCP (10 μ L), CD14-APC (5 μ L), CD24-APC-H7 (5 μ L), CD16-V450 (5 μ L) y CD45-OC515 (5 μ L).

Tras el marcaje de la muestra, se procederá a la adquisición en un citómetro de flujo FACS Canto II. Para alcanzar una mayor sensibilidad se adquirirá y analizará el total de la muestra.

2. Detección de hematíes con fenotipo HPN

Empleando la misma muestra, se marcarán 5 μ L de sangre total con técnicas de inmunofluorescencia directa convencional, sin lisis, con la siguiente combinación de AcMo: CD235a-FITC (5 μ L), CD59-PE (5 μ L) y CD45-OC515 (5 μ L).

A continuación, se procederá a la adquisición de la muestra en un citómetro FACS Canto II y se analizará un mínimo de 5000.000 de eventos para alcanzar una sensibilidad de 10^{-5} .



Análisis de clones HPN mediante CMF

El análisis de clones HPN se realizará empleando el programa Infinicyt® y se llevará a cabo siguiendo las recomendaciones y metodología estándar de nuestro centro, mediante la combinación de AcMo mencionada en el apartado previo. Se identificarán los distintos tipos celulares en base a la expresión de antígenos que no emplean para su anclaje a la membrana el GPI (granulocitos: CD45dim, CD33+, CD15+; monocitos: CD45+, CD64++, CD33++, y linfocitos CD45+ SSC bajo) y dentro de cada compartimento se analizará la presencia de clones HPN y, en caso de identificarse, se cuantificarán. Para identificar el clon HPN en granulocitos se seleccionarán las células deficientes en FLAER y con disminución o ausencia de expresión de CD16 y CD24. De forma similar, el clon HPN en monocitos estará constituido por células deficientes en FLAER y con expresión ausente de CD14, y en linfocitos células deficientes en FLAER. En la serie roja los hematíes se identificarán por la expresión de CD235a en ausencia de CD45 y el clon HPN se identificará por negatividad para el anticuerpo CD59, distinguiendo tres tipos de hematíes: tipo I (normales), tipo II (expresión parcial de CD59) y tipo III (deficiencia total de CD59).

Análisis de correlación del subtipo de clones HPN con la aparición, duración y severidad de las citopenias, la incidencia de infecciones, la respuesta al tratamiento y la supervivencia.

Variables, recogida y análisis de datos

Se recogerá información sobre el sexo, edad, fecha de diagnóstico, tipo de enfermedad hematológica, presencia de citopenias al momento del diagnóstico de la enfermedad, LDH, tratamientos utilizados en líneas previas, terapia puente, fecha de infusión de las células CAR-T, complicaciones precoces post-CAR-T, presencia de citopenias, serie afectada por las citopenias, duración de las citopenias, respuesta a la terapia CAR-T, infecciones, hemorragias, presencia de clon HPN en sangre periférica, línea celular en la que se detecta el clon HPN, porcentaje de células con clon HPN, fecha de último seguimiento, fecha de progresión post-CAR-T, fecha de fallecimiento y causa de muerte.

Para la identificación de características clínico-biológicas relacionadas con la presencia de un clon HPN se utilizarán el test Chi cuadrado y el test T de Student para las variables cualitativas y cuantitativas, respectivamente. Para determinar el grado de asociación (*odds ratio*) y su intervalo de confianza en las variables cualitativas se utilizará la regresión logística. Los análisis de supervivencia se realizarán mediante el test Kaplan-Meier y se utilizará el test log-rank para calcular su *hazard ratio* y el intervalo de confianza correspondiente. Además, para identificar factores independientes predictores de supervivencia se empleará la regresión de Cox.

El análisis estadístico de los datos se realizará en colaboración con la Unidad de Bioestadística del IBSAL, empleando paquetes estadísticos estándar (SPSS, R o Jamovi). Se considerarán estadísticamente significativos los valores de $P \leq 0,05$.



Limitaciones del estudio

Una de las potenciales limitaciones del estudio es la variabilidad en el momento de la posible aparición de los clones HPN, que podrían no ser detectados con el calendario planteado, y otra posible limitación sería la potencial dificultad para alcanzar la sensibilidad suficiente para detectar la presencia de clones HPN muy minoritarios en pacientes con citopenias graves. Para intentar solventar estas limitaciones se ha planteado un calendario amplio y la realización de estudios de citometría de flujo de alta sensibilidad.



PLAN DE TRABAJO (Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador, incluyendo los proyectos en los que participe cada uno de sus integrantes Indicar también el lugar de realización del proyecto) (Máximo 2 páginas)

El proyecto se desarrollará en la Unidad de Citometría de Flujo del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, en colaboración con el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

El Hospital Universitario de Salamanca es centro de referencia acreditado por el Ministerio de Sanidad para la administración de terapia CAR-T desde el inicio de la implantación de estos centros en España, y el Servicio de Hematología, un centro de referencia para pacientes neoplasias hematológicas que reciben esta terapia.

Como se indica en el siguiente apartado de descripción del equipo investigador, éste cuenta con una trayectoria de años de investigación y publicación conjuntas en el ámbito de desarrollo del proyecto de investigación, al que se han sumado investigadores jóvenes y otros investigadores con un perfil asistencial clave para la consecución del proyecto.

A continuación, se resumen las principales etapas, agrupadas de acuerdo a las personas responsables de las mismas, y las competencias de los investigadores responsables:

- **Selección de pacientes y recogida de datos clínicos/biológicos, muestras y CIs.** Esta tarea será llevada a cabo por la Dra. Ana África Martín (AAM), médico adjunto de la Unidad Clínica responsable de la coordinación y seguimiento de los pacientes que reciben terapia CAR-T en nuestro centro, la Dra. Cristina Teresa Fuentes (CTF), médico residente de Hematología y Hemoterapia de cuarto año en el Hospital Universitario de Salamanca, y la Dra. Belén Vidriales (BV), que se encargará de supervisar la inclusión de los pacientes en el estudio.
- **Procesamiento de las muestras.** Irene Aires (IA) y Cristina Casquero (CC), técnicos de la Unidad de CMF en nuestro centro, junto con Concepción Rodríguez Serrano (CRS), técnico responsable de la CMF y cultivos celulares de la Unidad de Terapia Celular en el Hospital Universitario de Salamanca, serán las responsables de llevar a cabo esta tarea.
- **Cuantificación y caracterización de la presencia de clones HPN mediante CMF.** Estos análisis serán realizados por el Dr. Juan Flores-Montero (JFM), investigador post doctoral en CMF con una amplia experiencia en el diagnóstico de neoplasias hematológicas, y la Dra. Elena Alejo (EA), médico adjunto de la Unidad de CMF, y estará supervisada por la Dra. BV, que es la responsable de la Unidad de CMF en el Hospital Universitario de Salamanca.
- **Correlación de la detección de clones HPN con parámetros clínico-biológicos.** Estos estudios serán llevados a cabo por los investigadores del equipo con más implicación clínica (AAM, CTF), con la colaboración de la IP del proyecto (EA).

Todos los investigadores colaborarán en el **análisis e interpretación de los resultados obtenidos**, en la **difusión científica** de los resultados del presente proyecto en congresos regionales, nacionales e internacionales y en la **elaboración de artículos** para su publicación en revistas de alto impacto.



EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR (Máximo 1 página)

El grupo de investigación está compuesto por 8 investigadores (incluyendo el IP):

La **Dra. Elena Alejo** es médico especialista en Hematología (2020-2024) y Doctora en Medicina por la Universidad de Salamanca con calificación Sobresaliente "Cum Laude" (2024). Su periodo de formación sanitaria especializada se centró en el área de Citometría de Flujo, con la realización del título propio "Diploma de especialización en citometría de flujo para el diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas e inmunodeficiencias primarias", de la Universidad de Salamanca (2023).

El **Dr. Juan Flores-Montero**, es Médico Cirujano graduado en Valencia (Venezuela), con título homologado por el de Licenciado en Medicina y Cirugía por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (2005). Es Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca con calificación Sobresaliente "Cum Laude", cuya tesis fue distinguida con el premio de la Fundación Dr. Moraza como mejor tesis defendida en dicho año en el campo del cáncer y su terapia. Actualmente es investigador contratado por el Centro de Investigación del Cáncer, desempeñando su actividad en el Laboratorio de Citometría del Hospital Universitario de Salamanca, con más de 20 años de experiencia en citometría de flujo.

La **Dra. Belén Vidriales** es especialista en Hematología (1988-1991) y Doctora en Medicina por la Universidad de Salamanca (1993) con Premio Extraordinario. Research Fellow (1994-1995) en el Dana Farber Cancer Institute (Harvard University, Boston, MA, USA). Actualmente es Jefe de Unidad en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca (desde 2017), con gran experiencia en citometría de flujo en hemopatías, siendo referente nacional en este campo. Además, es Profesora Asociada de la Universidad de Salamanca (desde 2018). Ha sido investigadora principal o colaborador en más de 50 proyectos de investigación financiados con fondos competitivos, y tiene experiencia como IP en más de 100 ensayos clínicos realizados en el CAUSA. Es co-autora de más de 100 publicaciones indexadas y gran experiencia como ponente y co-directora de 6 tesis doctorales. Es miembro del CIBER de Cáncer (CIBERONC), grupo "Biología molecular y celular de hemopatías" del IBSAL. y grupo EuroFlow Consortium. Por otro lado, es miembro del Comité Ético de Investigación con medicamentos de Salamanca (desde 2014), Comité de Bioética de la Investigación de la Universidad de Salamanca (desde 2014), Comisión de Docencia del Hospital Universitario de Salamanca (2011-2021) y de la Comisión de tumores (2020-2025).

La **Dra. Ana África Martín** es hematóloga, responsable tanto de la coordinación de los pacientes que reciben terapia CAR-T en nuestro centro como de aquellos que se encuentran hospitalizados. Su investigación se ha centrado en los aspectos clínicos de los pacientes que reciben terapia CAR-T por linfoma en nuestro centro.

Irene Aires Mejía y Cristina Casquero Hernández son Técnicos Superiores de Laboratorio de Análisis Clínicos, y desarrollan su trabajo de Técnico Especialista de Laboratorio en el Área de Citometría de Flujo del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Cuentan con una amplia experiencia en el laboratorio de citometría de flujo, donde colaboran activamente en un número importante de proyectos de investigación.

Concepción Rodríguez Serrano es Técnico Superior en Análisis y Control, y desarrolla trabajos de Técnico Especialista de Laboratorio en el Área de Terapia Celular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Cuenta con una experiencia de más de 10 años en cultivos celulares, citometría de flujo y estudios de inmunomodulación.

Finalmente, la **Dra. Cristina Teresa Fuentes** es médico residente de cuarto año en Hematología y Hemoterapia, que se encuentra actualmente rotando en la Unidad de Morfología y Citometría de Flujo del Servicio.



UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN RELACIÓN CON LA SALUD

(ajustarse al espacio disponible)

Gracias a su alta eficacia, la terapia con células CAR-T se está utilizando de forma creciente, y en fases cada vez más tempranas, en el tratamiento de las neoplasias hematológicas. Además, sus resultados alentadores en este campo han conducido a su empleo en otras patologías, como enfermedades autoinmunes y tumores sólidos. Dada la creciente utilización de esta terapia en la práctica clínica habitual resulta imprescindible conocer en profundidad sus principales efectos adversos. Entre las toxicidades más frecuentes y potencialmente más graves a medio y largo plazo en los pacientes que reciben tratamiento con células CAR-T se encuentra el desarrollo de citopenias prolongadas. La etiopatogenia de las citopenias post-CAR-T es compleja y aún no está claramente establecida, aunque se reconoce su naturaleza multifactorial. Diversos estudios han identificado el fallo medular inmunomediado como una de las posibles causas implicadas en el desarrollo de las citopenias tras la terapia CAR-T, presente en hasta, aproximadamente, un tercio de los pacientes.

En este contexto, la detección de clones HPN, previamente asociada a entidades de base inmunológica, como la AA, ha emergido como un posible marcador de disfunción medular inmunomediada y posible factor pronóstico. Aunque se ha documentado la presencia de clones HPN de pequeño tamaño en pacientes con fallo medular de origen inmune, actualmente existe escasa evidencia sobre su papel en el contexto específico de las citopenias post-CAR-T.

Por todo ello, evaluar la presencia de clones HPN como reflejo de un posible fallo medular inmunomediado podría aportar información clave para comprender los mecanismos fisiopatológicos implicados en las citopenias post-CAR-T e investigar nuevas herramientas terapéuticas en estos pacientes.

MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO (ajustarse al espacio disponible)

La actividad del presente proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio de Citometría de Flujo del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, que tiene una superficie de 60 m².

Esta Unidad cuenta con toda la infraestructura necesaria para llevar a cabo el proyecto, así como el personal necesario para la preparación de las muestras con las técnicas de inmunofenotipaje propuestas (citómetro de flujo FACS Canto II) y el resto de los equipos necesarios para el procesamiento de las muestras (microscopios ópticos, pipetas, centrífugas, agitadores). Además, para el análisis de las muestras procesadas cuenta con licencias del software Infinicyt®.

El traslado de las muestras se realizará dentro del circuito logístico establecido para la práctica clínica habitual, ya que la Unidad de CMF del Hospital Universitario de Salamanca es el laboratorio de referencia para la realización de estudios inmunofenotípicos en Castilla y León y, además, recibe muestras procedentes de todo el país ya que colabora en varios estudios de ámbito nacional.

Por último, además de los investigadores, los recursos humanos necesarios para el desarrollo de este proyecto son los técnicos de laboratorio de las Unidades de CMF y Terapia Celular, los hematólogos e investigadores post doctorales responsables de la CMF del servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, así como los hematólogos responsables de la unidad clínica y la atención directa de los pacientes.



JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LA AYUDA SOLICITADA (Máximo 2 páginas)

El presupuesto solicitado se destinará íntegramente a la adquisición de los AcMo necesarios para el procesamiento de las muestras mencionados en el apartado de Métodos.

Como se ha mencionado previamente, el traslado de las muestras se realizará dentro del circuito logístico establecido para la práctica clínica habitual, por lo que no generaría un sobre coste adicional.