



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Utilidad Pronóstica de Parámetros
Biológicos e Inmunológicos en Pacientes
con Gammapatías Monoclonales

D.^a María Adela Vasco Mogorrón
2022



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Utilidad Pronóstica de Parámetros
Biológicos e Inmunológicos en Pacientes
con Gammopatías Monoclonales

Autor: D.^a María Adela Vasco Mogorrón

Director/es: D. Alfredo Minguela Puras

Dña. Adela María Periago Peralta



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Maria Adela Vasco Mogorron

doctorando del Programa de Doctorado en

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INTEGRACIÓN Y MODULACIÓN DE SEÑALES EN
BIOMEDICINA**

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Utilidad pronostica de parametros biologicos e inmunologicos en pacientes con gammopatias monoclonalesoctoral

y dirigida por,

D./Dña. Dr. Alfredo Minguela Puras

D./Dña. Dra. Adela Maria Periago PerarIta

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 23 de M de 20 22

Fdo.:

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados

Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Agradecimientos

Mi gratitud a mis directores Dr. D. Alfredo Minguela y Dra. Dña. Adela Periago, facultativos especialistas en Inmunología y Hematología, respectivamente, y miembros del Grupo de Investigación en Inmunología e Intolerancia en Trasplantes y Enfermedades de base Inmunológica, del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), por su enorme esfuerzo y ayuda en la realización de las tres publicaciones y la confección de la memoria.

Expreso mi más sincero agradecimiento a todos los profesionales que con su trabajo diario han hecho posible esta tesis doctoral. A destacar: 1) los hematólogos de todos los hospitales de la región de Murcia al cargo de los pacientes con neoplasias de células plasmáticas, que han proporcionado los mejores cuidados y tratamientos en cada caso; 2) a los inmunólogos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) que han participado en la generación de los estudios biológicos objeto de análisis de esta tesis doctoral y que han permitido la correcta clasificación pronóstica de los pacientes; 3) a los técnicos especialistas de laboratorio de la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral del HCUVA, que han participado en la realización de los estudios de citometría y FISH.

Agradezco al Dr. Valentin Cabañas, hematólogo del HCUVA, su constante ayuda en la correcta interpretación de los resultados y orientación clínica y científica para la confección de las publicaciones.

También destacar la ilusión de mi familia de que presente esta tesis doctoral.

Producción científica

La producción científica obtenida hasta la fecha con los resultados recogidos en esta memoria de tesis y en otros trabajos realizados tanto previamente como en paralelo a este proyecto, ha sido:

PUBLICACIONES

1. “Predictive value of 1q21 gain in multiple myeloma is strongly dependent on concurrent cytogenetic abnormalities and first-line treatment”. **Minguela A, Vasco-Mogorrón MA**, Campillo JA, Cabañas V, Remigia MJ, Berenguer M, García-Garay MC, Blanquer M, Cava C, Galian JA, Gimeno L, Soto-Ramírez MF, Martínez-Hernández MD, de la Rubia J, Teruel AI, Muro M, **Periago A**. *Am J Cancer Res*. 2021 Sep 15;11(9):4438-4454.
2. “Blood-based risk stratification for pre-malignant and symptomatic plasma cell neoplasms to improve patient management”. **María A. Vasco-Mogorrón**, José A. Campillo, **Adela Periago**, Valentin Cabañas, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Lourdes Gimeno,, María F. Soto-Ramírez, María D. Martínez-Hernández, Manuel Muro, **Alfredo Minguela**. *Am J Cancer Res*. 2021 Jun 15;11(6):2736-2753.
3. “Proliferation to apoptosis tumor cell ratio as a biomarker to improve personalized therapies in premalignant and symptomatic plasma cell neo-

plasm's". **María A. Vasco-Mogorrón**, José A. Campillo, **Adela Periago**, Valentin Cabañas, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Lourdes Gimeno, María F. Soto-Ramírez, María D. Martínez-Hernández, Manuel Muro, **Alfredo Minguela**. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 9;22(8):3895. doi: 0.3390/ijms22083895.

COMUNICACIONES Y PONENCIAS INTERNACIONALES

1. "MRD methodology to detect circulating aberrant plasma cells provides improved risk stratification in multiple myeloma". **Alfredo Minguela**, José A. Campillo, **Adela Periago**, Valentin Cabañas-Perianes, Carmen García-Garay, Mercedes Berenguer, **Adela Vasco-Mogorrón**, Gema Gonzalez, Maria R. Moya-Quiles, Ana M. García-Alonso. 6° ESLHO symposium MRD and immuno-monitoring. 8-9 Noviembre 2017. Leiden, Países Bajos.
2. "Evaluation Of Circulating Aberrant Plasma Cells By Flow Cytometry At Diagnosis Provides Improved Risk Stratification In Multiple Myeloma". **María Adela Vasco-Mogorrón**, José Antonio Campillo Marquina, **Adela Periago** Peralta, Valentin Cabañas Perianes, Ma Del Carmen García Garay, Mercedes Berenguer Piqueras, Gema González Martínez, María Rosa Moya Quiles, Ana María García Alonso, **Alfredo Minguela Puras**. II Jornadas IMIB-Arrixaca. 10-Noviembre-2017. Murcia. <<http://www.jornadaii.imib.es/jornadaII/verPosters.jsf?p=37326>>.

COMUNICACIONES Y PONENCIAS NACIONALES

3. "Utilidad pronóstica a largo plazo de la cuantificación en sangre periférica de células plasmáticas de fenotipo aberrante en pacientes con desordenes de células plasmáticas". **Vasco-Mogorrón A**, **Periago A**, Campillo JA, Gimeno

- L, Mrowiec A, Martínez-Sánchez MV, Cabañas-Perianes V, García-Garay C, Berenguer M⁴, Martínez-Hernandez MD, Muro M, **Minguela A.** III Jornadas de Investigación IMIB-Arrixaca. Murcia. 9-20 Nov 2018. <<http://www.imib.es/jornadaII/verPosters.jsf?p=47227>>.
4. “Estratificación del riesgo en sangre para neoplasias premalignas y sintomáticas de células plasmáticas para mejorar el manejo del paciente”. **Periago A, Vasco-Mogorrón María A,** Campillo Jose Antonio, Cabañas Valentin, Berenguer Mercedes, García-Garay, María C, Gimeno, Lourdes, Soto-Ramirez Maria F, Martínez-Hernández María M, Muro Manuel, **Minguela Alfredo.** LXIII congreso nacional de la SEHH. Pamplona 14-16 Octubre 2021.
 5. “El ratio proliferación/apoptosis de células plasmáticas como biomarcador para mejorar el manejo clínico de las neoplasias de células plasmáticas”. María D. Martínez-Hernández, **María A. Vasco-Mogorrón,** José A. Campillo, **Adela Periago,** Valentin Cabañas, Mercedes Berenguer⁴, María C. García-Garay³, Lourdes Gimeno, María F. Soto-Ramírez, Manuel Muro y **Alfredo Minguela.** LXIII Congreso Nacional de la SEHH. Pamplona 14-16 Octubre 2021.
 6. “El valor predictivo de la ganancia de 1q21 en el mieloma múltiple depende de las anomalías citogenéticas concurrentes y del tratamiento de primera línea”. María D. Martínez-Hernández, **Adela Periago. María A. Vasco-Mogorrón,** José A. Campillo, Valentin Cabañas, María J. Remigia, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Miguel Blanquer, Catalina Cava, José Antonio Galian, Lourdes Gimeno, María F. Soto-Ramírez, Javier de la Rubia, Ana I. Teruel, Manuel Muro, **Alfredo Minguela.** LXIII congreso nacional de la SEHH. Pamplona 14-16 Octubre 2021.
 7. “Estratificación del riesgo en sangre para neoplasias premalignas y sintomáticas de células plasmáticas para mejorar el manejo del paciente”. **Periago A, Vasco-Mogorrón María A,** Campillo Jose Antonio, Cabañas Valentin, Berenguer Mercedes, García-Garay, María C, Gimeno, Lourdes, Soto-Ramirez Maria F, Martínez-Hernández María M, Muro Manuel, **Minguela Alfredo.**

- VI Jornadas científicas del IMIB. 16 Noviembre 2021. <<https://jornadavi.imib.es/jornadavi/verPosters.jsf?p=81044>>.
8. “El ratio proliferación/apoptosis de células plasmáticas como biomarcador para mejorar el manejo clínico de las neoplasias de células plasmáticas”. María D. Martínez-Hernández, **María A. Vasco-Mogorrón**, José A. Campillo, **Adela Periago**, Valentin Cabañas, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Lourdes Gimeno, María F. Soto-Ramírez, Manuel Muro y **Alfredo Minguela**. VI Jornadas científicas del IMIB. 16 Noviembre 2021. <<https://jornadavi.imib.es/jornadavi/verPosters.jsf?p=81043>>.
9. “El valor predictivo de la ganancia de 1q21 en el mieloma múltiple depende de las anomalías citogenéticas concurrentes y del tratamiento de primera línea”. María D. Martínez-Hernández, **Adela Periago**, **María A. Vasco-Mogorrón**, José A. Campillo, Valentin Cabañas, María J. Remigia, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Miguel Blanquer, Catalina Cava, José Antonio Galian, Lourdes Gimeno, María F. Soto-Ramírez, Javier de la Rubia, Ana I. Teruel, Manuel Muro, **Alfredo Minguela**. VI Jornadas científicas del IMIB. 16 Noviembre 2021. <<https://jornadavi.imib.es/jornadavi/verPosters.jsf?p=81042>>.

Índice

Resumen.....	13
1. Introducción.....	15
1.1. Neoplasias de células plasmáticas.....	15
1.1.1. Etiología.....	15
1.1.2. Epidemiología	15
1.1.3. Patogenia.....	16
1.1.4. Clasificación de las neoplasias de células plasmáticas.....	19
1.2. Diagnóstico de neoplasias de células plasmáticas	20
1.2.1. Evaluación clínica.....	20
1.2.2. Estudios de laboratorio.....	20
1.2.3. Estudios de imagen	21
1.2.4. Estudio de citometría de flujo en médula ósea	22
1.2.4.1. Estudios de inmunofenotipo y enfermedad mínima residual en médula ósea	22
1.2.4.2. Detección de células plasmáticas aberrantes en sangre periférica	25
1.2.4.3. Índice de proliferación y apoptosis y contenido de ADN de la célula plasmática.....	27
1.2.5. Estudios de citogenética en las neoplasias de células plasmáticas	29
1.3. Neoplasias de células plasmáticas asintomáticas	32
1.3.1. Gammapatía monoclonal de significado incierto	32

1.4. Mieloma múltiple sintomático	34
1.4.1. Criterios diagnósticos de mieloma sintomático.....	34
1.4.2. Manifestaciones clínicas	35
1.4.3. Datos de laboratorio.....	36
1.4.4. Factores pronóstico en el mieloma múltiple.....	37
1.5. Tratamiento del mieloma múltiple	40
1.5.1. Pacientes de nuevo diagnóstico candidatos a trasplante..	41
1.5.2. Pacientes de nuevo diagnóstico no candidatos a trasplante	42
1.5.3. Tratamiento de pacientes con mieloma múltiple en recaída	43
1.5.3.1. Pacientes que han recibido una línea de tratamiento previa.....	43
1.5.3.2. Pacientes que han recibido dos o más líneas de tratamiento. Tratamiento de segunda recaída y posteriores.....	44
1.6. Inmunovigilancia en cáncer.....	45
1.6.1. Respuesta inmunitaria innata y sus componentes	45
1.6.2. Respuesta inmunitaria específica o adaptativa.....	47
1.6.3. Inmunoterapia en el mieloma múltiple.....	49
2. Objetivos y conclusiones.....	53
2.1. Objetivos	53
2.2. Conclusiones.....	54
2.2.1. Artículo 1.....	54
2.2.2. Artículo 2.....	54
2.2.3. Artículo 3.....	55
3. Artículos publicados y enviados	57
Blood-based risk stratification for pre-malignant and symptomatic plasma cell neoplasms to improve patient management	59

Proliferation to Apoptosis Tumor Cell Ratio as a Biomarker to Improve Clinical Management of Pre-Malignant and Symptomatic Plasma Cell Neoplasms	77
Predictive value of 1q21 gain in multiple myeloma is strongly dependent on concurrent cytogenetic abnormalities and first-line treatment	93
Bibliografía	113

Resumen

El presente trabajo de tesis se orienta al estudio de pacientes con neoplasias de células plasmáticas en los que se objetiva en suero una inmunoglobulina monoclonal o fragmento de esta, generada por la proliferación descontrolada de células plasmáticas de origen clonal. En el estudio, se han correlacionado parámetros obtenidos mediante citometría de flujo (inmunofenotipo e índices de proliferación y apoptosis celular) e hibridación in situ fluorescente (alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales) con la evolución clínica (supervivencia libre de progresión y global) de pacientes con grado creciente de malignidad, gammapatías monoclonales de significado incierto, mieloma quiescente y mieloma múltiple, para valorar su utilidad diagnóstica y pronóstica, así como la capacidad de predecir la respuesta a tratamientos actuales de estas patologías.

Los resultados han sido difundidos en 3 publicaciones recogidas en revistas científicas indexadas, en ellos se describe como:

La detección y cuantificación mediante citometría de flujo de células plasmáticas de fenotipo aberrante en sangre periférica, es un método rápido, barato y accesible que, con independencia del tratamiento que reciban los pacientes, permite estimar desde el diagnóstico el riesgo de progresión de la enfermedad y de muerte del paciente utilizando exclusivamente parámetros de sangre periférica. Además, complementa el valor pronóstico de la estimación de riesgo que se aplica de manera estándar en la actualidad y que utiliza parámetros evaluados en médula ósea.

La cuantificación mediante citometría de flujo de las tasas de proliferación y apoptosis de las células plasmáticas de médula ósea en pacientes con neoplasias de células plasmáticas, permite estimar desde el diagnóstico el riesgo de progresión o muerte y complementar el valor pronóstico de la estimación de riesgo que se aplica de manera estándar en la actualidad. Además, contribuye a la personalización de la terapia pues los pacientes con ratio proliferación/apoptosis elevado, sólo responden adecuadamente a tratamientos que asocien inhibidores del proteasoma e inmunomoduladores a trasplante de médula ósea autólogo en tandem.

La determinación mediante FISH de las anomalías numéricas o estructurales del cromosoma-1 en células plasmáticas purificadas de médula ósea de pacientes con neoplasias de células plasmáticas, tiene un elevado valor pronóstico desde el diagnóstico. Sin embargo, la ganancia de 1q, por si sola, no añade valor pronóstico a la estimación de riesgo que se utiliza en la actualidad, y es necesario tener en cuenta la concurrencia de otras alteraciones cromosómicas y el tipo de tratamiento que recibirá el paciente para la correcta valoración de esta anomalía.

1. Introducción

1.1. NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

1.1.1. ETIOLOGÍA

Se denomina neoplasia de célula plasmática o gammapatía monoclonal a un conjunto de enfermedades donde existe un clon de células plasmáticas situado generalmente en la médula ósea que dan origen a inmunoglobulinas de carácter monoclonal, también llamado componente monoclonal o paraproteína, cuya presencia se puede poner de manifiesto en la sangre u orina. El componente monoclonal también puede estar formado exclusivamente por una cadena ligera libre (CLL) κ o λ (Kumar *et al.*, 2009). El 2% de estas patologías son no secretoras (Chawla *et al.*, 2015).

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La neoplasia de células plasmáticas más frecuente es la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS, del inglés *monoclonal gammopathy of undetermined significance*), con una prevalencia del 3,2% en la población general mayor de 50 años y que aumenta con la edad. Aunque el pronóstico de esta patología es generalmente benigno, hay que tener en cuenta que aproximadamente un 1% por año progresan a estadios mayores, como el mieloma quiescen-

te (SMM, del inglés *smoldering myeloma*) o el mieloma múltiple (MM) por lo que es necesario disponer de biomarcadores pronósticos en MGUS que faciliten el correcto asesoramiento, atención clínica y seguimiento de estos pacientes Kyle *et al.*, 2018).

El MM representa el 1% del conjunto de todas las neoplasias y el 10% de las neoplasias hematológicas (Rajkumar *et al.*, 2014; Pinto *et al.* 2020). Es una neoplasia heterogénea desde la perspectiva molecular y clínica (Rajkumar *et al.*, 2014). Presenta una frecuencia levemente superior en el sexo masculino (54%) (Charlot-Lambrecht *et al.*, 2012) y en afroamericanos (5.8%) con respecto caucásicos (3.2%) (Landgren *et al.*, 2009) (Fillmore *et al.*, 2019). Además, presenta agregación familiar, existiendo un riesgo dos o tres veces superior en miembros de la familia de los afectados, si se compara con la población general. La edad media del diagnóstico oscila entre los 65 y 70 años siendo sólo un 15% y un 2% los enfermos menores de 50 y 30 años, respectivamente (Bladé *et al.*, 2019).

Globalmente, la incidencia de MM varía y es mayor en países más desarrollados. Por ejemplo, Suecia presenta 4,8 casos nuevos por 100.000 personas/año (Turesson *et al.*, 2010) y menor en países asiáticos como Taiwan con 0.75/100.000 (Huang *et al.*, 2007). Estas diferencias se podrían deber a factores ambientales y genéticos. En nuestro país, la Red Española de Registros de Cáncer de 2020 (REDECAN) calcula para esta patología una tasa de incidencia de 3 para hombres y 2 para mujeres por 100.000 habitantes/año. En España hay alrededor de 12.000 pacientes con MM y se diagnostican cada año 2.000 casos nuevos (Comunidad Española de Pacientes con Mieloma, 2020).

1.1.3. PATOGENIA

Los linfocitos B provienen de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales y forman parte de la respuesta de la inmunidad humoral. Estas células reconocen y responden a antígenos. La fase inicial de diferenciación de los linfocitos B tiene lugar en la médula ósea. Sus precursores son las células pro-B,

pre-B y las células B inmaduras. En una última etapa portan en la membrana dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina que conforman el receptor para el antígeno. Tras este periodo maduran en los órganos linfoides secundarios a células secretoras de anticuerpos o células plasmáticas, cuando son expuestas a señales antigénicas o productos microbianos (Shapiro-Shelef *et al.*, 2004).

El MM sería una enfermedad con varias etapas con origen a partir de células B maduras tras pasar por el centro germinal de los órganos linfoides secundarios, donde tiene lugar los procesos de hipermutación somática y el cambio del gen de la cadena pesada que forma parte de las inmunoglobulinas y que produce el cambio de isotipo.

Los **cambios genéticos** que se producen en la célula plasmática neoplásica se pueden dividir en primarios y secundarios. Los cambios genéticos **primarios** más habituales se originan en la región del gen de la cadena pesada IgH, concretamente en la región 14q32.33, como son las traslocaciones t(14;16) y t(4;14) (Fonseca *et al.*, 2003), entre otras. Los cambios genéticos **secundarios** podrían ser responsables de la progresión de la enfermedad y comprenden anomalías en el gen MYC (8q24), activación de los genes NRAS y KRAS, así como mutaciones en los genes FGFR3 y TP53 y la inactivación de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas CDKN2A y CDKN2C (Manier *et al.*, 2017), así como cambios en la expresión de micro RNA y en la metilación de los genes (Corre *et al.*, 2015). Esto altera la respuesta a las señales del microambiente medular que finalmente provocan alteraciones en el ciclo celular y la apoptosis estimulando el crecimiento tumoral y la resistencia al tratamiento.

En las neoplasias de células plasmáticas no sólo se producen cambios genéticos en las células transformadas, sino que también se altera **el microambiente de la médula ósea** (Pardanani *et al.*, 2003).

El microambiente en la médula ósea es responsable de que estas células malignas tengan una mayor supervivencia y de la progresión de la enfermedad (Bianchi *et al.*, 2015). En la médula ósea tendrían lugar cambios epigenéticos de

hiper/hipometilación y finalmente sucesos biológicos que comprenden la proliferación, la angiogénesis, la resistencia a los fármacos, la alteración de la vigilancia inmunitaria, el control del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN.

Los factores de riesgo que pueden estar relacionados con las neoplasias de células plasmáticas serían:

1. **Edad y sexo:** los estudios reflejan que la incidencia del MM aumenta con la edad, con una edad media en torno a los 65 años. Esta incidencia irá creciendo debido a que la población está cada vez más envejecida, por lo que el número de casos se incrementará en un 80% para las siguientes 2 décadas (Wildes *et al.*, 2014).
2. **Antecedentes familiares:** hay un mayor riesgo de padecer MM cuando hay un familiar de primer grado afectado por una neoplasia hematológica (OR=1.19). Y este riesgo es mayor si el antecedente familiar es de MM (OR=1.9) (Schinasi *et al.*, 2016).
3. **Raza o grupos de población:** existe una mayor incidencia en afroamericanos con respecto a los individuos de población caucásica (Dores *et al.*, 2009).
4. **La aparición de una MGUS** se considera el principal factor de riesgo que evoluciona a MM (Sergentanis *et al.*, 2015). La progresión de MGUS no-IgM a MM es de un 1% (Cosemans *et al.*, 2018) y de mieloma quiescente (SMM) a MM del 10% en los primeros 5 años (Kyle *et al.*, 2007).
5. La diabetes mellitus tipo 2 parece estar implicada en una incidencia aumentada de MM (Castillo *et al.*, 2012).
6. La obesidad es un factor de riesgo para el MM, y este factor de riesgo es potencialmente reversible (Wallin *et al.*, 2011).
7. El contacto con pesticidas y agentes químicos (Chang *et al.*, 2016) (Liu *et al.*, 2013).

8. La falta de actividad física (Patel *et al.*, 2015).
9. Enfermedades de base autoimmune (Hemminki *et al.*, 2016) como la púrpura trombocitopénica inmune, polimiositis/dermatomiositis, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y el lupus eritematoso sistémico. Los autores plantean que la estimulación de células B maduras en este tipo de patologías podría fomentar la división celular y la hipermutación somática, que podría ser el fundamento patogénico en la transformación neoplásica.
10. El virus de la inmunodeficiencia humana (Cheung *et al.*, 2005).
11. El virus de la hepatitis B (Francechi *et al.*, 2011).

1.1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

El grupo internacional de mieloma (IMWG, del inglés *International Myeloma Working Group*), publicó un documento consenso en el año 2014 donde estableció los criterios *diagnósticos y clasificación de las neoplasias de células plasmáticas* (Rajkumar *et al.*, 2014).

1. GAMMAPATIA NONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIER-
TO (MGUS) (No IgM)
2. MGUS DE CADENAS LIGERAS
3. SMOLDERING MIELOMA
4. MIELOMA MÚLTIPLE
5. PLASMOCITOSMA SOLITARIO
6. PLASMOCITOMA SOLITARIO CON MINIMA AFECTACION
DE MÉDULA ÓSEA

1.2. DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

1.2.1. EVALUACIÓN CLÍNICA

De forma inicial, el protocolo de manejo de un paciente sería (Kumar *et al.*, 2009):

1. Diagnóstico.
2. Evaluación de comorbilidades y estado funcional.
3. Estimación del riesgo.
4. Terapia individualizada

1.2.2. ESTUDIOS DE LABORATORIO

Tanto para el diagnóstico como para valorar la respuesta al tratamiento, deben ser cuantificados los siguientes parámetros (Rajkumar *et al.*, 2014) (Guía de Mieloma Múltiple. Grupo Español de Mieloma):

1. Hemograma, VSG y frotis de sangre periférica.
2. Bioquímica sérica:
 - Obligatorios: creatinina y urea, Ca y fósforo, proteínas totales y albúmina, LDH y beta-2 microglobulina (β_2m).
 - Recomendables: pruebas de función hepática y despistaje de anemia (metabolismo de hierro, vitamina B12, ácido fólico y hormonas tiroideas) o de hiperparatiroidismo (PTH) si procede.
 - Si se sospecha amiloidosis: Troponina T y proBNP.
3. Estudio de proteínas

- En suero: electroforesis (EF) con cuantificación del componente monoclonal en suero (CMs) e inmunofijación (IF) para tipificar la monoclonalidad; dosificación de inmunoglobulinas (Igs); cadenas ligeras libres en suero (FLC) mediante nefelometría (CLL- κ y CLL- λ y su ratio).
 - En orina de 24 horas: proteinuria total, EF para cuantificar el componente monoclonal en orina (CMo) mediante proteinuria de BJ e IF para tipificar la monoclonalidad del componente monoclonal.
4. Presencia de células plasmáticas aberrantes en sangre periférica a través de un estudio inmunofenotípico. Este parámetro no se ha estandarizado en todos los centros.
 5. Aspirado de médula ósea.
 - Citomorfología: porcentaje y morfología de las células plasmáticas.
 - Ctometría de flujo: inmunofenotipo.
 - Estudios citogenéticos por hibridación in situ fluorescente (FISH)
 6. Serologías víricas de VIH, VHB y VHC.

1.2.3. ESTUDIOS DE IMAGEN

Las siguientes técnicas evalúan las lesiones osteolíticas (Guía de Mieloma Múltiple. Grupo Español de Mieloma):

1. Serie ósea por radiología convencional, aunque tiene baja sensibilidad.
2. El TAC de baja dosis ha incrementado la sensibilidad para detectar lesiones óseas y de médula ósea (Hillengass *et al.*, 2019), por lo que ha sustituido a la radiología convencional como método de imagen de *elección* para el diagnóstico de la enfermedad ósea en el MM.
 - Permite detectar enfermedad extramedular.

- Aporta información sobre el riesgo de fractura y la estabilidad de las vértebras colapsadas.
- Valora la compresión de la médula espinal cuando la RM no está disponible.
- Permite la planificación de radioterapia o la obtención de biopsias percutáneas.

Para evaluar la enfermedad medular se emplea (Guía de Mieloma Múltiple. Grupo Español de Mieloma):

- Resonancia magnética: en el MM al diagnóstico se recomienda la RM de cuerpo entero (o alternativamente la RM de columna y pelvis) si la TC de cuerpo entero es negativa o PET-TC es negativa. También se emplea en sospechas de compresión medular (aporta información intrarraquídea).
- PET-TC con 18-fluorodesoxiglucosa:
 - Técnica de elección para valorar la respuesta al tratamiento y la presencia de enfermedad extramedular.
 - Tiene más sensibilidad que la RM en las lesiones costales y escapulares.
 - Predice el pronóstico: número de lesiones activas, enfermedad extramedular o persistencia tras el tratamiento.

1.2.4. ESTUDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN MÉDULA ÓSEA

1.2.4.1. ESTUDIOS DE INMUNOFENOTIPO Y ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN MÉDULA ÓSEA

La citometría de flujo multiparamétrica se emplea actualmente para diagnosticar, caracterizar y clasificar la enfermedad. Así mismo se utiliza para mo-

nitorizar la respuesta al tratamiento y estos resultados se integran con la información clínica, radiológica y bioquímica de los pacientes (van Dongen *et al.*, 2012).

La citometría de flujo es una técnica que se fundamenta en hacer pasar una suspensión de células en fila una por una atravesando un haz de luz láser focalizado. Las señales se originan al pasar la célula por el rayo de luz láser y se recogen por varios detectores. La luz dispersada en ángulo cónico pequeño (0-10°) se denominada **FSC** (del inglés *Forwad Scatter*) y es proporcional al **tamaño** de la célula. La luz dispersada en ángulo recto (90°C) llamada **SSC** (del inglés *Side Scatter*) mide la **complejidad** o la estructura interna de la célula.

Además, los citómetros de flujo pueden detectar señales de fluorescencia que se originan cuando marcamos una célula con un anticuerpo monoclonal conjugado con un fluorocromo y éste forma un complejo con un antígeno de la célula. Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben la luz a una determina longitud de onda con una energía determinada y que emiten a una longitud de onda superior de menor energía, es decir, que se clasifican según sus espectros de excitación y emisión.

La citometría de flujo emplea anticuerpos monoclonales que son específicos para sólo un antígeno. Los antígenos que reconocen los anticuerpos monoclonales pueden estar localizados en la membrana, el citoplasma o el núcleo de la célula. Para denominarlos se emplea el sistema de clasificación CD (*Cluster of Differentiation* o grupos de diferenciación). (<http://www.hcdm.org/>).

De manera inicial, cuando se sospecha que un paciente pueda sufrir una neoplasia de células plasmáticas se debe estimar el porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea a través de un estudio morfológico en una muestra de aspirado medular. A continuación, la clonalidad se puede analizar mediante citometria de flujo, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. La citometría de flujo, a su vez, puede demostrar que el clon de células malignas es de carácter monoclonal y no un proceso reactivo. Pero sobre todo, la citometría de flujo es junto a los métodos moleculares, la técnica de mayor sensibilidad para realizar

los estudios de “enfermedad mínima residual” y monitorizar la respuesta al tratamiento (cita de citometría de nueva generación de Alberto Orfao, Salamanca).

Con respecto al diagnóstico diferencial, la citometría de flujo permite identificar las células plasmáticas mediante el marcador CD138, para posteriormente separar esta población en maligna o benigna en función del inmunofenotipo (Rawstron *et al.*, 2008), a través de marcadores, como el CD19, CD27, CD28, CD43, CD45, CD56, CD117, CD200, etc., como se expondrá más adelante, y nuevamente estimar el pronóstico de la enfermedad para más adelante valorar la enfermedad mínima residual en los pacientes con estas patologías. Dentro de la citometría de flujo, las poblaciones celulares se consideran fuera de los límites de normalidad cuando muestran patrones atípicos de diferenciación, cuando manifiestan de manera aumentada o disminuida los antígenos habituales, cuando presentan patrones de maduración anormales o se manifiestan antígenos de manera aberrante (Soh *et al.*, 2017).

Otro marcador que la citometría de flujo puede estimar es la “ratio” de células plasmáticas neoplásicas frente a células sin alteraciones. Esto ayuda a diferenciar entre las patologías benignas, como el MGUS, y malignas, como el MM (Rawstron *et al.*, 2008), siendo la ratio superior al 97% de células malignas para el MM y superior al 3% de células benignas para el MGUS. Para concluir, la ratio >97% también predice un peor desenlace para el paciente.

Actualmente se sabe que las técnicas convencionales para evaluar la respuesta a los tratamientos, mediante los estudios de enfermedad mínima residual, basadas en la cuantificación o detección del componente monoclonal en suero u orina no presentan la sensibilidad necesaria para identificar de forma temprana pacientes que recaerán y que podrían beneficiarse de tratamientos preventivos personalizado. Sin embargo, técnicas recientes de biología molecular (ASO-PCR y NGS) y de citometría de flujo multiparamétrica si tienen suficiente sensibilidad.

La citometría de flujo de nueva generación es rápida, sensible y está estandarizada para su implementación en la práctica clínica (Flores-Montero *et*

al., 2017). Este tipo de análisis han puesto en valor los estudios de enfermedad mínima residual y han podido demostrar que la ausencia de enfermedad mínima residual tras el tratamiento es, actualmente, el factor pronóstico más importante en MM tanto en pacientes trasplantados como en pacientes no trasplantados, independientemente de la edad y del riesgo y por tanto es un criterio esencial en la evaluación de la respuesta al tratamiento (Paiva *et al.*, 2010). La citometría de flujo de alta sensibilidad permite identificar pacientes que incluso estando en remisión completa tienen peor pronóstico y se beneficiarían de un tratamiento para prevenir la recída (Paiva *et al.*, 2012).

La realización de los estudios de enfermedad mínima residual requiere de la implantación de procedimientos estandarizados y de la utilización de un panel de anticuerpos monoclonales mínimo que incluya antígenos para la detección de las células plasmáticas (CD45, CD38 y CD138) y la identificación de patrones aberrantes de expresión de moléculas como CD19, CD27, CD43, CD56, CD81 y CD117. No obstante, se recomienda que el panel de anticuerpos y sus fluorescencias sea exactamente el mismo al diagnóstico y al seguimiento (Flores-Montero *et al.*, 2017; Stetler-Stevenson *et al.*, 2016).

1.2.4.2. DETECCIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SANGRE PERIFÉRICA

El MM es una enfermedad compleja y en su pronóstico intervienen varios factores. Los subtipos genéticos de MM tienen diferentes características biológicas subyacentes que definen las propiedades proliferativas, apoptóticas y de diseminación de la célula mielomatosa y contribuyen a la heterogeneidad clínica de la enfermedad (Zhan *et al.*, 2006). Aunque los mecanismos precisos que subyacen a la diseminación de las células tumorales del mieloma siguen siendo en gran parte desconocidos (Paiva *et al.*, 2013), varios estudios han demostrado de forma recurrente que la presencia de células plasmáticas circulantes aberrantes en la sangre periférica es un marcador de la actividad de la enfermedad en pacientes

con MM (Witzig *et al.*, 1993), con un significado pronóstico adverso independiente en MGUS (Kumar *et al.*, 2005), SMM (Witzig *et al.*, 1994); (Bianchi *et al.*, 2013); (Gonsalves *et al.*, 2017), MM (Witzig *et al.*, 1996); (Nowakowski *et al.*, 2005); (Chakraborty *et al.*, 2017) y amiloidosis de cadena ligera (Pardanani *et al.*, 2003). Además, la presencia de células plasmáticas circulantes aberrantes puede predecir la recaída temprana después del trasplante autólogo de células madre (Dingli *et al.*, 2006), (Chakraborty *et al.*, 2016), y parece ser útil como factor predictivo en el MM recidivante (Gonsalves *et al.*, 2014).

En los últimos años, la detección de células plasmáticas circulantes aberrantes ha ganado interés para el MM principalmente debido a la naturaleza mínimamente invasiva de los análisis de sangre frente a los de médula ósea. La citometría de flujo de nueva generación de alta sensibilidad es capaz de detectar células plasmáticas circulantes aberrantes sistemáticamente en la sangre de pacientes con MM en el momento del diagnóstico, con un impacto pronóstico adverso cuando se detectan recuentos más altos de células plasmáticas circulantes aberrantes, lo que sugiere que la diseminación de la enfermedad a través de la sangre confiere un comportamiento maligno al MM (Sanoja-Flores *et al.*, 2018). En esta dirección, resultados previos de nuestro grupo mostraban que la presencia de células plasmáticas aberrantes en sangre periférica por encima del 0.0035% del total de células de la sangre periférica permitía discriminar gammapatías benignas (MGUS) de malignas (MM y SMM) y otorgaba un valor predictivo negativo en la evolución clínica de los pacientes con neoplasias de células plasmáticas de diferente grado de malignidad, desde el MGUS hasta el MM (Periago *et al.*, 2016).

Además, la citometría de flujo de nueva generación de alta sensibilidad proporciona información adicional sobre el seguimiento de la eficacia del tratamiento pues es capaz de detectar células plasmáticas circulantes aberrantes en el 26% de los pacientes después de la terapia, lo que indica que los pacientes tienen una mayor capacidad de diseminación y/o crecimiento tumoral (Sanoja-Flores *et al.*, 2019), lo que en última instancia determina la progresión de la enfermedad, muy probablemente debido a las características más inmaduras y

similares a las células madre tumorales de las células plasmáticas (Sanoja-Flores *et al.*, 2018).

1.2.4.3. ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS Y CONTENIDO DE ADN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA

El estudio del ciclo celular de las células plasmáticas mediante citometría de flujo por tinción con ioduro de propidio y anticuerpos frente a CD38 aporta información complementaria para el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias de células plasmáticas: 1) se pueden identificar anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidía) y 2) se puede estimar el índice de proliferación de las células plasmáticas. Entre el 50% y el 70% de los pacientes de MM presentan aneuploidías, más frecuentemente por hiperdiploidía (generalmente trisomías de los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, o 21) y menos frecuentemente hipodiploidía (típicamente monosomías) (Debes-Marun *et al.*, 2003). En general, la hiperdiploidía se asocia a mejor pronóstico, mientras que las hipodiploidías lo hacen a un peor pronóstico. La diploidía suele tener un efecto neutro en cuanto al pronóstico, salvo que se asocie a alteraciones cromosómicas de buen pronóstico como la t(11;14) o de mal pronóstico como t(4,14), t(14;16), delección P53 o ganancia de 1q.

El análisis del ciclo celular por citometría de flujo ha demostrado que la existencia de valores superiores al 3% de células plasmáticas en fase de síntesis (fase S) se asocia a pronóstico adverso en MM. Así, una tasa por encima del 3% se acepta como marcador de alto riesgo (Witzig *et al.*, 1999).

El índice de proliferación de las células plasmáticas mielomatosas proporciona además información sobre la biología de la célula neoplásica y es un buen marcador pronóstico en MM activo (Scudla *et al.*, 2006); (Minarik *et al.*, 2011); (Minarík *et al.*, 2005), SMM (Madan *et al.*, 2010); (Aljama *et al.*, 2018) e incluso en MGUS (Dhodapkar *et al.*, 2014). Sin embargo, la expansión del clon neoplásico de mieloma está determinada por un equilibrio entre la prolifera-

ción, por un lado, y la inducción o bloqueo de la apoptosis, por otro. De hecho, el mieloma se caracteriza por una proliferación muy lenta de células plasmáticas malignas, lo que sugiere que la patogenicidad y la resistencia al tratamiento de estas células dentro de la médula ósea pueden estar relacionadas con la resistencia a la apoptosis (Oancea *et al.*, 2004). Los desequilibrios en la expresión de los miembros de la familia Bcl-2, mayor expresión de los antiapoptóticos Bcl-2 y Mcl-1 y menor de los proapoptóticos Bax (Spets *et al.*, 2002), dan como resultado defectos en la muerte celular programada, que se asocian con malignidad, agresividad y quimiorresistencia de tumores (Oancea *et al.*, 2004). Diversas líneas terapéuticas que están siendo efectivas en MM modulan los niveles de los miembros de la familia Bcl-2, cuya expresión está regulada principalmente por p53, el factor nuclear κ B y los factores STAT (Oancea *et al.*, 2004). Tanto los tratamientos inmunomoduladores como los inhibidores del proteasoma alteran la vía de supervivencia NF- κ B de las células plasmáticas y estimulan la apoptosis de las células plasmáticas malignas (Holstein *et al.*, 2017); (Mitsiades *et al.*, 2002). Además, los inhibidores del proteasoma estimulan la expresión de los miembros de la vía de inducción de apoptosis mediada por Fas/Fas-ligando (Mitsiades *et al.*, 2002).

A diferencia de lo que ocurre con los tumores sólidos, donde las tasas de proliferación más altas se asocian con un aumento de la apoptosis de las células neoplásicas (Liu *et al.*, 2001), en las neoplasias de células plasmáticas parece existir una relación inversa entre la proliferación de células plasmáticas y las tasas de apoptosis (Scudla *et al.*, 2003). No obstante, una ratio elevada de proliferación frente a apoptosis de las células plasmáticas de la médula ósea es un factor pronóstico independiente que predice una supervivencia global más corta en los pacientes con tumores sólidos como el adenocarcinoma cervical (Leung *et al.*, 2004) y el glioblastoma multiforme (Kuriyama *et al.*, 2002) y también en pacientes con MM (Scudla *et al.*, 2006); (Minarik *et al.*, 2011); (Minarić *et al.*, 2005). En MGUS y SMM una ratio proliferación/apoptosis elevada en las células plasmáticas de la médula ósea se ha asociado con una enfermedad activa y la progresión de la enfermedad (Witzig *et al.*, 1999); (Scudla *et al.*, 2005),

pero su valor pronóstico en la supervivencia global del paciente ha sido poco investigada.

Estudios recientes parecen demostrar que la estimación del índice de apoptosis en las células plasmáticas de médula ósea es un parámetro independiente y de gran valor predictivo. Pacientes con valores superiores a 4,5% de células plasmáticas apoptóticas, presentan una supervivencia global de 38 meses de media, frente a 16 meses en los pacientes con valores inferior al 4,5%. Estos datos también son aplicables a pacientes en tratamiento con talidomida y bortezomib tras la primera y segunda recaída (Minarik *et al.*, 2009). Si tenemos en cuenta que la introducción de los nuevos fármacos anti-mieloma ha reducido significativamente la capacidad predictiva de los factores pronósticos clásicos como la citogenética y las características proliferativas de las células plasmáticas, la evaluación del índice de apoptosis de las células plasmáticas por citometría de flujo se perfila como un marcador pronóstico de gran utilidad.

Otras vías implicadas en la inhibición de la apoptosis y la supervivencia de las células malignas en la médula ósea comprenden for factores $\text{NF-}\kappa\beta$, PI3K/AKT and JAK/STAT y además confieren a estas células una resistencia a los tratamientos quimioterápicos (Akhtar *et al.*, 2020). De hecho, el tratamiento frente a estas enfermedades puede seleccionar de manera positiva clones de células malignas que sean resistentes a la apoptosis o proliferen de manera más intensa (Lionetti *et al.*, 2017). Para terminar este apartado, comentar que las células malignas expresan el receptor para la IL-15 que de manera autocrina aumenta la supervivencia de estas células y existen trabajos que demuestran que actuando sobre este mecanismo, como diana terapéutica, se podría conseguir que las células malignas entraran en apoptosis de manera natural (Tinhofer *et al.*, 2000).

1.2.5. ESTUDIOS DE CITOGENÉTICA EN LAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

El International Myeloma Working Group recomienda que en todos los pacientes diagnosticados de MM se haga una evaluación mediante FISH de las

alteraciones citogenéticas (Fonseca *et al.*, 2009). Mediante esta técnica se llegan a demostrar anomalías cromosómicas numéricas hasta en el 90% de MM (Debes-Marún *et al.*, 2003) y de traslocaciones del gen de la cadena pesada de las Ig (IgH) con una incidencia superior al 50% en MM y MGUS (Fonseca *et al.*, 2003).

Las alteraciones genéticas que puede experimentar la CP se clasifican en:

- a) **Primarias:** aparecen al inicio de la enfermedad y siguen estando presentes durante toda la evolución de la enfermedad. Están implicadas dos vías que no se suelen superponer como son las translocaciones del gen de la IgH y las trisomías.

La trisomía se caracteriza por una copia adicional de uno o más cromosomas de número impar (cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15 o 17), esto se denomina hiperploidía y se presenta en el 60% de los pacientes (Chretien *et al.*, 2015; Aktas Samur *et al.*, 2019; Barilà *et al.*, 2020).

Las traslocaciones del gen IgH son el principal evento oncológico y ya aparece en la mitad de los casos de MGUS y SMM, constatándose hasta en el 40% de los MM sintomáticos. Se producen por errores en los procesos fisiológicos de cambio de isotipo o de hipermutación somática, lo que podría dar lugar a la desregulación de los genes de la ciclina D, tanto de forma directa (11q13: ciclina D1; 6p21: ciclina D3) como indirecta (4p16q23, otras: ciclina D2).

Las principales translocaciones del **locus 14q32 de IgH** junto con sus genes desregulados son:

1. t(11;14) (q13;q32): gen afectado CCND1 (ciclina D1): neutral
2. t(4;14) (p16;q32): gen afectado FGFR-3 y MMSET: pronóstico adverso
3. t(14;16) (q32;q23): gen afectado C-MAF: riesgo intermedio
4. t(14;20) (q32;q11): gen afectado MAFB: alto riesgo
5. t(6;14): gen afectado CCND3 (ciclina D3): buen pronóstico

b) **Secundarias:** Se asocian con progresión de la enfermedad y se adquieren tardíamente en el curso de esta (Chan *et al.*, 2017). Se caracteriza por la aparición de eventos secundarios (translocaciones, deleciones, mutaciones) consecuencia de la inestabilidad genómica de las células neoplásicas. Entre estas destaca la monosomía 13 y deleción 13q, descritas más precozmente. El resto aparece en fases posteriores como la deleción del(17p) que afecta al gen TP53. La inactivación de TP53 por deleción o mutación también parece estar más frecuentemente asociada con la progresión de la enfermedad. La alteración de la región cromosómica 1q21, principalmente por ganancia, se asocia a progresión desde mieloma quiescente a MM y a un peor pronóstico (Rajan *et al.*, 2015).

Alrededor del 30% de los casos en el momento del diagnóstico (Schmidt *et al.*, 2019) presentan la ganancia (tres copias) o amplificación (más de tres copias) del **brazo largo del cromosoma 1 (1q)**.

En el brazo largo del cromosoma 1 se encuentra el gen CKS1B, cuya proteína interviene en el crecimiento y división celular, a través de la activación de la vía del STAT3 (Shi *et al.*, 2010). Este gen estaría expresado de una manera aumentada cuando existe ganancia/amplificación del cromosoma 1q y está relacionado con una peor supervivencia (Bock *et al.*, 2016), presentando una menor supervivencia libre de progresión y supervivencia global (Varma *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2018). Por ello, esta alteración citogenética sería un marcador de alto riesgo en los pacientes con MM y se puede emplear junto con el R-ISS para estimar el pronóstico de los pacientes afectados por esta neoplasia de células plasmáticas (D`Agostino *et al.*, 2020; Hanamura *et al.*, 2006; Avet-Loiseau *et al.*, 2007; Avet-Loiseau *et al.*, 2012).

Recientes investigaciones demuestran que la presencia de la alteración citogenética en 1q interviene también en la resistencia por parte de las células malignas a los diferentes tratamientos (Shi L *et al.*, 2010), incluyendo agentes novedosos como el bortezomib y la lenalidomida (Giri *et al.*, 2020; An *et al.*,

2014), y el trasplante autólogo de células hematopoyéticas tampoco mejora la supervivencia en los pacientes con alteraciones en el cromosoma 1q (Shah *et al.*, 2017). La consecuencia de este hecho es un mayor número de recaídas en los pacientes.

Por último, la ganancia/amplificación del cromosoma 1q está también relacionada con una mayor progresión en pacientes afectados de MM, sobre todo cuando existen igual o más de 4 copias (Schmidt TM *et al.*, 2019) u otras alteraciones citogenéticas asociadas como del(13q14) o del(17p13) (Grzasko *et al.*, 2013) con una menor supervivencia global.

Otras alteraciones citogenéticas comprenden las mutaciones en los protooncogenes de las proteínas **RAS** y la **proteína G monomérica** que median señales a las células que afectan a la conformación del citoesqueleto, la proliferación, la diferenciación, intervienen en la adhesión y migración celular y en la apoptosis y en la capacidad de invasión y supervivencia de tumores, como el MM. Las mutaciones que afectan a la familia de N-RAS ocasionan una resistencia a agentes terapéuticos como el bortezomib (Mulligan *et al.*, 2014).

Tanto las anomalías citogenéticas primarias como secundarias pueden influir en el curso de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y el pronóstico.

1.3. NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ASINTOMÁTICAS

1.3.1. GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO

LA gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) es el trastorno de células plasmáticas más común (Soh *et al.*, 2017). Tiene una prevalencia del 3% en la población de más de 50 años y presenta una progresión a MM del 1% al año (Kyle *et al.*, 2006; Pérez-Persona *et al.*, 2007). Aunque representa un clon de células que segregan inmunoglobulinas, no se considera como patológico o maligno y no requiere de intervenciones o tratamientos (Soh *et al.*, 2017).

Para el diagnóstico de esta gammapatía se emplean los criterios del International Myeloma Working Group (Rajkumar *et al.*, 2014). Se precisan las 3 siguientes condiciones:

1. Componente monoclonal (CM) en suero < 3 g/dL (no de tipo IgM).
2. Células plasmáticas (CP) en médula ósea <10%.
3. No evidencia de daño orgánico relacionado con el mieloma como: hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas, hiperviscosidad, hepatoesplenomegalia

Posteriormente se han añadido otras entidades como son las gammapatías monoclonales de significado clínico:

1. GM de significado renal *
2. GM de significado neurológico

* El término GM de significado renal fue presentado por primera vez en 2012 y redefinido por el International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group (IKMG) en 2017 (Leung *et al.*, 2019).

1.3.2. MIELOMA MÚLTIPLE ASINTOMÁTICO (SMOLDERING) O MIELOMA QUIESCENTE

Existe otro estadio considerado premaligno que se denomina SMM (asintomático / quiescente) que se caracteriza por un mayor número de células plasmáticas malignas y proteínas monoclonales (Kyle *et al.*, 1980). El riesgo de progresión a MM es de aproximadamente el 10% en el primer año, aunque en años posteriores decae a un 3-5% (Pérez-Persona *et al.*, 2007; Visram *et al.*, 2021). No obstante, este riesgo varía enormemente dependiendo de diferentes factores de riesgo, llegando a alcanzar tasas de progresión superiores al 50% cuando los factores de riesgo son adversos (Visram *et al.*, 2021).

Para el diagnóstico de esta gammapatía se emplean los criterios del International Myeloma Working Group (Rajkumar *et al.*, 2014). Se precisan las 2 siguientes condiciones:

1. Banda Monoclonal (s) (IgG or IgA) ≥ 3 g/dL o Proteinuria de Bence Jones ≥ 500 mg en 24 h y/o Células Plasmáticas Clonales en Médula Ósea entre 10-59%.
2. Ausencia de signos de daño orgánico atribuible al mieloma o de amiloidosis

El mieloma asintomático con riesgo de progresión bajo o intermedio no precisan de tratamiento, por el contrario en el mieloma asintomático de alto riesgo según los estudios GEM-PETHEMA y ECOG la progresión se enlentece usando lenalidomida y dexametasona o lenalidomida sola (Guía de Mieloma Múltiple, Grupo Español de Mieloma).

1.4. MIELOMA MÚLTIPLE SINTOMÁTICO

1.4.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MIELOMA SINTOMÁTICO

Para el diagnóstico de esta gammapatía se emplean los criterios del International Myeloma Working Group (Rajkumar *et al.*, 2014). Se precisan las 2 siguientes condiciones:

1. Células plasmáticas clonales* en médula ósea $\geq 10\%$ o biopsia que afirme plasmocitoma óseo o extramedular y
2. Uno o más de las siguientes circunstancias que definen el mieloma:
 - Daño orgánico que se otorgue al mieloma:
 - Hipercalcemia: calcio sérico >0.25 mmol/L (>1 mg/dL) del límite superior de la normalidad o >2.75 mmol/L (>11 mg/dL).

- Insuficiencia renal: aclaramiento de creatinina <40 mL por minuto o creatinina sérica >177 $\mu\text{mol/L}$ (>2 mg/dL)
 - Anemia: descenso de la hemoglobina >2 g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad o hemoglobina <10 g/dL.
 - Lesiones óseas^{**}: uno o más lesiones osteolíticas por radiografía convencional, TAC o TAC/PET.
 - Uno o más de los siguientes eventos:
 - Células plasmáticas clonales en MO $\geq 60\%$
 - Suero: Ratio de cadenas ligera libre (FCL) involucrada/no involucrada ≥ 100 (siempre que la FCL involucrada ≥ 100 mgr/dL)
 - Resonancia magnética con >1 lesión focal que debe medir > 5 mm
- * Células plasmáticas clonales: restricción de cadenas ligeras κ/λ por citometría de flujo en caso de aspirado medular, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia en caso de biopsia medular.
- ** Lesiones óseas: si la médula ósea tiene menos de un 10% de células plasmáticas clonales, se precisan más de una lesión ósea para diferenciarlo del plasmocitoma con mínima infiltración medular.

1.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los principales síntomas en la clínica del MM se basan en una sintomatología denominada CRAB que incluye hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesión ósea.

El 80% de los pacientes con MM presentan **afectación ósea con dolor** (Palumbo *et al.*, 2011), especialmente en la columna vertebral y a huesos largos

debidos a la presencia de lesiones líticas en el hueso, provocadas por el aumento en la actividad osteoclástica, osteoporosis, osteopenia o fracturas patológicas.

Otras manifestaciones clínicas comprenden la **anemia** en un 73% de los pacientes (Palumbo *et al.*, 2011), **hipercalcemia** que causa polidipsia, poliuria, deshidratación, estreñimiento grave, náuseas o vómitos, pérdida de apetito, debilidad, desasosiego y confusión. La **insuficiencia renal** (19%) se puede manifestar como riñón de mieloma, tubulopatía o síndrome nefrótico.

Los pacientes presentan también **tendencia a padecer infecciones** (Kyle *et al.*, 2003) debido a las alteraciones en el sistema inmunitario, entre las que destacan inversión del cociente de linfocitos CD4/CD8, la disfunción de las células natural killer (NK), o el descenso de inmunoglobulinas normales (inmunoparesia) (Nucci *et al.*, 2009) causada por la infiltración medular y la insuficiencia renal (Palumbo *et al.*, 2011).

1.4.3. DATOS DE LABORATORIO

El 73% de los pacientes presentan **anemia** normocítica normocrómica al diagnóstico y el 97% en algún momento de la enfermedad. Las cifras de leucocitos y plaquetas suelen ser normales. La anemia es de origen multifactorial (reemplazamiento medular, déficit de eritropoyetina en parte debido a insuficiencia renal y origen dilucional en caso de componente monoclonal elevado). La **creatinina sérica** está aumentada en el 50% de los pacientes al diagnóstico siendo las dos causas principales la nefropatía por cadenas ligeras y la hipercalcemia. La **hipercalcemia** se encuentra presente en el 28% de pacientes al diagnóstico.

En el proteinograma se detecta **una banda o pico** monoclonal en la región gamma en el 80% de los pacientes, aumentando la sensibilidad al 90% con la inmunofijación sérica. El 20% no presenta banda, la mayoría de los cuales tiene MM de cadenas ligeras. El componente monoclonal más frecuente es IgG (52%) seguido de IgA (21%), cadenas ligeras puro (Bence-Jones) (16%), IgD

o biclonal (2%). Las inmunoglobulinas no involucradas en el mieloma están descendidas (**inmunoparesia**) en el 73-90% de los casos. En el 90% de los pacientes con MM presentan proporciones anormales de **cadena libres en suero**.

1.4.4. FACTORES PRONÓSTICO EN EL MIELOMA MÚLTIPLE

Como en otras neoplasias, la supervivencia global del MM se ve afectada por las características del huésped, la carga tumoral (estadio), la biología (anomalías genéticas) y la respuesta al tratamiento.

Factores relacionados con el paciente (edad, comorbilidades, ECOG): El factor más importante que tiene relación con la supervivencia global en pacientes con MM es la edad, de tal manera que para edades mayores de 75 años la supervivencia media es de 5 años frente a la supervivencia media de 8 años para los pacientes que son más jóvenes y reciben un trasplante de progenitores hematopoyéticos (Rajkumar SV, 2018).

Factores relacionados con la enfermedad: carga tumoral/estadio, insuficiencia renal, hipoalbuminemia, B2microglobulina elevada, aumento de PCR y la respuesta favorable al tratamiento.

El riesgo de la enfermedad se ha evaluado tradicionalmente mediante la estadificación de Durie Salmon y el sistema internacional de estadificación (ISS), siendo el R-ISS el estándar actual a la hora de aplicar el pronóstico del MM.

CLASIFICACION DE DURIE Y SALMON	
Estadio I: (masa celular baja) Se cumplen todos los criterios:	<ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobina mayor de 10 g/dl. • Nivel de calcio en sangre (calcemia) normal o < 10,5 mg/dl. • Componente Monoclonal (nivel de inmunoglobulina): IgG menor de 5 g/dl; IgA menor de 3 g/dl o cadenas ligeras en orina menor de 4 g/24 horas. • Ausencia de lesiones osteolíticas (escala 0), o una sola lesión lítica (en radiología).
Estadio II: (masa celular intermedia)	No cumple criterios de I o III.
Estadio III: (masa celular alta)	<ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobina menor de 8,5 g/dl. • Nivel de calcio en sangre (calcemia) elevado (mayor de 12 mg/dl). • Componente Monoclonal (nivel de inmunoglobulina): IgG mayor de 7 g/dl; IgA mayor de 5 g/dl o cadenas ligeras en orina mayor de 12 g/24 horas. • Lesiones osteolíticas múltiples (escala 3) y generalizadas en radiología (severas).
Cada estadio se subdivide en A o B si la creatinina es menor o mayor de 2 mg/dl	

INTERNATIONAL STAGING SYSTEM (ISS)		Mediana de supervivencia (meses)*
I	Beta-2-microglobulina sérica < 3,5 mg/L y albúmina sérica ≥ 3,5 g/dl.	62
II	No cumple criterios de estadio I o III.	44
III	Beta-2-microglobulina > 5.5 mg/L	29

* *Revised International Staging System (R-ISS)*

Combinar el ISS con el resultado de FISH y LDH. Existirían tres estadios (Avet-Loiseau *et al.*, 2013):

REVISED INTERNATIONAL STAGING SYSTEM (R-ISS)		% SUPERVIVENCIA GLOBAL A 5 AÑOS
I	ISS-I + CG* riesgo estándar por FISH + LDH normal.	82
II	No cumple criterios de estadio I o III.	62
III	ISS-III + anomalías CG de alto riesgo [del17p y/o t(4;14) y/o t(14;16)] o LDH elevada.	40

* CG: citogenética

Por último, existe una estratificación del riesgo en el MM activo basada en las características genéticas y la tasa de proliferación celular (Kumar *et al.*, 2009), llamada **clasificación m SMART 3.0 por la Clínica Mayo** (Dispenzieri *et al.* 2007; Mikhael *et al.*, 2013; Rajkumar SV, 2018) y que tiene detalles valiosos para formular una estrategia terapéutica:

Clasificación m SMART	% de pacientes de nuevo diagnóstico
Riesgo estándar Trisomías t(11;14) t(6;14)	75%
Alto riesgo t(4;14) t(14;16) t(14;20) del(17p) ganancia(1q) Doble-hit: 2 factores de alto riesgo Triple-hit: tres o más factores de alto riesgo	25%

1.5. TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE

La supervivencia del MM ha mejorado significativamente en los últimos 15 años gracias a los nuevos tratamientos que se han introducido (Kumar *et al.*, 2014) (Rajkumar *et al.*, 2020). La terapia de un paciente afectado por MM debería satisfacer los siguientes propósitos (Kumar *et al.*, 2009) (Fillmore *et al.*, 2019):

1. Estabilizar la enfermedad y revertir el daño orgánico como la hipercalcemia, la insuficiencia renal y la anemia.
2. Ser bien tolerado y tener pocos efectos secundarios.
3. Retrasar la muerte prematura.
4. Permitir el obtener células madre para el trasplante de progenitores hematopoyéticos.
5. Ser individualizado teniendo en cuenta la edad, ECOG y comorbilidades del paciente.

El planteamiento inicial depende de si el paciente es candidato o no a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). En general el TPH se reserva a pacientes jóvenes (< 65 a 70 años) que gozan de un buen estado físico y que pueden tolerar los efectos secundarios del procedimiento. Los trasplantes de células madre pueden ser de dos tipos: autólogos (auto-TPH o TASPE, de trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos) o alogénicos (alo-TPH) (American Cancer Society, 2020), aunque este último es poco frecuente en mieloma.

Las terapias más comúnmente utilizadas en MM incluyen (Dingli *et al.*, 2017):

1. Corticosteroides: dexametasona o prednisona
2. Agentes inmunomoduladores: talidomida, lenalidomida, pomalidomida

3. Inhibidores del proteosoma: bortezomib, carfilzomib, ixazomib
4. Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
5. Anticuerpos monoclonales: daratumumab, isatuximab, elotuzumab
6. Quimioterapia: melfalan, vincristina, ciclofosfamida, etopósido, doxorubicina, adriamicina, bendamustina

1.5.1. PACIENTES DE NUEVO DIAGNÓSTICO CANDIDATOS A TRASPLANTE

Son aptos aquellos pacientes reciente diagnosticados con edad <70 años, sin comorbilidades. Dicho tratamiento consta de tratamiento de inducción seguida de altas dosis de quimioterapia y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) y posterior mantenimiento con lenalidomida. El trasplante tiene mejores resultados en la supervivencia que la terapia de bortezomib, ciclofosfamida y dexametasona (Montefusco *et al.*, 2020). Con los tratamientos actuales, el 85% de los pacientes alcanzan respuesta parcial o superior.

Régimen de inducción: la combinación de cuatro fármacos bortezomib, talidomida, dexametasona, daratumumab (**Dara-VTD, IA**) aprobado por la EMA lo convierte en un nuevo estándar antes del TASPE (no financiada en España) (Guía de Mieloma Múltiple. Grupo Español de Mieloma). Si no está disponible, podemos utilizar bortezomib, talidomida, dexametasona, (**VTD, IA**) o bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona (**VCD, IIB**) o bortezomib, lenalidomida, dexametasona (**VRD, IIB**). Se recomienda la inducción con 4-6 ciclos en función del grado de respuesta alcanzado y la toxicidad. Como terapia de inducción, antes del trasplante, el daratumumab junto con bortezomib, talidomida y dexametasona consigue mejores resultados en cuanto a la supervivencia, que la terapia sin este anticuerpo monoclonal (Moreau *et al.*, 2019).

Régimen de acondicionamiento para el TASPE: Melfalán 200 mgr/m² continúa siendo el estándar de acondicionamiento previo al TASPE (Dimo-

poulos *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2009; Rajkumar, *et al.*, 2020; Gonsalves *et al.*, 2019).

Consolidación: el régimen de consolidación post-TASPE no se ha establecido como terapia estándar. En pacientes que han recibido como inducción VCD se debe considerar la administración de 2 ciclos de VRd. También se recomienda en pacientes con citogenética de alto riesgo, junto a TASPE en tándem.

Mantenimiento: se considera el tratamiento con lenalidomida estándar en todos los pacientes post-TPH de forma continua hasta intolerancia, recaída o progresión (único fármaco aprobado y financiado por el Servicio Nacional de Salud (Palumbo A *et al.*, 2012; Aksenova *et al.*, 2021; Mateos *et al.*, 2013). El bortezomib puede considerarse en paciente de alto riesgo (del17p y/o t(4;14)) (Guía de Mieloma Múltiple. Grupo Español de Mieloma).

1.5.2. PACIENTES DE NUEVO DIAGNÓSTICO NO CANDIDATOS A TRASPLANTE

La elección y el objetivo del tratamiento dependerá del estado del paciente (fit, intermedio-fit y frágil). Para ello se recomienda el uso de escalas geriátricas para determinar el estado del paciente.

Los objetivos en estos pacientes son:

1. Obtener la mejor respuesta posible
2. Retrasar la progresión de la enfermedad
3. Prolongar la supervivencia
4. Asegurar una buena calidad de vida y minimizar toxicidades

Para estos pacientes las opciones disponibles según la guía ESMO son:

1. Dara-VMP [IA]
2. DaraRd [IA] (no está aprobado en España por el momento)

3. VRd [IA]

Como alternativa, aunque a día de hoy se usan muy poco:

4. Rd [IA]

5. VMP [IA]

1.5.3. TRATAMIENTO DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE EN RECAÍDA

La terapia adecuada se elige en función de factores como la edad, el estado de salud, la disponibilidad de medicamentos, la respuesta a tratamientos previos, la agresividad de la fase de recaída y la elegibilidad para el TASPE del paciente (Alanazi *et al.*, 2020).

La evidencia apoya el uso preferente de fármacos a los que el paciente no ha sido expuesto o al menos a los que no haya mostrado refractariedad. Se define como mieloma refractario: aquel que ha tenido respuesta al tratamiento pero que progresa mientras dura el tratamiento o antes de 60 días tras finalizar el tratamiento (Guía de Mieloma Múltiple. Grupo Español de Mieloma). El mieloma en recaída sería el que progresa 60 días más allá de la finalización del tratamiento.

El TASPE de segunda línea es una opción para pacientes que recaen después de la primaria línea que incluya un TASPE seguido de lenalidomida y tuvo una duración de remisión inicial de ≥ 36 meses (Cook *et al.*, 2016; Cavo *et al.*, 2007). Aunque desde la aparición de los nuevos fármacos, esta opción cada vez es menos usada.

1.5.3.1. PACIENTES QUE HAN RECIBIDO UNA LÍNEA DE TRATAMIENTO PREVIA

Los tratamientos de elección en estos casos son diversos en función de los siguientes factores:

Paciente no expuesto o sensible a lenalidomida: tratamiento KRd (carfilzomib, lenalidomida, dexametasona) o Dara-Rd. Otros como elotuzumab o ixazomib no disponen de reembolso en España.

Paciente que ha recibido regímenes basados en bortezomib sin lenalidomida o daratumumab deben recibir un régimen basado en Rd, es decir, KRd, Dara-Rd, IRd o EloRd (elotuzumab, lenalidomide, and dexamethasone).

Paciente refractario a lenalidomida: Dara-Vd (daratumumab-bortezomib-dexametaxona), PVd (Pomalidomida-bortezomib-dexametasona), Dara-Kd (carfilzomib-dexametasona) o Dara-Poma-dexa (estos 2 últimos aprobados por la EMA, pero no financiados).

1.5.3.2. PACIENTES QUE HAN RECIBIDO DOS O MÁS LÍNEAS DE TRATAMIENTO.

TRATAMIENTO DE SEGUNDA RECAÍDA Y POSTERIORES

Las segundas recaídas de la enfermedad generan dificultades en el tratamiento debido a la toxicidad de las terapias empleadas con anterioridad y a que los pacientes pueden presentar nuevas comorbilidades. Se incluirán combinaciones de fármacos siempre que no sean refractarios a estos.

1. En pacientes con dos o más líneas previas de tratamiento y refractarios a lenalidomida y bortezomib:
 - * Pomalidomida-dexametasona (Pd): indicado en pacientes no paliativos que han recibido al menos dos líneas previas incluyendo bortezomib y lenalidomida
 - * Isatuximab-pomalidomida-dexametasona: aprobada recientemente por la EMA aunque no está todavía disponible en España. No obstante, se prevé que sea reembolsable en breve.

Daratumumab en monoterapia: a partir de la tercera línea para pacientes no expuestos previamente a daratumumab, refractarios a bortezomib y lenalidomida. En caso contrario, Dara-Rd o Dara-Vd.

2. Terapia dirigida frente a BCMA: belantamab mafodotin es un anticuerpo monoclonal inmunoconjugado de acción directa sobre el receptor del BCMA (B cell maturation antigen). Aprobado por la EMA recientemente y está indicado en monoterapia para el tratamiento del mieloma múltiple en pacientes adultos, que han recibido al menos cuatro terapias previas y cuya enfermedad es refractaria a un inhibidor del proteasoma, un agente inmunomodulador y un anticuerpo monoclonal anti-CD38 y que hayan demostrado progresión de la enfermedad en la última terapia.
3. Selinexor: Inhibe la exportación de ciertas proteínas supresoras de tumores y reguladores del crecimiento de tumores al bloquear la exportina-1 (XPO1). Esto conduce a un aumento en la supresión del tumor, lo que conduce a la muerte de las células cancerosas. Recientemente, aprobado por la FDA y está indicado en combinación con dexametasona para aquellos pacientes que hayan recibido al menos cuatro tratamientos anteriores y cuya enfermedad sea resistente al menos a dos inhibidores del proteasoma, dos agentes inmunomoduladores y un anticuerpo monoclonal anti-CD38, y que hayan presentado evolución de la enfermedad en el último tratamiento (no financiado, programa de acceso expandido para pacientes triples refractarios).
4. Respecto al TASPE en estos pacientes la evidencia actual es escasa. Se podría valorar en pacientes en los que la duración de la respuesta al primer TASPE haya sido larga (> 36 meses) y en función de si ha recibido mantenimiento o no. Pacientes con recaídas precoces tras el TASPE esta opción está contraindicada.

1.6. INMUNOVIGILANCIA EN CÁNCER

1.6.1. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA Y SUS COMPONENTES

La inmunidad innata, natural o nativa es la primera barrera de defensa del huésped frente a infecciones y tumores. Esta defensa tiene lugar de manera

inmediata, ya que a diferencia de la inmunidad adaptativa o específica, sus componentes están preformados y no genera memoria (Abul K Abbas *et al.*, 2014).

La inmunidad innata o natural está constituida por los siguientes componentes:

1. Las barreras epiteliales: comprenden la piel y la mucosa de los aparatos respiratorio y digestivo para evitar la entrada física de los microorganismos mediante uniones herméticas. A su vez producen péptidos antibióticos que lisan a los microbios y poseen linfocitos intraepiteliales para la destrucción de los mismos.
2. Inmunidad innata humoral: lisozima, sistema de complemento e interferones.
3. Inmunidad innata celular: fagocitos mono y polimorfonucleares y células NK que intervienen en la lisis de células infectadas o transformadas.

La respuesta inmunitaria innata posee dos tipos principales de reacciones:

1. La inflamación: los leucocitos y proteínas plasmáticas se acumulan y activan en los sitios donde existe infección o lesión de tejidos, destruyen a los microbios extracelulares y reparan el daño tisular.
2. La defensa contra los virus intracelulares y tumores: llevado a cabo principalmente por los linfocitos NK.

Los patógenos estimulan la inmunidad innata mediante moléculas con patrones asociados a microorganismos (PAMP). Igualmente las células dañadas o necrosadas expresan moléculas que también son reconocidas por el sistema inmunitario innato y se denominan patrones moleculares asociados a la lesión (DAMP). Las células del sistema inmunitario innato poseen receptores que reconocen estas estas señales, como son:

1. Receptores tipo *toll*: están ubicados en la superficie celular y reconocen componentes bacterianos como lipoglucanos, ácidos nucleicos de los virus, el lipopolisacarido (LPS), la proteína flagelar bacteriana, etc.
2. Receptores tipo NOD: están ubicados en el citosol y reconocen DAMP y PAMP
3. Receptores tipo RIG: reconocen el ARN de los virus
4. Receptores tipo lectina: reconocen glucanos de los hongos y manosa terminales

La inmunidad innata en pacientes afectados por el MM está alterada (Tamura *et al.*, 2018). La actividad celular de las células NK contra las células malignas del MM depende de receptores tales como el NKG2D, DNAX y los receptores naturales de citotoxicidad Np46, Np30 y Np44, cuya expresión se encuentra disminuida en el MM (Fauriat *et al.*, 2006), así como la expresión de PD-1.

La presencia de los macrófagos se encuentra aumentada en el ambiente de la médula ósea de los pacientes con MM, de tal manera que las células malignas proliferan y sobreviven a través de la molécula proliferativa STAT3 (Kim *et al.*, 2012).

Por último, los neutrófilos presentan una actividad reducida en los pacientes con MM mediante la disminución de la expresión de Arg-1 (Parrinello *et al.*, 2013).

1.6.2. RESPUESTA INMUNITARIA ESPECÍFICA O ADAPTATIVA

El sistema inmunitario adaptativo tiene como característica principal la especificidad por el antígeno (Paul *et al.*, 2018) y la generación de memoria (cuando el sistema inmune se enfrenta al antígeno de nuevo se produce una respuesta inmunitaria más potente y rápida frente a este). La respuesta inmunitaria primaria sigue el siguiente esquema:

1. Reconocimiento del antígeno
2. Periodo de latencia: al cabo de varios días los linfocitos se expanden clonalmente y se transforman en células efectoras
3. Respuesta efectora: producción de anticuerpos específicos, generación de actividad citolítica específica, activación de células fagocíticas y memoria inmunitaria.

La respuesta inmunitaria específica comienza con el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T y B. Las inmunoglobulinas (anticuerpos) se encuentran en su forma soluble en el torrente circulatorio o presente en la superficie celular de los linfocitos B. Por otra parte los linfocitos T se activan cuando los antígenos son presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. Los linfocitos CD8⁺ reconocen proteínas del citoplasma presentadas por todas las células nucleadas en moléculas de histocompatibilidad de clase-I y los CD4⁺ lo hacen sobre moléculas de clase-II presentando péptidos exógenos en las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B y linfocitos T activados).

La respuesta inmunitaria específica tiene lugar fundamentalmente en los órganos linfoides periféricos como los ganglios linfáticos, el bazo y tejido linfoides asociado a las mucosas (MALT). Se caracteriza por ser clonal, es decir, cada clon de linfocitos reconoce un antígeno específico y tiene un receptor único. El receptor transmite señales al citosol o núcleo del linfocito para que este se divida, se diferencie o incluso muera mediante la fosforilación de proteínas que activan la transcripción de genes y la producción de proteínas. El receptor para el antígeno se denomina complejo del receptor del linfocito B (BCR) o complejo del TCR para los linfocitos T. Los linfocitos cooperadores (mayoritariamente CD4⁺) colaboran en la producción de anticuerpos y la fagocitosis, mientras que los linfocitos citotóxicos (mayoritariamente CD8⁺) destruyen las células tumorales o infectadas por microorganismos.

Con respecto a la inmunidad específica en el MM, la alteración de los linfocitos B lleva a una hipogammaglobulinemia (Paul *et al.*, 2018), una disminución del cociente de linfocitos CD4/CD8 y un aumento de las células Th17 pro-inflamatorias que a través de la interleuquina IL-17 generan lesiones óseas (Prabhala *et al.*, 2010). Las células malignas también generan citoquinas como IL-6, IL-10 y TGF- β que alteran la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas y bloquean el desarrollo de linfocitos anti-tumorales (Ratta *et al.*, 2002).

1.6.3. INMUNOTERAPIA EN EL MIELOMA MÚLTIPLE

En el MM se producen alteraciones del sistema inmunitario que tienen como resultado que las células tumorales escapen a la inmunovigilancia (Cho *et al.*, 2017). Las células malignas expresan antígenos tumorales y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de manera disminuida (Kumar *et al.*, 2016) lo que interfiere con la presentación de antígeno y el ataque citolítico de los linfocitos T. Expresan además elevados niveles de PD-L1 (ligando 1 de la muerte celular programada) (Dosani *et al.*, 2015), que contribuye a la reducción de la efectividad de la respuesta citolítica de los linfocitos T. En la médula ósea existe un “ambiente de inmunodepresión”, permitiendo a las células malignas proliferar, migrar y desarrollar resistencia a los tratamientos (Hideshima *et al.*, 2007) (Kawano *et al.*, 2015). En este ambiente inhibitorio participan los macrófagos y las células T reguladoras y son importantes citoquinas como IL-6, M-CSF, IL-10, TGF β , CCL2 y VEGF.

Otro mecanismo de las células plasmáticas neoplásicas para escapar al sistema inmunitario es no presentar moléculas coestimuladoras que forman parte de la sinapsis inmunológica, como las que pertenecen a la familia B7 (Brown *et al.*, 1998).

Existe evidencia científica de que hay una alteración en la función de las células NK (responsables de eliminar las células tumorales), porque tienen una expresión reducida de los receptores activadores como el NKG2D (von Lilienfeld-Toal *et al.*, 2010) (Dosani *et al.*, 2015), y la regulación al alza de PD-1 lo que permite la inhibición de la citotoxicidad NK por la células mielomatosas que expresan PD-L1 (Benson, 2010). De la misma manera las células NK en los pacientes con enfermedad en progresión tienen menor capacidad de producción de IFN- γ (Minnie *et al.*, 2020). El IFN- γ inhibe el crecimiento de las células malignas (Palumbo *et al.*, 1995) y su alteración también altera el funcionamiento de las células T, lo que lleva a la progresión del tumor.

La razón ratio CD4/CD8 también se encuentra alterada en los pacientes con MM (Paul B *et al.*, 2018) y hay autores que defienden que esto puede tener relación con la progresión de la enfermedad (Dosani *et al.*, 2015) (Koike *et al.*, 2002). Estos autores demuestran a su vez que la IL-16, que proviene de las células CD8 activadas e interviene en la quimiotaxis, puede ocasionar la muerte de las células CD4. Un incremento de la ratio razón CD4/CD8 se correlaciona con una mejor respuesta al tratamiento.

La evidencia creciente sugiere que la progresión del mieloma está asociada con la pérdida del control inmunológico que es reflejo de cambios en la diferenciación de las células T, el agotamiento de las células T y un microambiente supresor de la médula ósea (Minnie *et al.*, 2020). Con respecto a las células T reguladoras (CD25, CD127, FoxP3 positivas), su aumento en pacientes con MM podría estar relacionado con respuestas inmunitarias inhibitorias (Dosani *et al.*, 2015).

Las células dendríticas en el mieloma segregan IL-10 que promueve la supervivencia de las células mielomatosas y la progresión del tumor (Minnie *et al.*, 2020).

Los tratamientos basados en inmunoterapia tratan de revertir alguno o varios de los mecanismos reguladores/supresores que favorecen el escape tumoral. Entre estos tratamientos el más extendido en MM son los anticuerpos mono-

clonales frente a moléculas expresadas preferencialmente en células plasmáticas como CD38 o como SLAMF7, que intentan estimular la citotoxicidad tumoral mediada por células NK (Minnie *et al.*, 2020). Algunos de estos anticuerpos son daratumumab y elotuzumab, respectivamente.

Por otro lado, la utilización de anticuerpos monoclonales anti-checkpoint se ha extendido a la práctica clínica de la mayoría de los tumores sólidos y hematopoyéticos. Estos anticuerpos tratan de interrumpir la transmisión de señales inhibitoras desde la célula tumoral a los linfocitos T y células NK. Los más extendidos son los anticuerpos que interfieren en la interacción reguladora PD-1/PD-1L1 como nivolumab y pidilizumab (Berger *et al.*, 2008) o en la interacción CTLA-4/B7 como ipilimumab (Kohrt *et al.*, 2016). En mieloma, el tratamiento con anti-checkpoints obtiene mejores resultados tras el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (Minnie *et al.*, 2018) y se correlaciona con la ausencia de enfermedad mínima residual. Además, puede haber sinergismo cuando los fármacos anti-PD-1 se combinan con daratumumab (Bezman *et al.*, 2018).

Sin embargo, la inmunoterapia de mayor éxito introducida en el tratamiento del MM de los últimos años, ha sido la terapia con linfocitos T portadores de receptores quiméricos (CART) frente a moléculas que se expresada en las células plasmáticas. Los receptores CAR combinan un anticuerpo monoclonal que ese expresa en membrana del linfocito T y reconozca al antígeno de interés (BCMA en MM), con dominios citoplasmáticos de señalización para la activación y proliferación de los linfocitos T (Mikkilineni *et al.*, 2017). No obstante, debido a su elevado coste la utilización de estas terapias fuera de los ensayos clínicos es muy limitada. Sin embargo, los resultados son excepcionalmente buenos, ya que los pacientes alcanzan remisiones completas y duraderas en la mayoría de los casos, con recaídas que pueden aparecer un año después de haber recibido la terapia CART. Actualmente hay dos CART aprobados por la EMA: idecabtagene vicleucel (ide-cel) (mediana de supervivencia libre de progresión de 8,8 meses) y ciltacabtagene autoleucel (cilta-cel) (supervivencia libre de progresión no alcanzada, con un seguimiento de más de dos años).

2. Objetivos y conclusiones

2.1. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo de tesis doctoral ha sido evaluar la aportación que los estudios de citometría de flujo y de hibridación in situ fluorescente (FISH) en muestras de sangre periférica y/o médula ósea pueden ofrecer a la estimación pronóstica de pacientes con neoplasias de células plasmáticas premalignas (MGUS) o malignas (mieloma quiescente o mieloma múltiple) y con ello a su adecuado manejo terapéutico.

Para ello, se han perseguido los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar la capacidad pronóstica del estudio de células plasmáticas de fenotipo aberrante circulantes en sangre periférica, detectadas al diagnóstico mediante citometría de flujo multiparamétrica, en pacientes con neoplasias de células plasmáticas premalignas y malignas.
2. Estimar la capacidad pronóstica del estudio de la tasa proliferativa y apoptótica de las células plasmáticas de médula ósea, cuantificadas en el diagnóstico mediante citometría de flujo multiparamétrica, en pacientes con neoplasias de células plasmáticas premalignas y malignas.
3. Determinar el valor pronóstico independiente de las alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma-1, analizadas mediante FISH, en pacientes con neoplasias de células plasmáticas premalignas y ma-

lignas, en relación a otras alteraciones cromosómicas concurrentes y al tratamiento de los pacientes.

2.2. CONCLUSIONES

2.2.1. ARTÍCULO 1

La detección y cuantificación de células plasmáticas de fenotipo aberrante circulantes en sangre periférica (cPCs) mediante citometría de flujo multiparamétrica es un método rápido, barato y accesible que, con independencia del tratamiento que reciban los pacientes con neoplasias de células plasmáticas (MGUS, mieloma quiescente o mieloma múltiple), permite:

1. Estimar desde el momento del diagnóstico el riesgo de progresión de la enfermedad y de muerte del paciente utilizando exclusivamente parámetros de sangre periférica.
2. Complementar el valor pronóstico de la estimación de riesgo que se aplica de manera estándar en la actualidad y que utiliza parámetros evaluados en médula ósea.
3. El valor pronóstico de este parámetro se mantiene independientemente del tipo de tratamiento, el grado de respuesta que alcance el paciente y de la recaída tras la respuesta completa estricta.

2.2.2. ARTÍCULO 2

La cuantificación mediante citometría de flujo multiparamétrica de las tasas de proliferación y de apoptosis de las células plasmáticas de médula ósea en el momento del diagnóstico en pacientes con neoplasias de células plasmáticas (MGUS, mieloma quiescente o mieloma múltiple), permite:

1. Identificar pacientes con mayor riesgo de progresión o muerte, cuando el ratio proliferación/apoptosis es elevado.
2. Complementar el valor pronóstico de la estimación de riesgo que se aplica de manera estándar en la actualidad.
3. Contribuir a la personalización de la terapia, pues los pacientes con ratio proliferación/apoptosis elevado sólo responden adecuadamente a tratamientos que asocien inhibidores del proteasoma e inmunomoduladores a trasplante de médula ósea autólogo en tandem.
4. El valor pronóstico del ratio proliferación/apoptosis se reduce de manera directamente proporcional al tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y su análisis, por lo que se recomienda trabajar con muestras frescas en las primeras 2 a 4 horas tras la extracción.

2.2.3. ARTÍCULO 3

La determinación de las anomalías numéricas o estructurales del cromosoma-1 mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) en células plasmáticas purificadas de médula ósea en el momento del diagnóstico de pacientes con neoplasias de células plasmáticas (MGUS, mieloma quiescente o mieloma múltiple), tiene un elevado valor pronóstico. Sin embargo, para su correcta interpretación deben tenerse en cuenta las siguientes consideraciones:

1. No todas las anomalías del cromosoma-1 tienen el mismo valor pronóstico, siendo la ganancia de 1q la que muestra, en global, valor pronóstico negativo tanto en la progresión de la enfermedad como en la supervivencia del paciente.
2. En nuestra serie, la ganancia de 1q no aporta valor pronóstico negativo adicional al mal pronóstico asociado a otras alteraciones cromosómicas de alto riesgo como la delección 17p (p53) o la translocación t(4;14) FGFR3/IGH.

3. La ganancia de 1q se asocia fuertemente a otras alteraciones cromosómicas, principalmente y en este orden, a hipodiploidía, hiperdiploidía, translocaciones de IGH diferentes a la t(4;14), delección 13q y delección 17p.
4. El valor pronóstico de la ganancia de 1q depende del tratamiento que reciban los pacientes. Tiene valor pronóstico negativo tanto en la progresión como en la supervivencia en los pacientes que por su edad o condición física no pueden recibir trasplante autólogo de médula ósea. Sin embargo, sólo tiene valor pronóstico negativo en la progresión, pero no en la supervivencia global, de los pacientes que si pueden recibir trasplante.
5. Además del tipo de tratamiento, el valor pronóstico de la ganancia de 1q depende de su asociación con otras alteraciones cromosómicas, así:
 - En pacientes que no pueden recibir trasplante, la hipodiploidía y la ausencia de delección 13q parecen contrarrestar el mal pronóstico de la ganancia de 1q.
 - En pacientes que reciben trasplante, la hiperdiploidía contrarresta el mal pronóstico de la ganancia de 1q.
6. Sin embargo, por si sola y en global, la ganancia de 1q no parece añadir valor pronóstico a la actual clasificación de riesgo, y por tanto, este parámetro deber ser interpretado en relación al tratamiento que recibirá el paciente y a la concurrencia de otras alteraciones cromosómicas.

3. Artículos publicados y enviados

En esta sección se presentan los artículos publicados.

Artículo 1:

1. **Título:** Blood-based risk stratification for pre-malignant and symptomatic plasma cell neoplasms to improve patient management.
2. **Revista:** American Journal of Cancer Research. 2021 Jun 15;11(6):2736-2753.
3. **Autores:** María A. Vasco-Mogorrón, José A. Campillo, Adela Periago, Valentín Cabañas, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Lourdes Gimeno, María F. Soto-Ramírez, María D. Martínez-Hernández, Manuel Muro, Alfredo Minguela.

4. Abstract

Standard risk stratification (sRisk) guides clinical management in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), smoldering multiple myeloma (SMM) and multiple myeloma (MM). Nonetheless, clinical results are considerably heterogeneous among patients with similar risk status. Blood and bone marrow samples from 276 MGUS, 56 SMM and 242 MM in regular clinical practice were analyzed at diagnosis by flow cytometry. Higher levels of aberrant circulating plasma cells (cPC) (> 0.0035% of leukocytes), combined with albumin, beta2-microglobuline and lactate-dehydrogenase levels, offered minimally-invasive risk stratification (RcPC) with results comparable to sRisk. RcPC and sRisk 10-year progression-free-survival (10y-PFS) rates were: 93.8% vs. 95.1% for low-risk,

58 78.4% vs. 81.7% for intermediate-risk and 50.0% vs. 47.8% for high-risk MGUS; 58.3% vs. 57.8% low-risk, 44.4% vs. 45.8% intermediate-risk and 8.9% vs. 15.0% high-risk SMM; and 44.4% vs. 44.4% low-risk, 36.1% vs. 36.8% intermediate-risk, and 13.3% vs. 16.2% high-risk MM. Circulating-PC > 0.0035% vs. cPC<0.0035% was an independent prognostic factor for PFS (HR=4.389, P=1.2×10⁻¹⁵, Harrell C-statistic =0.7705±0.0190) and over-all survival (OS, HR=4.286, 2.3×10⁻⁹, Harrell C-statistic =0.8225±0.0197) that complemented sRisk in patients with low-sRisk (10y-PFS rates 48.1% vs. 87.3%, P=1.2×10⁻⁸) and intermediate-sRisk (10y-PFS rates 28.9% vs. 74.1%, P=8.6×10⁻¹²). Patients with high cPCs values are associated with higher proliferation and lower apoptosis rates of PC. Circulating-PC > 0.0035% identified MGUS, SMM and MM patients at higher risk of progression or death and predicted a cohort of patients that after relapse from stringent complete response showed shorter OS. These patients could benefit from early consolidation therapy, tandem ASCT or intensive maintenance.

Keywords: Plasma cell neoplasms, MGUS, SMM, MM, circulating plasma cells, risk stratification

5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8263680/>

Artículo 2:

1. **Título:** Proliferation to Apoptosis Tumor Cell Ratio as a Biomarker to Improve Clinical Management of Pre-Malignant and Symptomatic Plasma Cell Neoplasms.
2. **Revista:** International Journal of Molecular Sciences. 2021 Apr 9;22(8):3895.
3. **Autores:** María A. Vasco-Mogorrón, José A. Campillo, Adela Periago, Valentín Cabañas, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Lourdes Gimeno,

María F. Soto-Ramírez, María D. Martínez-Hernández, Manuel Muro, Alfredo Minguela.

4. Abstract

Proliferation and apoptosis of neoplastic cells are prognostic biomarkers in plasma cell neoplasms (PCNs). The prognostic capacity of proliferation to apoptosis ratio (Ratio-PA) in the era of immunomodulatory treatments is re-evaluated in 316 gammopathy of undetermined significance (MGUS), 57 smoldering multiple myeloma (SMM), and 266 multiple myeloma (MM) patients. Ratio-PA of 0.77 ± 0.12 , 1.94 ± 0.52 , and 11.2 ± 0.7 ($p < 0.0001$) were observed in MGUS, SMM, and MM patients. Ten-year overall survival (10y-OS) rates for patients with low/high Ratio-PA were 93.5%/77.3% ($p < 0.0001$) for MGUS, 82.5%/64.7% ($p < 0.05$) for SMM, and 62.3%/47.0% ($p < 0.05$) for MM. For patients with low, intermediate, and high risk, 10y-OS for low/high Ratio-PA were 95.5%/72.9% ($p < 0.0001$), 74.2%/50.4% ($p < 0.0001$), and 35.3%/20.0% ($p = 0.836$), respectively. Ratio-PA was an independent prognostic factor for OS (HR = 2.119, $p < 0.0001$, Harrell-C-statistic = 0.7440 ± 0.0194) when co-analyzed with sex, age, and standard risk. In patients with Ratio-PA^{high}, only first-line therapy with VRd/VTd, but not PAD/VCD, coupled with ASCT was associated with high 10y-OS (82.7%). Tumor cell Ratio-PA estimated at diagnosis offers a prognostic biomarker that complements standard risk stratification and helps to guide the clinical management of pre-malignant and symptomatic PCNs. Every effort should be made to provide first-line therapies including VTd or VRd associated with ASCT to patients with Ratio-PA^{high} at higher risk of progression and death.

Keywords: plasma cell neoplasm, MGUS, SMM, MM, treatment, proliferation, apoptosis

5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33918790/>

Artículo 3:

1. **Título:** Predictive value of 1q21 gain in multiple myeloma is strongly dependent on concurrent cytogenetic abnormalities and first-line treatment.
2. **Revista:** American Journal of Cancer Research. 2021 Sep 15;11(9):4438-4454.
3. **Autores:** Alfredo Minguela, María A. Vasco-Mogorrón, José A. Campillo, Valentín Cabañas, María J. Remigia, Mercedes Berenguer, María C. García-Garay, Miguel Blanquer, Catalina Cava, José Antonio Galian, Lourdes Gimeno, María F. Soto-Ramírez, María D. Martínez-Hernández, Javier de la Rubia, Ana I. Teruel, Manuel Muro, Adela Periago.

4. Abstract

Improved therapies in multiple myeloma (MM) have forced a constant risk stratification update, first Durie-Salmon, then international scoring systems (ISS), next revised-ISS (RISS) including high-risk cytogenetic abnormalities (HRCAs) such as del(17p) and t(4;14), and now R2-ISS including 1q21 gain has been proposed. Predictive value of 1q21 gain by itself or in concurrence with other cytogenetic abnormalities is evaluated in 737 real-world plasma cell neoplasm (PCN) patients under current therapies. Ten-year progression-free survival (10y-PFS) rates for patients with 2, 3 and >3 copies of 1q21 were 72.2%, 42.5% and 43.4% ($P < 1.1 \times 10^{-17}$). Cox regression analysis confirmed that 1q21 gain was an independent prognostic factor for PFS (HR=1.804, $P < 0.0001$, Harrell C-statistic = 0.7779 ± 0.01495) but not for OS ($P = 0.131$). Gain of 1q21 was strongly associated with hypodiploidy (38.8% vs. 7.0%, $P = 1.3 \times 10^{-22}$), hyperdiploidy (44.1% vs. 16.4%, $P = 1.6 \times 10^{-13}$), HRCAs (12.6% vs. 3.5%, 1.8×10^{-5}), IGH breaks (12.3% vs. 2.1%, $P = 2.1 \times 10^{-7}$) and del(13q) (8.0% vs. 4.0%, $P = 0.031$). In our series, 1q21 gain by itself did not improve RISS predictive capacity in patients either eligible or ineligible for autologous stem cell transplantation (ASCT). However, compared with patients with other 1q21 gains: concurrence with hyperdiploidy improved the prognosis of ASCT-eligible patients from 62.5% to 96.0% 10-year overall-survival (10y-OS, $P < 0.002$); concurrence with hypodiploidy improved the prognosis of ASCT-ineligible patients from 35.7% to 71.0% ($P = 0.013$); and concurrence with del(13q) worsened the

prognosis of ASCT-ineligible patients from 12.5% to 53.4% (P=0.035). Gain of 1q21 should be patient-wisely evaluated, irrespective of the RISS, considering its concurrence with other cytogenetic abnormalities and eligibility for ASCT.

Keywords: High-risk cytogenetic abnormalities, 1q21 gain, del(17p), t(4;14), plasma cell neoplasm, multiple myeloma, autologous stem cell transplantation, immunomodulatory and proteasome inhibitor treatments

5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8493371/>

Bibliografía

1. Abul K. Abbas *et al.* *Inmunología Básica: Funciones y trastornos del sistema inmunitario*, 2014, Elsevier.
2. Akhtar S, Ali TA, Faiyaz A, Khan OS, Raza SS, Kulinski M, Omri HE, Bhat AA, Uddin S. Cytokine-Mediated Dysregulation of Signaling Pathways in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 15; 21(14): 5002.
3. Aksenova AY, Zhuk AS, Lada AG, Zotova IV, Stepchenkova EI, Kostroma II, Gritsaev SV, Pavlov YI. Genome Instability in Multiple Myeloma: Facts and Factors. *Cancers (Basel).* 2021 Nov 26; 13(23): 5949.
4. Aktas Samur A, Minvielle S, Shamma M, Fulciniti M, Magrangeas F, Richardson PG, Moreau P, Attal M, Anderson KC, Parmigiani G, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Samur MK. Deciphering the chronology of copy number alterations in Multiple Myeloma. *Blood Cancer J.* 2019 Mar 26; 9(4): 39.
5. Alanazi F, Kwa FAA, Burchall G, Jackson DE. New generation drugs for treatment of multiple myeloma. *Drug Discov Today* 2020; 25(2): 367-379.
6. Aljama MA, Sidiqi MH, Lakshman A, Dispenzieri A, Jevremovic D, Gertz MA, Lacy MQ, Buadi FK, Dingli D, Muchtar E, Fonder AL, Hayman SR, Hobbs MA, Gonsalves WI, Warsame R, Kourelis TV, Hwa YL, Kapoor P, Leung N, Go RS, Kyle RA, Rajkumar SV, Kumar SK. Plasma cell proliferative index is an independent predictor of progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Adv.* 2018 Nov 27; 2(22): 3149-3154.
7. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M,

- Grosbois B, Guillermin G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Inter-groupe Francophone du Myélome. *Blood*. 2007 Apr 15; 109(8): 3489-3495.
8. Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L, Caillot D, Hulin C, Marit G, Stoppa AM, Voilhat L, Wetterwald M, Pegourie B, Voog E, Tiab M, Banos A, Jaubert J, Bouscary D, Macro M, Kolb B, Traulle C, Mathiot C, Magrangeas F, Minvielle S, Facon T, Moreau P. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *J Clin Oncol*. 2012 Jun 1; 30(16): 1949-1952.
 9. Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, Attal M, Gutierrez N, Haessler J, *et al*. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia*. 2013 Mar; 27(3): 711-717.
 10. Barilà G, Bonaldi L, Grassi A, Martines A, Liço A, Macrì N, Nalio S, Pavan L, Berno T, Branca A, Calabretto G, Carrino M, Teramo A, Manni S, Piazza F, Semenzato G, Zambello R. Identification of the true hyperdiploid multiple myeloma subset by combining conventional karyotyping and FISH analysis. *Blood Cancer J*. 2020 Feb 17; 10(2): 18.
 11. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M, Koren-Michowitz M, Shimoni A, Nagler A. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008 May 15; 14(10): 3044-3051.
 12. Bezman NA, *et al*. Abstract 1727: Antitumor activity associated with dual targeting of CD38 and programmed death-1 (PD-1) pathways in preclinical models. *Cancer Res*. 2018; 78 (suppl 13): 1727.
 13. Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, Witzig TE, Kumar S, Dispenzieri A, Morice WG, Rajkumar SV. High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013 Mar; 27(3): 680-685.
 14. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015 May 14; 125(20): 3049-3058.

15. Bladé J, Bruno B, Mohty M. Multiple Myeloma. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 80.
16. Bock F, Lu G, Srour SA, Gaballa S, Lin HY, Baladandayuthapani V, Honhar M, Stich M, Shah ND, Bashir Q, Patel K, Popat U, Hosing C, Korbling M, Delgado R, Rondon G, Shah JJ, Thomas SK, Manasanch EE, Isermann B, Orłowski RZ, Champlin RE, Qazilbash MH. Outcome of Patients with Multiple Myeloma and CKS1B Gene Amplification after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Dec; 22(12): 2159-2164.
17. Brown RD, Pope B, Yuen E, Gibson J, Joshua DE. The expression of T cell related costimulatory molecules in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31(3-4): 379-384.
18. Castillo JJ, Mull N, Reagan JL, Nembr S, Mitri J. Increased incidence of non-Hodgkin lymphoma, leukemia, and myeloma in patients with diabetes mellitus type 2: a meta-analysis of observational Studies. *Blood*. 2012 May 24; 119(21): 4845-4850.
19. Cavo M, Tosi P, Zamagni E, Cellini C, Tacchetti P, Patriarca F, Di Raimondo F, Volpe E, Ronconi S, Cangini D, Narni F, Carubelli A, Masini L, Catalano L, Fiacchini M, de Vivo A, Gozzetti A, Lazzaro A, Tura S, Baccarani M. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 10; 25(17): 2434-2441.
20. Chakraborty R, Muchtar E, Kumar SK, Jevremovic D, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Hayman SR, Hogan WJ, Kapoor P, Lacy MQ, Leung N, Gertz MA. Risk stratification in myeloma by detection of circulating plasma cells prior to autologous stem cell transplantation in the novel agent era. *Blood Cancer J*. 2016 Dec 16; 6(12): e512.
21. Chakraborty R, Muchtar E, Kumar SK, Jevremovic D, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Hayman SR, Hogan WJ, Kapoor P, Lacy MQ, Leung N, Gertz MA. Serial measurements of circulating plasma cells before and after induction therapy have an independent prognostic impact in patients with multiple myeloma undergoing up-front autologous transplantation. *Haematologica*. 2017 Aug; 102(8): 1439-1445.
22. Chang ET, Delzell E. Systematic review and meta-analysis of glyphosate exposure and risk of lymphohematopoietic cancers. *J Environ Sci Health B*. 2016; 51(6): 402-434.

23. Chan NC, Chan NP. Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Methods Mol Biol.* 2017; 1541: 295-302.
24. Charlot-Lambrecht I, Salmon J-H, Gagneux-Lemoussu L, Brochot P, Eschard J-P. Mieloma múltiple. *EMC - Apar Locomot.* 2012; 45: 1-13.
25. Chawla SS, Kumar SK, Dispenzieri A, Greenberg AJ, Larson DR, Kyle RA, Lacy MQ, Gertz MA, Rajkumar SV. Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2015 Jul; 95(1): 57-64.
26. Cheung MC, Pantanowitz L, Dezube BJ. AIDS-related malignancies: emerging challenges in the era of highly active antiretroviral therapy. *Oncologist.* 2005 Jun-Jul; 10(6): 412-426.
27. Cho SF, Lin L, Xing L, Yu T, Wen K, Anderson KC, Tai YT. Monoclonal Antibody: A New Treatment Strategy against Multiple Myeloma. *Antibodies (Basel).* 2017 Nov 14; 6(4): 18.
28. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleynen A, Yon E, Hulin C, Leleu X, Orsini-Piocelle F, Blade JS, Sohn C, Karlin L, Delbrel X, Hebraud B, Roussel M, Marit G, Garderet L, Mohty M, Rodon P, Voillat L, Royer B, Jaccard A, Belhadj K, Fontan J, Caillot D, Stoppa AM, Attal M, Facon T, Moreau P, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood.* 2015 Dec 17; 126(25): 2713-2719.
29. Cook G, Ashcroft AJ, Cairns DA, Williams CD, Brown JM, Cavenagh JD, Snowden JA, Parrish C, Yong K, Cavet J, Hunter H, Bird JM, Pratt G, Chown S, Heartin E, O'Connor S, Drayson MT, Hockaday A, Morris TC; National Cancer Research Institute Haemato-oncology Clinical Studies Group. The effect of salvage autologous stem-cell transplantation on overall survival in patients with relapsed multiple myeloma (final results from BSBMT/UKMF Myeloma X Relapse [Intensive]): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2016 Jul; 3(7): e340-e351.
30. Corre J, Munshi N, Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? *Blood.* 2015 Mar 19; 125(12): 1870-1876.
31. Cosemans C, Oben B, Arijs I, Daniëls A, Declercq J, Vanhees K, Froyen G, Maes B, Mebis J, Rummens JL. Prognostic Biomarkers in the Progression From MGUS to Multiple Myeloma: A Systematic Review. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018 Apr; 18(4): 235-248.

32. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, Picken E, Santana-Dávila R, González-Paz N, Winkler JM, Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, Lust JA, Greipp PR, Fonseca R. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*. 2003 Feb; 17(2): 427-436.
33. Dhodapkar MV, Sexton R, Waheed S, Usmani S, Papanikolaou X, Nair B, Petty N, Shaughnessy JD Jr, Hoering A, Crowley J, Orlowski RZ, Barlogie B. Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood*. 2014 Jan 2; 123(1): 78-85.
34. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G, Delforge M, Hájek R, Schjesvold F, Cavo M, Goldschmidt H, Facon T, Einsele H, Boccadoro M, San-Miguel J, Sonneveld P, Mey U. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2021 Mar; 32(3): 309-322.
35. Dingli D, Nowakowski GS, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Rajkumar SV, Greipp PR, Litzow MR, Gastineau DA, Witzig TE, Gertz MA. Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system. *Blood*. 2006 Apr 15; 107(8): 3384-3388.
36. Dingli D, Ailawadhi S, Bergsagel PL, Buadi FK, Dispenzieri A, Fonseca R, *et al*. Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy. *Mayo Clin Proc*. 2017 Apr; 92(4): 578-598.
37. Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA, Fonseca R, Lacy MQ, Bergsagel PL, Kyle RA, Greipp PR, Witzig TE, Reeder CB, Lust JA, Russell SJ, Hayman SR, Roy V, Kumar S, Zeldenrust SR, Dalton RJ, Stewart AK. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement. *Mayo Clin Proc*. 2007 Mar; 82(3): 323-341.
38. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep; 26(9): 1908-1975.

39. Dores GM, Landgren O, McGlynn KA, Curtis RE, Linet MS, Devesa SS. Plasmacytoma of bone, extramedullary plasmacytoma, and multiple myeloma: incidence and survival in the United States, 1992-2004. *Br J Haematol.* 2009 Jan; 144(1): 86-94.
40. Dosani T, Carlsten M, Maric I, Landgren O. The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of myeloma [corrected] and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J.* 2015; Apr 17; 5(4): e306.
41. D'Agostino M, *et al.* A New Risk Stratification Model (R2-ISS) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Analysis of Mature Data from 7077 Patients Collected By European Myeloma Network within Harmony Big Data Platform. *Blood.* 2020 136(Supplement 1): 34-37.
42. Fauriat C, Mallet F, Olive D, Costello RT. Impaired activating receptor expression pattern in natural killer cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2006 Apr; 20(4): 732-733.
43. Fillmore NR, Yellapragada SV, Ifeora C, Mehta A, Cirstea D, White PS, Rivero G, Zimolzak A, Pyarajan S, Do N, Brophy M, Munshi NC. With equal access, African American patients have superior survival compared to white patients with multiple myeloma: a VA study. *Blood.* 2019 Jun 13; 133(24): 2615-2618.
44. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, van der Velden VHJ, Pérez-Morán JJ, Vidriales MB, García-Sanz R, Jimenez C, González M, Martínez-López J, Corral-Mateos A, Grigore GE, Fluxá R, Pontes R, Caetano J, Sedek L, Del Cañizo MC, Bladé J, Lahuerta JJ, Aguilar C, Báez A, García-Mateo A, Labrador J, Leoz P, Aguilera-Sanz C, San-Miguel J, Mateos MV, Durie B, van Dongen JJM, Orfao A. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017 Oct; 31(10): 2094-2103.
45. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood.* 2003 Jun 1; 101(11): 4569-4575.
46. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-

- Loiseau H; International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009 Dec; 23(12): 2210-2221.
47. Giri S, Grimshaw A, Bal S, Godby K, Kharel P, Djulbegovic B, Dimopoulos MA, Facon T, Usmani SZ, Mateos MV, Costa LJ. Evaluation of Daratumumab for the Treatment of Multiple Myeloma in Patients With High-risk Cytogenetic Factors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2020 Nov 1; 6(11): 1759-1765.
48. Gonsalves WI, Morice WG, Rajkumar V, Gupta V, Timm MM, Dispenzieri A, Buadi FK, Lacy MQ, Singh PP, Kapoor P, Gertz MA, Kumar SK. Quantification of clonal circulating plasma cells in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2014 Nov; 167(4): 500-505.
49. Gonsalves WI, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Dingli D, Timm MM, Morice WG, Lacy MQ, Buadi FK, Go RS, Leung N, Kapoor P, Hayman SR, Lust JA, Russell SJ, Zeldenrust SR, Hwa L, Kourelis TV, Kyle RA, Gertz MA, Kumar SK. Quantification of circulating clonal plasma cells via multiparametric flow cytometry identifies patients with smoldering multiple myeloma at high risk of progression. *Leukemia*. 2017 Jan; 31(1): 130-135.
50. Gonsalves WI, Buadi FK, Ailawadhi S, Bergsagel PL, Chanan Khan AA, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, Hayman SR, Kapoor P, Kourelis TV, Lacy MQ, Larsen JT, Muchtar E, Reeder CB, Sher T, Stewart AK, Warsame R, Go RS, Kyle RA, Leung N, Lin Y, Lust JA, Russell SJ, Zeldenrust SR, Fonder AL, Hwa YL, Hobbs MA, Mayo AA, Hogan WJ, Rajkumar SV, Kumar SK, Gertz MA, Roy V. Utilization of hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus statement. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Mar; 54(3): 353-367.
51. Grzasko N, Hus M, Pluta A, Jurczynszyn A, Walter-Croneck A, Morawska M, Chocholska S, Hajek R, Dmoszynska A. Additional genetic abnormalities significantly worsen poor prognosis associated with 1q21 amplification in multiple myeloma patients. *Hematol Oncol*. 2013 Mar; 31(1): 41-48.
52. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M, Sawyer JR, Hollmig K, Zangari M, Pineda-Roman M, van Rhee F, Cavallo F, Burington B, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from

- MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 2006 Sep 1; 108(5): 1724-1732.
53. Hemminki K, Liu X, Ji J, Försti A. Origin of B-cell neoplasms in autoimmune disease. *Plos one*. 2016 Jun; 11(6): e0158360.
54. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007 Aug; 7(8): 585-598.
55. Hillengass J, Usmani S, Rajkumar SV, Durie BGM, Mateos MV, Lonial S, Joao C, Anderson KC, García-Sanz R, Riva E, Du J, van de Donk N, Berdeja JG, Terpos E, Zamagni E, Kyle RA, San Miguel J, Goldschmidt H, Giralt S, Kumar S, Raje N, Ludwig H, Ocio E, Schots R, Einsele H, Schjesvold F, Chen WM, Abildgaard N, Lipe BC, Dytfeld D, Wirk BM, Drake M, Cavo M, Lahuerta JJ, Lentzsch S. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *Lancet Oncol*. 2019 Jun; 20(6): e302-e312.
56. Holstein SA, McCarthy PL. Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience. *Drugs*. 2017 Apr; 77(5): 505-520.
57. Huang SY, Yao M, Tang JL, Lee WC, Tsay W, Cheng AL, Wang CH, Chen YC, Shen MC, Tien HF. Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan: increasing incidence for the past 25 years and higher prevalence of extramedullary myeloma in patients younger than 55 years. *Cancer*. 2007 Aug 15; 110(4): 896-905.
58. Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Görgün GT, Roccaro AM, Anderson KC, Ghobrial IM. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev*. 2015 Jan; 263(1): 160-172.
59. Kim J, Denu RA, Dollar BA, Escalante LE, Kuether JP, Callander NS, Asimakopoulos F, Hematti P. Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Br J Haematol*. 2012 Aug; 158(3): 336-346.
60. Kohrt HE, Tumei PC, Benson D, Bhardwaj N, Brody J, Formenti S, Fox BA, Galon J, June CH, Kalos M, Kirsch I, Kleen T, Kroemer G, Lanier L, Levy R, Lyerly HK, Maecker H, Marabelle A, Melenhorst J, Miller J, Melero I, Odunsi K, Palucka K, Peoples G, Ribas A, Robins H, Robinson W, Serafini T, Sondel P, Vivier E, Weber J, Wolchok J, Zitvogel L, Disis ML, Cheever MA; Cancer Immunotherapy Trials Network (CITN). Immunodynamics: a cancer immunotherapy trials network review of

- immune monitoring in immuno-oncology clinical trials. *J Immunother Cancer*. 2016 Mar 15; 4:15.
61. Koike M, Sekigawa I, Okada M, Matsumoto M, Iida N, Hashimoto H, *et al*. Relationship between CD4(+)/CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. *Leuk Res*. 2002; 26(8): 705–711.
 62. Kumar S, Rajkumar SV, Kyle RA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Lust JA, Gertz MA, Greipp PR, Witzig TE. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 20; 23(24): 5668-5674.
 63. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, Gertz MA, Greipp PR, Hayman SR, Kyle RA, Lacy MQ, Lust JA, Reeder CB, Roy V, Russell SJ, Short KE, Stewart AK, Witzig TE, Zeldenrust SR, Dalton RJ, Rajkumar SV, Bergsagel PL. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clin Proc*. 2009 Dec; 84(12): 1095-1110.
 64. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, Kapoor P, Dingli D, Hayman SR, Leung N, Lust J, McCurdy A, Russell SJ, Zeldenrust SR, Kyle RA, Rajkumar SV. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014 May; 28(5): 1122-1128.
 65. Kumar SK, Anderson KC. Immune Therapies in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2016 Nov 15; 22(22): 5453-5460.
 66. Kuriyama H, Lamborn KR, O'Fallon JR, Iturria N, Sebo T, Schaefer PL, Scheithauer BW, Buckner JC, Kuriyama N, Jenkins RB, Israel MA. Prognostic significance of an apoptotic index and apoptosis/proliferation ratio for patients with high-grade astrocytomas. *Neuro Oncol*. 2002 Jul; 4(3): 179-186.
 67. Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1980 Jun 12; 302(24): 1347-1349.
 68. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, *et al*. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78(1): 21-33.

69. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR *et al.* Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2006 Mar 30; 354(13): 1362-1369.
70. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Larson DR, Plevak MF, Jelinek DF, Fonseca R, Melton LJ 3rd, Rajkumar SV. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007 Jun 21; 356(25): 2582-2590.
71. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR, Rajkumar SV. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med.* 2018 Jan 18; 378(3): 241-249.
72. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia.* 2009 Oct; 23(10): 1691-1697.
73. Leung TW, Xue WC, Cheung AN, Khoo US, Ngan HY. Proliferation to apoptosis ratio as a prognostic marker in adenocarcinoma of uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2004 Mar; 92(3): 866-872.
74. Leung N, Bridoux F, Batuman V, Chaidos A, Cockwell P, D'Agati VD, Dispenzieri A, Fervenza FC, Fervenza JP, Gibbs S, Gillmore JD, Herrera GA, Jaccard A, Jevremovic D, Kastiris E, Kukreti V, Kyle RA, Lachmann HJ, Larsen CP, Ludwig H, Markowitz GS, Merlini G, Mollee P, Picken MM, Rajkumar VS, Royal V, Sanders PW, Sethi S, Venner CP, Voorhees PM, Wechalekar AD, Weiss BM, Nasr SH. The evaluation of monoclonal gammopathy of renal significance: a consensus report of the International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jan; 15(1): 45-59.
75. von Lilienfeld-Toal M, Frank S, Leyendecker C, Feyler S, Jarmin S, Morgan R, Glasmacher A, Märten A, Schmidt-Wolf IG, Brossart P, Cook G. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Jun; 59(6): 829-839.
76. Lionetti M, Neri A. Utilizing next-generation sequencing in the management of multiple myeloma. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017 Jul; 17(7): 653-663.

77. Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun; 7(6): 1716-1723.
78. Liu T, Xu QE, Zhang CH, Zhang P. Occupational exposure to methylene chloride and risk of cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 2013 Dec; 24(12): 2037-2049.
79. Madan S, Kyle RA, Greipp PR. Plasma cell labeling index in the evaluation of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2010 Mar; 85(3): 300.
80. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Feb; 14(2): 100-113.
81. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L, Rosiñol L, Paiva B, Palomera L, Bargay J, Oriol A, Prosper F, López J, Olavarría E, Quintana N, García JL, Bladé J, Lahuerta JJ, San Miguel JF. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2013 Aug 1; 369(5): 438-447.
82. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, Dispenzieri A, Fonseca R, Sher T, Kyle RA, Lin Y, Russell SJ, Kumar S, Bergsagel PL, Zeldenrust SR, Leung N, Drake MT, Kapoor P, Ansell SM, Witzig TE, Lust JA, Dalton RJ, Gertz MA, Stewart AK, Rajkumar SV, Chanan-Khan A, Lacy MQ; Mayo Clinic. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc.* 2013 Apr; 88(4): 360-76.
83. Minarík J, Scudla V, Ordeltová M, Bacovský J, Zemanová M. Evaluation of plasma cell propidium-iodide and annexin-V indices: their relation to prognosis in multiple myeloma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005 Dec; 149(2): 271-274.
84. Minarik J, Scudla V, Ordeltova M, Pika T, Bacovsky J, Steinbach M, Kumar V, Van Ness B. Combined measurement of plasma cell proliferative and apoptotic index in multiple myeloma defines patients with good and poor prognosis. *Leuk Res.* 2011 Jan; 35(1): 44-48.
85. Minnie SA, Kuns RD, Gartlan KH, Zhang P, Wilkinson AN, Samson L, Guillerey C, Engwerda C, MacDonald KPA, Smyth MJ, Markey KA, Vuckovic S, Hill GR. My-

- eloma escape after stem cell transplantation is a consequence of T-cell exhaustion and is prevented by TIGIT blockade. *Blood*. 2018 Oct 18; 132(16): 1675-1688.
86. Minnie SA, Hill GR. Immunotherapy of multiple myeloma. *J Clin Invest*. 2020 Apr 1; 130(4): 1565-1575.
87. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 29; 99(22): 14374-14379.
88. Montefusco V, Galli M, Maisnar V, Gamberi B, Hansson M, Belotti A, Pour L, Ypma P, Grasso M, Croockewit A, Ballanti S, Offidani M, Vincelli ID, Zambello R, Liberati AM, Andersen NF, Broijl A, Troia R, Pascarella A, Benevolo G, Levin MD, Bos G, Ludwig H, Aquino S, Morelli AM, Wu KL, Boersma R, Hajek R, Durian M, von dem Borne PA, Caravita di Toritto T, Zander T, Driessen C, Specchia G, Waage A, Gimsing P, Mellqvist UH, van Marwijk Kooy M, Minnema M, Mandigers C, Cafro AM, Palmas A, Carvalho S, Spencer A, Boccadoro M, Sonneveld P. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib-melphalan-prednisone, with or without bortezomib-lenalidomide-dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Haematol*. 2020 Jun; 7(6): e456-e468.
89. Moreau P, Attal M, Hulin C, Arnulf B, Belhadj K, Benboubker L, Béné MC, Broijl A, Caillon H, Caillot D, Corre J, Delforge M, Dejoie T, Doyen C, Facon T, Sonntag C, Fontan J, Garderet L, Jie KS, Karlin L, Kuhnowski F, Lambert J, Leleu X, Lenain P, Macro M, Mathiot C, Orsini-Piocelle F, Perrot A, Stoppa AM, van de Donk NW, Wuilleme S, Zweegman S, Kolb B, Touzeau C, Roussel M, Tiab M, Marolleau JP, Meuleman N, Vekemans MC, Westerman M, Klein SK, Levin MD, Feraud JP, Escoffre-Barbe M, Eveillard JR, Garidi R, Ahmadi T, Zhuang S, Chiu C, Pei L, de Boer C, Smith E, Deraedt W, Kampfenkel T, Schechter J, Vermeulen J, Avet-Loiseau H, Sonneveld P. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019 Jul 6; 394(10192): 29-38.
90. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ, Lust JA, Dispenzieri A, Greipp PR, Kyle RA, Rajkumar SV. Circulating plasma cells detected

- by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2005 Oct 1; 106(7): 2276-2279.
91. Nucci M, Anaissie E. Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents. *Clin Infect Dis*. 2009 Oct 15; 49(8): 1211-1225.
92. Oancea M, Mani A, Hussein MA, Almasan A. Apoptosis of multiple myeloma. *Int J Hematol*. 2004 Oct; 80(3): 224-231.
93. Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, Mateo G, López A, Rasillo A, Vídriales MB, López-Berges MC, Miguel JF, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010 Jul; 78(4): 239-252.
94. Paiva B, Gutiérrez NC, Chen X, Vídriales MB, Montalbán MÁ, Rosiñol L, Oriol A, Martínez-López J, Mateos MV, López-Corral L, Díaz-Rodríguez E, Pérez JJ, Fernández-Redondo E, de Arriba F, Palomera L, Bengoechea E, Terol MJ, de Paz R, Martín A, Hernández J, Orfao A, Lahuerta JJ, Bladé J, Pandiella A, Miguel JF; GEM (Grupo Español de Mieloma)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2012 Aug; 26(8): 1862-1869.
95. Paiva B, Paino T, Sayagues JM, Garayoa M, San-Segundo L, Martín M, Mota I, Sanchez ML, Bárcena P, Aires-Mejia I, Corchete L, Jimenez C, Garcia-Sanz R, Gutierrez NC, Ocio EM, Mateos MV, Vidriales MB, Orfao A, San Miguel JF. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*. 2013 Nov 21; 122(22): 3591-3598.
96. Palumbo A, Bruno B, Boccadoro M, Pileri A. Interferon-gamma in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1995; 18(3-4): 215-219.
97. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011 Mar 17; 364(11): 1046-1060.
98. Palumbo A, Hajek R, Delforge M, Kropff M, Petrucci MT, Catalano J, Gisslinger H, Wiktor-Jędrzejczak W, Zodelava M, Weisel K, Cascavilla N, Iosava G, Cavo M, Kloczko J, Bladé J, Beksac M, Spicka I, Plesner T, Radke J, Langer C, Ben Yehuda D,

- Corso A, Herbein L, Yu Z, Mei J, Jacques C, Dimopoulos MA; MM-015 Investigators. Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012 May 10; 366(19): 1759-1769.
99. Pardanani A, Witzig TE, Schroeder G, McElroy EA, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA, Rajkumar SV. Circulating peripheral blood plasma cells as a prognostic indicator in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood*. 2003 Feb 1; 101(3): 827-830.
100. Parrinello N, Romano A, Conticello C, Cavalli M, La Fauci A, Rizzo G, La Cava P, Chiarenza A, Tibullo D, Giallongo C, Palumbo GA, Di Raimondo F. Neutrophils Of Multiple Myeloma Are Dysfunctional and Immunosuppressive. *Blood*. 2013 Nov; 122(21): 3138.
101. Patel AV, Hildebrand JS, Campbell PT, Teras LR, Craft LL, McCullough ML, Gapsur SM. Leisure-Time Spent Sitting and Site-Specific Cancer Incidence in a Large U.S. Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015 Sep; 24(9): 1350-1359.
102. Paul B, Kang S, Zheng Z, Kang Y. The challenges of checkpoint inhibition in the treatment of multiple myeloma. *Cell Immunol*. 2018 Dec; 334: 87-98.
103. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martín-Nuñez G, Alonso JM, de Las Heras N, Hernández JM, Martín A, López-Berges C, Orfao A, San Miguel JF. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007 Oct 1; 110(7): 2586-2592.
104. Periago A, Campillo JA, Mrowiec A, Gimeno L, Montes NR, Martínez-Sánchez MV, Cabañas-Perianes V, García-Garay C, Bolarin JM, Blasco-Mogorrón A, Muro M, Berenguer M, Moraleda JM, García-Alonso AM, Minguela A. Circulating aberrant plasma cells allows risk stratification of patients with myeloma. *Am J Hematol*. 2016 Sep; 91(9): E353-E355.
105. Pinto V, Bergantim R, Caires HR, Seca H, Guimarães JE, Vasconcelos MH. Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 10; 12(2): 407.
106. Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, Prabhala HK, Nanjappa P, Song W, Pai C, Amin S, Tai YT, Richardson PG, Ghobrial IM, Treon SP, Daley JF, Anderson KC, Kutok JL,

- Munshi NC. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood*. 2010 Jul; 115(26): 5385-5392.
107. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J*. 2015 Oct 30; 5(10): e365.
108. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014 Oct; 89(10): 999-1009.
109. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastiris E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014 Nov; 15(12): e538-48.
110. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2018 Aug 16; 93(8): 981-1114.
111. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020 May; 95(5): 548-567.
112. Rajkumar, S.V.; Kumar, S. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J*. 2020; 10: 94.
113. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 2002 Jul 1; 100(1): 230-237.
114. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE; European Myeloma Network. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008 Mar; 93(3): 431-438.

115. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Garcés JJ, Paiva B, Puig N, García-Mateo A, García-Sánchez O, Corral-Mateos A, Burgos L, Blanco E, Hernández-Martín J, Pontes R, Díez-Campelo M, Millacoy P, Rodríguez-Otero P, Prosper F, Merino J, Vidriales MB, García-Sanz R, Romero A, Palomera L, Ríos-Tamayo R, Pérez-Andrés M, Blanco JF, González M, van Dongen JJM, Durie B, Mateos MV, San-Miguel J, Orfao A; Euro-Flow consortium. Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC). *Blood Cancer J*. 2018 Nov 19; 8(12): 117.
116. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Puig N, Contreras-Sanfeliciano T, Pontes R, Corral-Mateos A, García-Sánchez O, Díez-Campelo M, Pessoa de Magalhães RJ, García-Martín L, Alonso-Alonso JM, García-Mateo A, Aguilar-Franco C, Labrador J, Barez-García A, Maiolino A, Paiva B, San Miguel J, Sobral da Costa E, González M, Mateos MV, Durie B, van Dongen JJM, Orfao A. Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy. *Blood*. 2019 Dec 12; 134(24): 2218-2222.
117. Schinasi LH, Brown EE, Camp NJ, Wang SS, Hofmann JN, Chiu BC, Miligi L, Beane Freeman LE, de Sanjose S, Bernstein L, Monnereau A, Clavel J, Tricot GJ, Atanackovic D, Cocco P, Orsi L, Dosman JA, McLaughlin JR, Purdue MP, Cozen W, Spinelli JJ, de Roos AJ. Multiple myeloma and family history of lymphohaematopoietic cancers: Results from the International Multiple Myeloma Consortium. *Br J Haematol*. 2016 Oct; 175(1): 87-101.
118. Schmidt TM, Barwick BG, Joseph N, Heffner LT, Hofmeister CC, Bernal L, Dhodapkar MV, Gupta VA, Jaye DL, Wu J, Goyal S, Chen Z, Boise LH, Lonial S, Nooka AK, Kaufman JL. Gain of Chromosome 1q is associated with early progression in multiple myeloma patients treated with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone. *Blood Cancer J*. 2019 Nov 25; 9(12): 94.
119. Scudla V, Ordeltova M, Bacovsky J, Vytrasova M, Sumna E, Martinek A, Horak P. A contribution to examination of propidium iodide and annexin V plasma cells indices in multiple myeloma. *Neoplasma*. 2003; 50(5): 363-371.
120. Scudla V, Ordeltova M, Bacovsky J, Vytrasova M, Horak P, Minarik J. The relationship between proliferation and apoptosis in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance or multiple myeloma. *Haematologica*. 2005 Dec; 90(12): 1713-1714.

121. Scudla V, Ordeltova M, Minarik J, Dusek L, Zemanova M, Bacovsky J. Prognostic significance of plasma cell propidium iodide and annexin-V indices and their mutual ratio in multiple myeloma. *Neoplasma*. 2006; 53(3): 213-218.
122. Sergentanis TN, Zagouri F, Tsilimidos G, Tsagianni A, Tseliou M, Dimopoulos MA, Psaltopoulou T. Risk Factors for Multiple Myeloma: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015 Oct; 15(10): 563-77.e1-3.
123. Shah GL, Landau H, Londono D, Devlin SM, Kosuri S, Lesokhin AM, Lendvai N, Hassoun H, Chung DJ, Koehne G, Jhanwar SC, Landgren O, Levine R, Giralt SA. Gain of chromosome 1q portends worse prognosis in multiple myeloma despite novel agent-based induction regimens and autologous transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2017 Aug; 58(8): 1823-1831.
124. Shah V, Sherborne AL, Walker BA, Johnson DC, Boyle EM, Ellis S, Begum DB, Proszek PZ, Jones JR, Pawlyn C, Savola S, Jenner MW, Drayson MT, Owen RG, Houlston RS, Cairns DA, Gregory WM, Cook G, Davies FE, Jackson GH, Morgan GJ, Kaiser MF. Prediction of outcome in newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of the molecular profiles of 1905 trial patients. *Leukemia*. 2018 Jan; 32(1): 102-110.
125. Shapiro-Shelef M, Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr Opin Immunol*. 2004 Apr; 16(2): 226-234.
126. Shi L, Wang S, Zangari M, Xu H, Cao TM, Xu C, Wu Y, Xiao F, Liu Y, Yang Y, Salama M, Li G, Tricot G, Zhan F. Over-expression of CKS1B activates both MEK/ERK and JAK/STAT3 signaling pathways and promotes myeloma cell drug-resistance. *Oncotarget*. 2010 May; 1(1): 22-33.
127. Soh KT, Tario JD Jr, Wallace PK. Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry. *Clin Lab Med*. 2017 Dec; 37(4): 821-853.
128. Spets H, Strömberg T, Georgii-Hemming P, Siljason J, Nilsson K, Jernberg-Wiklund H. Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival. *Eur J Haematol*. 2002 Aug; 69(2): 76-89.
129. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A, Van Dongen J, Rawstron AC. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan; 90(1): 26-30.

130. Tinhofer I, Marschitz I, Henn T, Egle A, Greil R. Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood*. 2000 Jan 15; 95(2): 610-618.
131. Turesson I, Velez R, Kristinsson SY, Landgren O. Patterns of multiple myeloma during the past 5 decades: stable incidence rates for all age groups in the population but rapidly changing age distribution in the clinic. *Mayo Clin Proc*. 2010 Mar; 85(3): 225-230.
132. Varma A, Sui D, Milton DR, Tang G, Saini N, Hasan O, Mukherjee A, Joseph JJ, Bashir (Q, Rondon G, Srour S, Popat UR, Hosing CM, Nieto Y, Kebriaei P, Alousi AM, Ahmed S, Mehta R, Khouri IF, Ahmed H, Iyer S, Weber DM, Thomas SK, Manasanch E, Lee HC, Patel K, Ciurea SO, Shpall EJ, Orlowski RZ, Champlin RE, Qazilbash MH. Outcome of Multiple Myeloma with Chromosome 1q Gain and 1p Deletion after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Propensity Score Matched Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020 Apr; 26(4): 665-671.
133. Visram A, Rajkumar SV, Kapoor P, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Hayman SR, Dingli D, Kourelis T, Gonsalves W, Warsame R, Muchtar E, Leung N, Baughn LB, Kyle RA, Kumar S. Assessing the prognostic utility of smoldering multiple myeloma risk stratification scores applied serially post diagnosis. *Blood Cancer J*. 2021 Nov 26; 11(11): 186.
134. Wallin A, Larsson SC. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*. 2011 Jul; 47(11): 1606-1615.
135. Wildes TM, Rosko A, Tuchman SA. Multiple myeloma in the older adult: better prospects, more challenges. *J Clin Oncol*. 2014 Aug 20; 32(24): 2531-2540.
136. Witzig TE, Dhodapkar MV, Kyle RA, Greipp PR. Quantitation of circulating peripheral blood plasma cells and their relationship to disease activity in patients with multiple myeloma. *Cancer*. 1993 Jul 1; 72(1): 108-113.
137. Witzig TE, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. Detection of peripheral blood plasma cells as a predictor of disease course in patients with smoldering multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994 Jun; 87(2): 266-272.
138. Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 1996 Sep 1; 88(5): 1780-1787.

-
139. Witzig TE, Timm M, Larson D, Therneau T, Greipp PR. Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *Br J Haematol*. 1999 Jan; 104(1): 131-137.
 140. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006 Sep 15; 108(6): 2020-2028.