



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Análisis Inmunobiológico en Discrasias de Células
Plasmáticas: Utilidad Diagnóstica y Pronóstica.

D^a. Adela Periago Peralta

2015

AGRADECIMIENTOS

Después de cinco años de andadura con este proyecto, ya hemos llegado a su fin. Deseo mostrar mi agradecimiento:

Al Dr. José María Moraleda, por darme la oportunidad de desarrollar esta andadura bajo su dirección.

Al Dr. Alfredo Minguela, por su inestimable ayuda, dedicación, disponibilidad, orientación. Por sus horas perdidas de sueño, Por estar siempre ahí y sin cuya ayuda habría sido imposible realizar esta tesis.

A la Dra. Rocío Álvarez, por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su Servicio. Por su minuciosa corrección de la tesis que me ha enseñado a expresar las ideas con mayor claridad.

Al personal del Servicio de Inmunología que ha participado de forma directa o indirecta en la consecución de esta tesis, Nati, José Miguel, personal técnico.

A mis compañeros de Lorca Antonio, M^a José, Begoña, Toñi por animarme a finalizar la tesis y a Raúl ¡te echamos de menos!

A Chelo, Mamen y Auri, por su apoyo desinteresado en la consecución de datos.

A Maruja, por creer en mí desde el primer momento. Gracias por tu apoyo incondicional, porque “contagias” tu energía, por no dejarme caer en los momentos bajos y por alegrarte en los buenos momentos.

A aquellos que de una u otra manera han estado pendientes de mi trabajo para darme apoyo y ánimo para culminar este proyecto.

A Jose, mi complemento, mi equilibrio.

A Alejandro y Álvaro mi motor

La producción científica obtenida con la serie de pacientes y los resultados recogidos en esta memoria de tesis ha sido, hasta la fecha:

PUBLICACIONES

1. de los Reyes N, Monserrat J, Martínez-Sánchez MV, Campillo JA, Periago A, González C, Ibáñez J, Moraleda JM, Álvarez-López MR, Minguela A. La citometría de flujo en el estudio de las discrasias de células plasmáticas. *Revista de Hematología*. 12 (2): 90-98. 2011.
2. Martínez-Sánchez MV, Periago A, Legaz I, Giméno L, Mrowiec A, Montes-Barqueros NR, Campillo JA, Bolarín JM, Bernardo MV, López-Álvarez MR, González C, García-Garay MC, Muro M, Cabañas-Perianes V, Fuster JL, García-Alonso AM, Moraleda JM, Álvarez-Lopez MR, Minguela A. Overexpression of KIR inhibitory ligands (HLA-I) determines that immunosurveillance of myeloma depends on diverse and strong NK cell licensing. Aceptada en *Oncoimmunology* 2015.

COMUNICACIONES INTERNACIONALES

1. Alfredo Minguela, Adela Periago, Isabel Legaz, Natividad R. Montes, José A. Campillo, María R. López-Álvarez, Lourdes Gimeno, Consuelo González, Carlos Clavel, María C. García-Garay, José M. Bolarín, Manuel Muro, Valentín Cabañas-Perianes, José M. Moraleda, María R. Álvarez Myeloma is associated with genetic repertoires of KIR2D receptors with lower diversity and affinity for cognate HLA-C: a preliminary study. Lopez28th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. June 25-28 2014. Stockholm, Sweden.
2. Alfredo Minguela, Adela Periago, Isabel Legaz, Natividad R. Montes, José A. Campillo, María R. López-Álvarez, Lourdes Gimeno, Consuelo González, Carlos Clavel, María C. García-Garay, José M. Bolarín, Manuel Muro, Valentín Cabañas-Perianes, José M. Moraleda, María R. Álvarez López. Myeloma is associated with genetic repertoires of KIR2D receptors with lower diversity and affinity for cognate HLA-C: a preliminary study. The 28th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. 25-28 Junio. 2014. Estocolmo, Suecia. (Oral presentation)
3. Alfredo Minguela, María V. Martínez-Sánchez, Adela Periago, Isabel Legaz, Lourdes Gimeno, Natividad R. Montes, Anna Mrowiec, José A. Campillo, María

V. Bernardo, María R. López-Álvarez, Consuelo González, María C. García-Garay, José M. Bolarín, Manuel Muro, Valentín Cabañas-Perianes, José L. Fuster, Ana M. García-Alonso, José M. Moraleda, María R. Álvarez-Lopez. "Increasing self" instead of "missing self" determines that immunosurveillance of myeloma depends on NK cell licensing. 29th European Federation for Immunogenetics Conference. 26-29 April 2015. Geneva, Switzerland, (Oral presentation)

COMUNICACIONES NACIONALES

1. Montes-Barqueros NR, Monserrat-Coll J, Boix-Giner F, Marín-Moreno IM, Ibáñez-García J, Periago-Peralta A, Moraleda-Jiménez JM, Morales-Lázaro A, Campillo-Marquina JA, Bolarín-Guillén JM, Álvarez-López MR, Minguela A. Utilidad de la citometría de flujo y la FISH en el estudio de los síndromes mielodisplásicos. XXVI Congreso Nacional SETH. LII Reunión Nacional AEHH. 28-30 Octubre 2010. Las Palmas de Gran Canaria.
2. Montes Barqueros NR, Periago Peralta A, Campillo Marquina JA, Soriano Díaz S, Céspedes Gallego P, Villar Permuy F, Ruiz Vera C, Bolarín Guillén JM, Álvarez López R, González García C, García Garay MC, Cabañas Perianes V, Moraleda Jiménez JM, Minguela A. FISH en célula plasmática purificada Versus citogenética convencional en discrasias de células plasmáticas. (Ponencia) V Simposium GCECGH (Grupo cooperativo Español de Citogenética Hematológica). (8-9 Mayo 2014). Oviedo.
3. Adela Periago Peralta, Natividad R. Montes Barqueros, José A. Campillo Marquina, Lourdes Gimeno Arias, Florentina Villar Permuy, Pastora Céspedes Gallego, Consuelo González García, María C. García-Garay, José M. Bolarín Guillen, Manuel Muro Amador, Valentín Cabañas-Perianes, José M. Moraleda Jiménez, María R. Álvarez López, Alfredo Minguela. Células plasmáticas de fenotipo aberrante en sangre periférica: utilidad diagnóstica y pronóstica en discrasias de nuevo diagnóstico. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. 6-8 noviembre 2014. Madrid.
4. Adela Periago Peralta, Natividad R. Montes Barqueros, Isabel Legaz Pérez, José A. Campillo Marquina, Lourdes Gimeno Arias, Consuelo González García, Carlos Clavel Sainz, María C. García-Garay, José M. Bolarín Guillen, Manuel Muro Amador,

Valentín Cabañas-Perianes, José M. Moraleda Jiménez, María R. Álvarez López, Alfredo Minguela Puras. El mieloma se asocia a repertorios genéticos menos diversos de receptores inhibidores KIR2D específicos de HLA-C. LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. 6-8 noviembre 2014. Madrid.

5. Adela Periago Peralta, José A. Campillo Marquina, Lourdes Gimeno Arias, Anna Mrowiec, Pastora Céspedes Gallego, Florentina Villar Permuy, Consuelo González García, María C. García-Garay, José M. Bolarín Guillen, Manuel Muro Amador, Valentín Cabañas-Perianes, José M. Moraleda Jiménez, Ana M. García-Alonso, Alfredo Minguela Puras. Estratificación del riesgo en pacientes con Mieloma basado exclusivamente en parámetros de sangre periférica: Edad + ISS + Células de Mieloma Circulantes. XIV Congreso Sociedad Ibérica De Citometría (4 al 6 de junio de 2015) (Seleccionada para presentación oral). VIX Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría (SIC). 4-6 Junio 2015 Las Palmas De Gran Canaria.

ABREVIATURAS

AC	Anticuerpo
AcMo	Anticuerpos monoclonales
aCP	Células plasmáticas aberrantes
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
alo-TIR	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento de intensidad reducida
APCs	Células presentadoras de antígenos
CC	Citogenética convencional
CM	Componente monoclonal
CMF	Citometría de flujo
CP	Células plasmáticas
CR	Respuesta completa
CRAB	Hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DS	Durie y Salmon
EDTA	Etilendiaminotetra-acético
EICH	Enfermedad injerto contra huesped
FCL	Ratio cadenas ligeras κ/λ en suero
FISH	Técnica de estudio citogenético por hibridación in situ fluorescente
FL	Fluorescencia

FSC	Forward side scatter
GM	Gammapatía
IEF	Inmunolectroforesis
HLA	Antígeno leucocitario humano (del inglés Human leukocyte antigens)
IC	Intervalo de confianza
IFM	Grupo francés de mieloma
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
IgCit	Inmunoglobulinas citoplasmáticas
IGF	Insulin-like growth factor
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IGH	Gen cadena pesada de las inmunoglobulinas
IgH	Cadena pesada de las inmunoglobulinas
IL	Interleukina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IMWG	International myeloma working group
ISS	International staging system
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
KIR	killer cell Ig-like receptors
MEL100	Melfalan 100

MGUS	Gammapatía monoclonal de significado incierto
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MICA	Ligando de para NKG2D
MM	Mieloma múltiple
MO	Médula ósea
MPT	Melfalan+prednisona+talidomida
MRC	Medical research council
NK	Natural killer
OCL	Osteoclastos
OPG	Osteoprotegerina
OR	Odds ratio
PBJ	Proteinuria de Bence-Jones
PCR	Proteína C reactiva
PET	Tomografía por emisión de positrones
RANKL	<i>Receptor activator for nuclear factor κ B ligand</i>
RC	Respuesta completa
Rd	Lenalidomida-bajas dosis de dexametasona
SCT	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
SG	Supervivencia global
SI	Sistema inmune
SLP	Supervivencia libre de progresión

SMM	Mieloma quiescente o <i>smoldering myeloma</i>
SP	Sangre periférica
SSC	Side scatter
TAA s	Tumor associated antigens
TASPE	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticas de sangre periférica
TCR	T cell receptor
TD	Talidomida+dexametasona
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VD	Bortezomib-dexametasona
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VGRPR	Very good response partial response
VHC	Virus hepatitis C
VIH	Virus inmunodeficiencia humana
VMP	Bortezomib-melfalán-prednisona
VPH.	Virus del papiloma humano
VRD	Bortezomib-lenalidomida-dexametasona
VT	Bortezomib-talidomida
VTD	Bortezomib-talidomida+ dexametasona
WM	Macroglobulinemia de Waldenström

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
1	GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.....	3
1.1	GENERALIDADES.....	3
1.1.1	ETIOLOGÍA.....	3
1.1.2	PATOGENIA.....	4
1.1.3	CLASIFICACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.....	9
1.1.4	ESTUDIOS DE CITOGENETICA EN LAS GAMMAPATIAS MONOCLONALES.....	9
1.1.4.1	ANOMALÍAS CITOGENÉTICAS ESPECÍFICAS	12
1.2	ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO EN DISCRASIAS.....	14
1.2.1	MARCADORES DE UTILIDAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DIFERENCIAL DE CÉLULAS PLASMÁTICAS PATOLÓGICAS POR CMF.....	15
1.2.2	MARCADORES DE VALOR PRONÓSTICO	17
1.2.3	CLONALIDAD DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS.....	19
1.2.4	ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Y CONTENIDO DE ADN.....	20
1.2.5	VALOR PRONÓSTICO DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS DE LA CP PATOLÓGICA	21
1.2.6	DISCRIMINACIÓN CITOMÉTRICA DE MIELOMA Y OTRAS GAMMAPATÍAS.....	23
1.2.7	UTILIDAD DEL ANALISIS DE INMUNOFENOTIPO EN SANGRE PERIFÉRICA	24
1.2.8	MONITORIZACIÓN DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	25
1.3	GAMMAPATÍAS MONOCLONALES ASINTOMÁTICAS.....	25
1.3.1	GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO	25
1.3.2	MIELOMA MÚLTIPLE ASINTOMÁTICO (SMOLDERING) O MIELOMA QUIESCENTE	27
1.4	MIELOMA MÚLTIPLE SINTOMÁTICO.....	30
1.4.1	CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MIELOMA SINTOMÁTICO	31
1.4.2	MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	31
1.4.3	DATOS DE LABORATORIO	33
1.4.4	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	34
1.4.5	PRONÓSTICO.....	34
1.4.5.1	FACTORES RELACIONADOS CON LA CARGA TUMORAL/ESTADIO	34
1.4.5.2	FACTORES RELACIONADOS CON EL PACIENTE	37
1.4.5.3	FACTORES RELACIONADOS CON LA BIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	37
1.4.6	TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE	38
1.4.6.1	CANDIDATOS A TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	38
1.4.6.2	TRASPLANTE ALOGÉNICO.....	40
1.4.6.3	PACIENTES NO CANDIDATOS A TRASPLANTE ESTÁNDAR	40
1.4.6.3.1	OPCIONES DE TRATAMIENTO PARA PACIENTES NO APTOS.....	43
1.4.6.4	TRATAMIENTO DE CONSOLIDACION Y MANTENIMIENTO.....	44
1.4.6.5	TRATAMIENTO DE PACIENTES CON MM EN RECAÍDA/RESISTENTE	45

2 LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES Y SU RELACIÓN CON LOS MECANISMOS DE INMUNOVIGILANCIA.....	46
2.1 EL SISTEMA INMUNITARIO	46
2.1.1 REPUESTA INMUNITARIA INNATA Y SUS COMPONENTES	46
2.1.2 RESPUESTA INMUNITARIA ESPECÍFICA O ADAPTATIVA	48
2.1.2.1 HLA: LOCALIZACIÓN, REGIONES, CLASES, GENES Y FUNCIONES	49
2.1.2.1.1 PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS A LINFOCITOS T	51
2.1.2.1.2 INTERACCIÓN CON RECEPTORES DE CÉLULAS NK, DETECCIÓN DE LA PÉRDIDA DE IDENTIDAD ..	51
2.1.2.1.3 HLA Y MIELOMA MÚLTIPLE	52
2.2 INMUNOVIGILANCIA E INMUNOTOLERANCIA FRENTE A TUMORES.....	53
2.2.1 INMUNOVIGILANCIA E INMUNORREGULACIÓN POR LINFOCITOS T	54
2.2.2 CÉLULAS NK Y RESPUESTA ANTITUMORAL	55
2.2.2.1 RECEPTORES KIR (KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS).....	58
2.2.2.2 EXPRESIÓN DE GENES KIR	60
2.2.2.3 LIGANDOS DE LOS RECEPTORES KIR	61
2.2.2.4 EDUCACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS NK.....	63
2.2.3 RECEPTORES KIR Y ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD	66
2.2.4 CÉLULAS NK Y MIELOMA.....	69
2.2.4.1 TERAPIA CON CÉLULAS NK FRENTE A MIELOMA	72
2.2.4.1.1 AGENTES INMUNOMODULADORES DE LA FUNCIÓN DE CÉLULAS NK.....	73
2.2.4.1.2 CÉLULAS NK Y TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA EN PACIENTES CON MIELOMA	74
II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	78
1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	80
2 OBJETIVOS.....	81
III PACIENTES Y MÉTODOS.....	83
1 DISEÑO Y JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	85
2 PACIENTES, GRUPOS DE ESTUDIO Y MUESTRAS RECOGIDAS	86
2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	87
2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	88
2.3 GRUPOS DE ESTUDIO	88
2.4 MUESTRAS RECOGIDAS.....	89
2.5 TRATAMIENTOS	89
3 VARIABLES DE ESTUDIO	90

3.1	VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICO-BIOLÓGICAS.....	90
3.2	VARIABLES CITOMORFOLÓGICAS	90
3.3	VARIABLES DE LABORATORIO	91
3.4	VARIABLES EXPERIMENTALES.....	91
4	INSTRUMENTACIÓN.....	91
4.1	EQUIPOS DE HEMATIMETRÍA Y BIOQUÍMICA.....	91
4.2	EQUIPOS DE CITOMETRÍA.....	92
5	ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	93
5.1	MUESTRAS ESTUDIADAS.....	93
5.2	ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS (ACMO).....	94
5.3	PANELES DE ESTUDIO	95
5.4	MÉTODOS DE TINCIÓN.....	96
5.4.1	AJUSTE DE LOS CITÓMETROS.....	99
5.4.2	SISTEMÁTICA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS	102
5.4.3	CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN SP Y MO.....	109
5.4.4	ESTIMACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS DE FENOTIPO ABERRANTE.....	109
5.4.5	ESTIMACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS APOPTÓTICAS	109
5.4.6	ESTIMACIÓN DE PLOIDÍA Y DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS..	109
5.4.7	ESTIMACIÓN DE MARCADORES DE CMF DE VALOR PRONÓSTICO (CD28 Y CD117).....	110
6	ESTUDIOS CITOGENÉTICOS POR HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) 110	
6.1	PURIFICACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS.....	110
6.2	CHOQUE OSMÓTICO.....	111
6.3	FIJACIÓN Y MONTAJE DE PORTAOBJETOS.....	111
6.4	HIBRIDACIÓN CON SONDAS FLUORESCENTES.....	111
6.5	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	113
7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	115
IV	RESULTADOS.....	117
1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES.....	119
1.1	VARIABLES DEMOGRÁFICAS	119
1.2	VARIABLES CLÍNICAS	122
1.3	HEMATIMETRÍA Y VARIABLES BIOQUÍMICAS.....	123
1.4	COMPONENTE MONOCLONAL EN SUERO	124
1.5	DATOS CITOMORFOLÓGICOS EN MÉDULA ÓSEA	125
1.6	ESTADIFICACIÓN CLÍNICA Y DE RIESGO. VALOR PRONÓSTICO	126

2 ANÁLISIS CELULAR DE MÉDULA ÓSEA POR CMF.....	129
2.1 LÍNEAS CELULARES PRINCIPALES	130
2.2 SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T Y B.....	130
2.3 CÉLULAS PLASMÁTICAS EN MEDULA ÓSEA	131
2.3.1 UTILIDAD DE LA PROPORCIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN MO DENTRO DEL COMPARTIMENTO DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN MO.....	135
2.3.2 MARCADORES FENOTÍPICOS DE VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN CÉLULAS PLASMÁTICAS.....	136
2.3.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	138
2.3.3.1 ANEUPLOIDÍA: FRECUENCIAS E IMPACTO CLÍNICO	138
2.3.3.2 CICLO CELULAR E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN: FRECUENCIA E IMPACTO CLÍNICO	140
2.3.4 ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS PLASMÁTICAS DE MO.....	143
2.3.5 RATIO PROLIFERACIÓN/APOPTOSIS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN MO	146
2.4 ESTUDIO COMBINADO DE PARÁMETROS DE MO ESTIMADOS POR CMF CON MAYOR UTILIDAD EN DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO	149
3 UTILIDAD DE LOS ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN GAMMPATIÁS.....	154
3.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL (CARIOTIPO).....	155
3.2 FISH EN CELULA PLASMÁTICA PURIFICADA	156
3.2.1 IMPACTO DE LAS ALTERACIONES DETECTADAS POR FISH EN LA MASA TUMORAL Y LOS ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS.....	157
3.2.2 IMPACTO DE LAS ALTERACIONES DETECTADAS POR FISH EN CÉLULA PLASMÁTICA PURIFICADA EN LA PROGRESIÓN Y EN LA SUPERVIVENCIA.	160
3.2.2.1 PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD	160
3.2.2.2 SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES	163
3.2.2.3 ANÁLISIS MULTIVARIABLE DEL IMPACTO DE LAS ALTERACIONES CITOGENÉTICAS SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES.	166
4 ANÁLISIS CELULAR EN SANGRE PERIFERICA POR CITOMETRIA DE FLUJO	171
4.1 LÍNEAS CELULARES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS PRINCIPALES.....	171
4.2 VALOR PREDICTIVO DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SANGRE PERIFÉRICA.....	172
4.2.1 RELACIÓN DE LAS CPS ABERRANTES EN SP CON OTROS PARÁMETROS.....	174
4.2.2 UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SP.....	176
4.2.3 CAPACIDAD PREDICTIVA DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SANGRE PERIFÉRICA PARA LA PROGRESIÓN Y SUPERVIVENCIA	176

4.2.4 LA PRESENCIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SP COMPLEMENTA LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE OTROS PARÁMETROS PRONÓSTICOS BIEN ESTABLECIDOS EN GAMMAPATÍAS	178
4.2.5 LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA PRESENCIA DE ACPS EN SP PARA LA SUPERVIVENCIA ES DE UTILIDAD TANTO EN TERAPIAS CLÁSICAS COMO NUEVAS.....	180
4.2.6 PROPUESTA DE UN NUEVO MODELO DE PREDICCIÓN DE RIESGO EN PACIENTES CON MIELOMA BASADO EXCLUSIVAMENTE EN PARÁMETROS DE SP	182
4.3 <i>MARCADORES DE ACTIVACIÓN, SENESCENCIA Y ADHESIÓN DE LINFOCITOS T.....</i>	185
4.4 <i>EXPRESIÓN DE RECEPTORES KIR2D EN LINFOCITOS T Y CÉLULAS NK.....</i>	190
V DISCUSIÓN.....	195
1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES.....	197
2 ESTIMACIÓN DEL RIESGO EN PACIENTES CON GAMMAPATÍA	199
3 APORTACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MÉDULA ÓSEA AL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS GAMMAPATÍAS.....	201
4 UTILIDAD PRONÓSTICA DE LOS ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN GAMMAPATÍAS	209
5 CITOMETRÍA DE FLUJO EN SANGRE PERIFÉRICA.....	213
6 PAPEL DEL SISTEMA INMUNITARIO EN LAS GAMMAPATÍAS	219
VI CONCLUSIONES.....	227
1 CONCLUSIONES.....	229
VII REFERENCIAS	231

I INTRODUCCIÓN

1 GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

1.1 GENERALIDADES

Las gammapatías monoclonales (GMs) o discrasias de células plasmáticas constituyen un grupo de entidades clínicas caracterizadas por la existencia de un clon de células plasmáticas (CPs) productoras de una inmunoglobulina (Ig) de carácter monoclonal también conocida como componente monoclonal (CM) o paraproteína y que puede ser detectable en sangre y/u orina. El paradigma de las GMs en la práctica clínica es el mieloma múltiple (MM), pero la entidad más frecuente es un estado premaligno denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS, del inglés *Monoclonal gammopathy of uncertain significance*). Hoy se sabe que casi todos los pacientes que desarrollan un MM evolucionan a partir de ese estado premaligno (Landgren O *et al.*, 2009c; Weiss BM *et al.*, 2009). En algunos casos, el MM sintomático, viene precedido por un estadio asintomático más avanzado, denominado mieloma quiescente o *smoldering myeloma* (SMM).

Estas patologías tienen su origen en las células secretoras de inmunoglobulinas, cuyo patrón morfológico corresponde al linfoplasmocito y/o la célula plasmática, estadios terminales de la diferenciación del linfocito B. La célula proliferante es una célula B postcentro-germinal que migra posteriormente a la médula ósea (MO), donde se diferencia a células plasmáticas (Bergsagel PL *et al.*, 2005).

1.1.1 ETIOLOGÍA

La causa de las gammapatías monoclonales se desconoce. Algunos de los factores que podrían dar lugar a las mismas son:

- a) *Radiaciones ionizantes, insecticidas y pesticidas* (Herrington *et al.*, 2004; Landgren *et al.*, 2009b). Sin embargo la mayoría de estos estudios no son concluyentes porque a menudo, los resultados no se reproducen en las distintas series.
- b) *Trastornos relacionados con la función del sistema inmunológico*. La incidencia de GMs aumenta con la edad, pero por otra parte, hasta el 30% de los pacientes que han sido sometidos a un trasplante renal y el 50% de los receptores de trasplante

de MO presentan una GM transitoria. Todo ello apoya la hipótesis de que las GMs sean consecuencia de un trastorno en la regulación del sistema inmunológico probablemente relacionado con la disregulación inmunitaria asociada al envejecimiento (Bladé J. *et al.*, 2008).

- c) *Estimulación antigénica crónica.* La asociación de MGUS con artritis reumatoide (Garton MJ, 2006), con ciertas infecciones crónicas como las producidas por VIH (De Zube BJ, 2004) y VHC (Andreone *et al.*, 1998), así como una serie de enfermedades infecciosas o inflamatorias y autoinmunes (Brown LW *et al.*, 2008) apoyan esta hipótesis. Se ha postulado que la estimulación inmune crónica y su activación de los linfocitos asociados, que están presentes en los trastornos autoinmunes, puede inducir la proliferación incontrolada de las células plasmáticas malignas, que posiblemente lleve a MM; sin embargo, no se observaron asociaciones con respecto a un compendio de enfermedades autoinmunes, incluyendo el síndrome de Sjögren primaria.
- d) *Factores genéticos.* La asociación de factores constitucionales en la etiopatogenia de las gammopatías monoclonales se sustenta básicamente en su diferente frecuencia entre las distintas razas y en la existencia de casos familiares (Vachon CM *et al.*, 2009). Respecto a la probable predisposición genética en relación con la raza, se ha descrito mayor prevalencia de MGUS en afroamericanos y negros americanos en comparación con la población caucásica, independientemente de su origen geográfico y edad, así como menor prevalencia de gammapatía en población asiática (Korde K *et al.*, 2011).
- e) *Otros factores de riesgo.* Se ha observado una mayor frecuencia de obesidad (Landgren O *et al.*, 2010).

1.1.2 PATOGENIA

Para la transformación de estas células en neoplasia maligna han de ocurrir múltiples alteraciones genéticas (Palumbo *et al.*, 2011). Estudios recientes han demostrado que casi todos los pacientes con MM proceden de quienes ya tenían un MGUS, que constituye la fase preclínica en la que la clona maligna permanece estable durante años hasta que, por causas aún desconocidas, escapa de los mecanismos que

limitaban su crecimiento y se produce la transformación maligna (Landgren *et al.*, 2009c; Weiss *et al.*, 2009).

Muchas de las alteraciones cromosómicas presentes en el MM (aneuploidía, monosomía del cromosoma 13 u otras) ya se detectan en la fase de MGUS, por lo que se desconoce si estas anomalías preceden o siguen a las translocaciones de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) (Hallek M *et al.*, 1998). Por el contrario, otras alteraciones como las mutaciones de C-myc, K-ras, N-ras o delección de p53, son propias de las fases avanzadas del MM, lo que sugieren que están más relacionados con la progresión que con el origen de la enfermedad (Fonseca R *et al.*, 2009). Posiblemente, uno de los desencadenantes iniciales sean las translocaciones de IgH, cuyos genes se sitúan en la región cromosómica 14q32, y que se producirían bien por errores durante la recombinación o cambio de la IgH (“switch”) o bien durante la fase de hipermutación somática en el centro germinal del folículo linfoide (Bergsagel PL *et al.*, 2004) y que podrían dar lugar a la disregulación de los genes de las ciclinas D (Bergsagel *et al.*, 2005). Sin embargo, aproximadamente una tercera parte de los pacientes con MM no tienen translocaciones de IgH o de la cadena ligera de las inmunoglobulinas (IgL). En estos casos la disregulación de los genes de ciclina se produciría por mecanismos aún desconocidos. De hecho, un modelo reciente propone dos vías diferenciadas en la patogenia del mieloma:

- a) En mielomas no hiperdiploides, asociado habitualmente a translocaciones del gen IgH como un evento oncogénico inicial, más comúnmente t(4;14), t(14;16), t(6;14) y t(14;20).
- b) En mielomas hiperdiploides, asociada a trisomías de los cromosomas impares y con un mecanismo aún desconocido (Fonseca *et al.*, 2009).

De este modo, la disregulación de los genes de la ciclina (mediada por la translocación de IgH o por mecanismo desconocido), sería el fenómeno oncogénico universal, de manera que la célula plasmática quedaría en un estado más sensible a los estímulos proliferativos, hecho que favorecería su expansión clonal (Bergsagel *et al.*, 2005). Además, estas alteraciones podrían afectar a la viabilidad de dichas células, retrasando/reduciendo su muerte celular por apoptosis, lo que igualmente conduciría a la acumulación clonal de estas células (Dai Y *et al.*, 2006) (Figura 1).

Por otro lado, cada vez son más los estudios que otorgan a la interacción entre el microambiente medular y las células mielomatosas de la médula ósea (MO) un papel fundamental en el desarrollo y progresión del MM (Hideshima T *et al.*, 2007). El microambiente medular está integrado por la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, laminina y osteopontina) y componentes celulares, que incluyen las células hematopoyéticas, células del sistema inmunitario, células estromales y endoteliales de la MO, osteoblastos y osteoclastos. Estas interacciones entre las CPs y el microambiente medular serían responsables de la activación de rutas de señalización que median el crecimiento, la supervivencia, la resistencia a fármacos y la migración de las células mielomatosas, así como la osteoclastogénesis y la angiogénesis.

En el MM hay varios fenómenos biológicos que se ven influidos por las interacciones entre el tumor y el microambiente medular:

a) *Adhesión selectiva de las células mielomatosas o “homing” y proliferación tumoral.* Un paso inicial en la patogénesis del MM implica la adhesión de la CP al microambiente medular gracias a moléculas de adhesión tales como VLA-4, CD56 y CD44 y CD138 (Vande Broek I *et al.*, 2008). La adhesión provoca señales bidireccionales entre las CPs y las células estromales que facilita el asentamiento de las CP en el entorno medular.

b) *Factores paracrinos secretados.* En condiciones fisiológicas y patológicas, en la médula ósea se producen interacciones tanto de las células entre sí como con la matriz extracelular, lo que desencadena la secreción de citoquinas como Interleuquina-6 (IL-6), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés *insulin-like growth factor-1*), IL-1 β , factor de crecimiento transformante- β (TGF- β , del inglés *transforming Growth Factor beta*) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , *tumor necrosis factor*) por parte de las células del estroma medular y de las propias células tumorales. La IL-6 y el IGF-1 están consideradas los factores de proliferación más potentes para las células mielomatosas y que a su vez, proporcionan protección frente la muerte celular inducida por fármacos. Varios miembros de la familia del TNF- α son potentes factores de supervivencia para las células B y están sobreexpresados en las CPs neoplásicas.

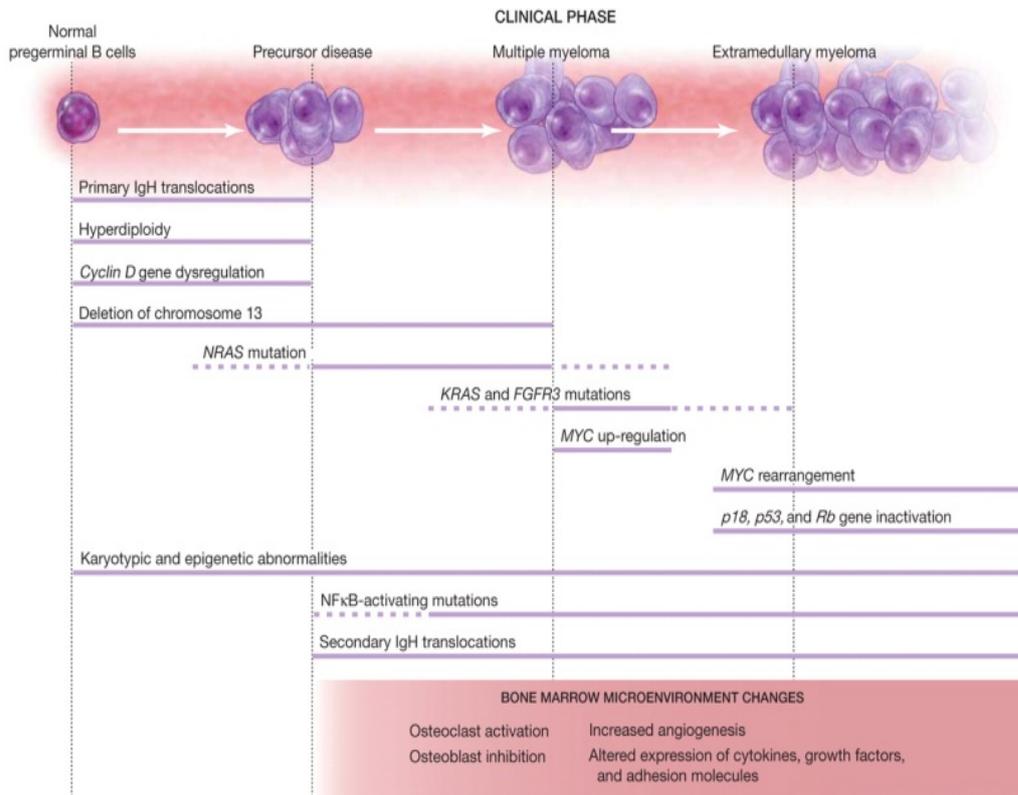


Figura 1. Eventos biológicos relacionados con la progresión a Mieloma múltiple. La transición biológica de las células plasmáticas normales a MGUS, SMM y MM compuestos de muchos eventos oncogénicos superpuestos. Estos eventos no ocurren en todos los individuos afectados. Por ejemplo la hiperdiploidía está presente en aproximadamente el 50% de las neoplasias precursoras y en MM. En esta ilustración, las líneas continuas representan el evento oncogénico probable y las líneas discontinuas indican una menor seguridad de que se produzcan esos eventos. Una vez que el evento oncogénico se produce, casi siempre persiste. Los dos principales eventos tempranos incluyen la translocación de IgH más comúnmente t(4;14), t(14;16), t(6;14), t(11;14) y la t(14;20) y la hiperdiploidía, aunque la mayoría de las células tumorales tienen solo uno de estos dos eventos. Cualquiera de estos puede coexistir con la delección del cromosoma 13, aunque esta anomalía es más frecuente acompañando a las t(4;14), t(14;16) y t(14;20). Un evento unificador en la mayoría (precursores de MM y MM) es la disregulación del gen de la ciclina D. Las translocaciones secundarias pueden ocurrir en cualquier etapa de la mielomagénesis. La activación de NRAS y KRAS están presentes en el 15% de los MM. Las mutaciones de NRAS están presentes en MGUS, mientras que las de KRAS están ausentes. La activación constitutiva de la vía NFκB está mediada por mutaciones en algunos tumores durante la progresión. Otros eventos como la inactivación de genes Rb o la supresión de genes p53 o p18 se ven con más frecuencia en fases más avanzadas o en mieloma extramedular. En la etapa intramedular, las células tumorales son fuertemente dependientes del microambiente medular. La interacción recíproca del microambiente medular y las células tumorales son los responsables de las lesiones líticas. Las células tumorales extramedulares han desarrollado características que las hacen independientes del microambiente medular. Figura extraída de Korde N. *Blood*, 26 May 2011 Vol 117, nº 21

c) *Angiogénesis regulada por factores solubles.* La formación de nuevos vasos es un proceso complejo regulado por un equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos. La inducción de moléculas proangiogénicas, por ejemplo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés

vascular endothelial growth factor), incrementa la densidad microvascular de la medula ósea y explica la estructura anormal de los vasos en pacientes con mieloma (Hideshima T *et al.*, 2007).

d) *Resorción ósea y osteoclastogénesis*. Las lesiones óseas son el resultado de un desequilibrio entre la función de los osteoblastos y osteoclastos. Este desequilibrio es causado por un aumento de la actividad osteoclástica y marcada depresión de la actividad osteoblástica que ocurren sobretodo en la interfase entre el hueso sano y la proliferación plasmocelular del MM activo (Roodman GD, 2001). Como resultado de esto, las lesiones óseas en MM son puramente osteolíticas. Como se puede ver en la Figura 2, la actividad osteolítica incrementada está mediada por un incremento en el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL, del inglés *receptor activator for nuclear factor κ B ligando*) en osteoblastos y posiblemente en células plasmáticas acompañado por una reducción de los niveles de osteoprotegerina (OPG), potente inhibidor de los osteoclastos (Roodman GD., 2001; 2009; Korde N *et al.*, 2011). Esto conduce a un aumento en la relación RANKL/OPG, que causa la activación osteoclástica y la resorción ósea. El incremento de los niveles de proteína inflamatoria macrófaga 1 α (MIP-1 α , del inglés *macrophage inflammatory protein 1 alpha*), IL-3 e IL-6 producidas por las células estromales también contribuye a la sobreactividad de los osteoclastos.

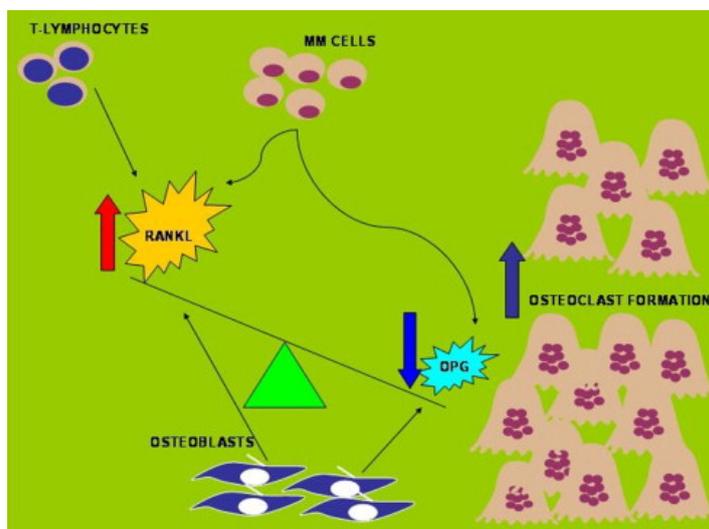


Figura 2. Las células plasmáticas y las células T secretan RANKL para inducir la formación de osteoclastos (OCL). Además, células de MM suprimen la osteoprotegerina (OPG) en el microambiente de la médula. Esto se traduce en un desequilibrio grave del cociente RANKL/OPG que conduce a la osteoclastogénesis. Tomado de G David R Goodman. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. Volume 20, Issue 4, December 2007

Por el contrario, la actividad osteoblástica está marcadamente suprimida en el MM, probablemente debido a la producción por las células mielomatosas de IL-3, IL-7 y de la proteína relacionada con la moléculas dickkopf 1 (DKK1, del inglés *dickkopf-related protein*), que inhibe la vía de señalización *Wnt* que es la vía normal de diferenciación de los osteoblastos (Roodman GD, 2009).

1.1.3 CLASIFICACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Las gammapatías monoclonales se clasifican en dos grandes grupos: benignas y malignas (Tabla 1). El grupo internacional de mieloma (IMWG, del inglés *International Myeloma Working Group*) publicó un documento consenso en el año 2003 donde se establecían los criterios de diagnóstico y la clasificación de las discrasias de CPs y trastornos relacionados (Kyle RA *et al.*, 2003) y posteriormente una actualización en 2010 (Kyle RA *et al.*, 2010).

Tabla 1. Clasificación de las gammapatía monoclonales

Gammapatías monoclonales benignas
Gammapatía monoclonal de significado incierto
Gammapatías monoclonales secundarias
Gammapatías monoclonales malignas
Mieloma múltiple sintomático
Mieloma múltiple quiescente o Smoldering myeloma
Leucemia de células plasmáticas
Mieloma no secretor
Síndrome de POEMS (mieloma osteoesclerótico)
Plasmocitoma localizado (óseo o extramedular)
Macroglobulinemia de Waldenström
Enfermedades de cadenas pesadas (α , μ , γ , δ)
Amiloidosis primaria

1.1.4 ESTUDIOS DE CITOGENETICA EN LAS GAMMAPATIAS MONOCLONALES

El estudio citogenético aporta información para el pronóstico y la estratificación, por lo que debe incluirse en la evaluación inicial del paciente con MM.

El bajo índice proliferativo de la CP dificulta en gran medida la obtención de cariotipos informativos en el MM (Debes-Marun, 2002). La detección de un cariotipo anormal en MM se correlaciona con un elevado índice proliferativo que refleja la agresividad de la clona y una elevada infiltración plasmocelular en la MO (Rajkumar, 1999). Por este motivo, los cariotipos anormales son infrecuentes en MGUS, mientras que se observan en el 30-40% de los mielomas diagnosticados de novo, en cerca de 60% de los MM en recaída y hasta en el 80% de las leucemias de células plasmáticas (Avet-Loiseau *et al.*, 2001). Generalmente los cariotipos son complejos, con anomalías tanto numéricas como estructurales, aunque no se ha llegado a identificar una anomalía específica de la enfermedad. Un problema adicional radica en que algunas de las anomalías cromosómicas más importantes pueden ser crípticas como la t (4; 14) (p16.3; q32) y la t (14; 16) (q32; q23).

A pesar de estas limitaciones, la citogenética convencional resulta muy útil para la detección de anomalías numéricas (Debes-Marun *et al.*, 2003) y nos permite clasificar a los MM en dos grandes subgrupos: hiperdiploides y no hiperdiploides. Las principales anomalías cromosómicas recurrentes numéricas y estructurales descritas en el MM se detallan en la Tabla 2.

La dificultad para obtener metafases de las células plasmáticas, limita en gran medida la obtención de información citogenética importante para el pronóstico y tratamiento de la enfermedad, aunque en buena medida se puede subsanar mediante el uso de la técnica de FISH ya que permite el estudio de núcleos en interfase. Con esta técnica se han podido demostrar anomalías cromosómicas numéricas hasta en el 90% de los MM (Debes-Marun *et al.*, 2003). La FISH también ha demostrado ser de utilidad para el estudio de las translocaciones del gen de la IGH, evidenciando una incidencia superior al 50% tanto en pacientes con MM como con MGUS (Fonseca *et al.*, 2003).

Tabla 2. Anomalías cromosómicas más frecuentes en MM

Alteraciones numéricas	
Ganancias de los cromosomas: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 19, 21	
Pérdidas de los cromosomas: 8, 13, 14, 16, 22, X, Y	
Alteraciones estructurales	
1q	trisomías parciales
1p	deleciones
14q	t(11;14)(q13;q32)
8q	t(8;14)(q24;q32)
	t(8;22)(q24;q11)
	t(2;8)(p12;q24)
11q	t(11;14)(q13;q32)
	Ganancias
6q	deleciones
16p o 16q	t(1;16)(q11;q11)
22q11	deleciones
19q y 19p	translocaciones

Igualmente se ha observado una elevada incidencia de alteraciones en el cromosoma 13 (monosomías y deleciones intersticiales) así como deleciones de 17q13. En la Tabla 3, se revisan las principales alteraciones citogenéticas detectadas mediante FISH y con mayor trascendencia clínica.

Tabla 3: Principales alteraciones citogenéticas detectadas mediante FISH

Alteración	Genes involucrados	Frecuencia
Translocaciones de IGH		50-73%
t(11;14)(q13;q32)	CCND1/IGH	15%
t(4;14)(p16;q32)	FGFR3-MMSET/IGH	15%
t(14;16)(q32;q23)	IGH/C-MAF	6%
t(6;14)(p21;q32)	CCND3/IGH	3%
t(14;20)(q32;q11)	IGH/MAFB	2%
Monosomía/delección 13	RB1	30-55%
Delección 17p13	P53	10%
Ampliación 1q21	CKS1B	30-40%

1.1.4.1 ANOMALÍAS CITOGENÉTICAS ESPECÍFICAS

a) **Translocaciones relacionadas con el locus de las inmunoglobulinas (IGH e IGL):** Las translocaciones de IGH pueden ser fenómenos primarios en la génesis de las gammapatías monoclonales o pueden ser fenómenos tardíos asociados a la progresión (translocaciones secundarias) (Kuehl *et al.*, 2005). Las translocaciones primarias se detectan en aproximadamente el 40% de los pacientes con MM y están involucrados a cinco regiones cromosómicas recurrentes: 4p16.3 (FGFR3 y MMSET, 15%), 11q13 (ciclina D1, 15%), 16q23 (c-MAF, 6%), 6p21 (ciclina D3, 3%), 20q11 (MAF-B, 2%) (Tabla 3). La consecuencia de las translocaciones es la disregulación o aumento de expresión de determinados oncogenes. La prevalencia de las translocaciones de IgH en las GMs varían según el estado de la enfermedad: aproximadamente el 50% de las MGUS o SMM, el 55-70% de los MM y el 80% de las leucemias de células plasmáticas (Fonseca *et al.*, 2003). Aproximadamente en el 10% de los pacientes con MGUS y en el 20% de los pacientes con MM, se producen translocaciones de IGL. Cabe destacar que dichas translocaciones involucran en general a IgL lambda, mientras que las translocaciones IgL kappa son menos frecuentes.

El paradigma de las translocaciones secundarias son las que afectan al gen c-MYC (8q24), translocaciones que son raras en las MGUS, sin embargo están presentes en el 15% de los MM y el 45% de los MM avanzados.

b) **t(4;14)(p16;q32):** Puede ser detecta en el 15% de los MM mediante FISH o RT-PCR, pero no por citogenética convencional. Esta alteración se asocia a una expresión aumentada de los genes FGFR3 (del inglés *fibroblast growth factor receptor 3*) y MMSET (del inglés *multiple myeloma SET domain*), y a una pobre supervivencia, independientemente de la modalidad del tratamiento. Sin embargo, el valor pronóstico de esta translocación ha sido cuestionada en series de pacientes tratados con Bortezomib (Zhan F *et al.*, 2006). También, parece existir asociación entre t(4;14)(p16;q32) y el isotipo IgA, la cadena ligera λ y muy alta prevalencia de anormalidades del cromosoma 13 (deleciones o monosomías) (R Fonseca *et al.*, 2009).

- c) **t(11;14)(q13;q32)**: La prevalencia en MM es del 15% y produce un aumento en la expresión de la ciclina D1. Se asocia con la expresión de CD20, morfología linfoplasmocítica, variante MM oligosecretor y con MM de cadenas libres lambda. Esta translocación también puede observarse en MGUS. En la mayoría de los trabajos parece estar asociado a un pronóstico favorable (Fonseca R *et al*, 2009).
- d) **t(14;16)(q32;q23) y anormalidades en 16q**: Es detectable en el 5-7% de los MM e igual que la t(4;14) no se detecta mediante análisis de cariotipo. Esta translocación se ha asociado a sobreexpresión de c-MAF, a mayor frecuencia de delección en cromosoma 13, isotipo IgA y al menos en dos series a evolución clínica más agresiva (Fonseca *et al.*, 2003). Más recientemente en una serie de 1003 pacientes no se ha podido demostrar un impacto negativo de la misma.
- e) **Aberraciones del cromosoma 1**: Las anomalías en el cromosoma 1 son altamente prevalentes en el MM y afectan principalmente al brazo largo (1q) (Shaughnessy JD *et al.*, 2007). Tanto las anormalidades del brazo corto como del largo se asocian a menor supervivencia y aunque todavía no está claro como el cromosoma 1 participa en la generación de clones biológicamente más agresivos, las anomalías en el mismo, continúan siendo importantes para establecer el pronóstico de los pacientes.
- f) **Delección/monosomía del cromosoma 13**: Se trata de la pérdida de material genético más frecuente en el MM, tanto si se utilizan técnicas de citogenética convencional como de FISH. Aparece en el 40-50% de los MM, la mayoría de las veces (85%) como monosomía y el resto (15%) como delección intersticial. Sin embargo, hay controversia respecto a su valor pronóstico ya que podría venir de su estrecha asociación con características genéticas de alto riesgo, por ejemplo t(4;14) (Fonseca R *et al.*, 2009). Cada vez más, los datos sugieren un papel crucial del cromosoma 13 como prerrequisito para la expansión clonal de tumores pues casi el 90% de los casos con translocación t(4;14) albergarán delección del cromosoma 13. Sin embargo el cromosoma 13, una vez excluido su asociación con t(4;14), parece tener un pronóstico neutro.
- g) **Delección de 17p (p53)**: El factor citogenético más importante para el pronóstico es la pérdida de 17p13 (locus P53). En todas las series analizadas su pérdida confiere un efecto muy negativo sobre la supervivencia. En otros estudios, además

se ha observado que la enfermedad presenta un curso clínico más agresivo y una mayor prevalencia de enfermedad extramedular e hipercalcemia. Además predice una corta duración de la respuesta al tratamiento tanto convencional como al trasplante de progenitores hematopoyéticos. La delección 17p13 es infrecuente en MGUS, y se detecta sólo en el 10% de los pacientes con MM.

- h) **Aneuploidía:** Gran número de MM y MGUS presentan aneuploidía, de hecho, la presencia de esta es independiente de que la enfermedad corresponda a MGUS o MM. Las alteraciones en la ploidía son estables en el tiempo, de tal manera que los pacientes con MM permanecen hiperdiploides en el transcurso de la enfermedad. Los MM hiperdiploides (MM-h) (aproximadamente el 60% de casos) se asocian a trisomías recurrentes que implican a cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11 y 19), a baja prevalencia de translocaciones de IGH y a un curso clínico más favorable. Los MM no hiperdiploides (MM-nh) (aproximadamente el 40% de casos) pueden ser hipodiploides (44/45 cromosomas), pseudodiploides (44/45 a 46/47 cromosomas) o casi tetraploides (≥ 75 cromosomas) y se caracterizan por una prevalencia muy elevada de translocaciones de IgH comparado con los MM-h (70% vs 30%) y corta supervivencia. Las translocaciones secundarias de IgH, por el contrario, ocurren con la misma frecuencia en ambos tipos de MM.

1.2 ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO EN DISCRASIAS

La citometría de flujo (CMF) se ha consolidado como herramienta útil para demostrar clonalidad de forma sensible, específica y objetiva, así como para evaluar la respuesta terapéutica y la progresión en fases preclínicas o avanzadas de la enfermedad. Entre las aplicaciones de la CMF para el estudio de las GMs se pueden incluir:

- 1) Identificación diferencial de las CPs tumorales de las reactivas y sanas.
- 2) Evaluación de marcadores de valor pronóstico.
- 3) Identificación del riesgo de progresión de MGUS y SMM.
- 4) Evaluación de la enfermedad mínima residual y la respuesta al tratamiento.

En este sentido, aunque el recuento de CPs mediante CMF generalmente proporciona valores inferiores a los estimados por microscopía, existe una correlación significativa entre ambas técnicas (Paiva *et al.*, 2009b). Por otro lado, es posible detectar CPs aberrantes/clonales (aCPs) circulantes en sangre periférica en una elevada proporción de pacientes con MM (>80%) y, aunque con menor frecuencia también en pacientes con MGUS (20%)(Kumar *et al.*, 2005). Este dato tiene, además de valor diagnóstico valor pronóstico, de manera que se ha visto que la supervivencia global (SG) disminuye a medida que se incrementan las cifras de CPs detectadas en sangre periférica(Nowakowski *et al.*, 2005a).

1.2.1 MARCADORES DE UTILIDAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DIFERENCIAL DE CÉLULAS PLASMÁTICAS PATOLÓGICAS POR CMF.

Los marcadores más utilizados en CMF para la identificación de las CPs en humanos son CD38 y CD138. Las CPs son células que suelen presentar elevado tamaño (FSC elevado, del inglés *Forward side scatter*) y elevada/intermedia complejidad celular/granulación citoplasmática (SSC elevado, del inglés *Side scatter*). La expresión de marcadores de valor diagnóstico y pronóstico sobre las CPs sanas y patológicas se han detallado en la Figura 3.

CD38: es una glicoproteína con actividad enzimática que se encuentra ampliamente distribuida en todas las líneas hematopoyéticas, especialmente en sus etapas tempranas de maduración y tras su activación. Hay que destacar el elevado nivel de expresión que adquiere CD38 tanto en CPs sanas como en patológicas, lo que permite diferenciarlas del resto de leucocitos (Bataille R *et al.*, 2006; Raja KR *et al.*, 2010). Además, la expresión de CD38 suele estar reducida en CPs de pacientes con MM respecto a las CPs sanas.

CD138 (Sindecano-1): es una glicoproteína transmembrana con actividad enzimática de la familia del heparán-sulfato. Se expresa en CPs, células epiteliales, mesenquimales y carcinomatosas. CD138 es un receptor de diversos factores de crecimiento de especial relevancia para las CPs cuya expresión aparece tardíamente en la diferenciación de los linfocitos B, y se detecta a partir del estadio de plasmoblasto. La tinción con anticuerpo anti-CD138 en leucocitos, permite identificar de forma específica todas las CPs, aunque su expresión puede estar incrementada o disminuida

en las CPs patológicas en comparación con las sanas. Esta molécula se libera al plasma por CPs apoptóticas pasando a ser una molécula soluble cuya presencia en suero permite estimar la masa tumoral y del índice apoptótico (espontáneo e inducido)(Bataille R *et al.*, 2006; Raja KR *et al.*, 2010).

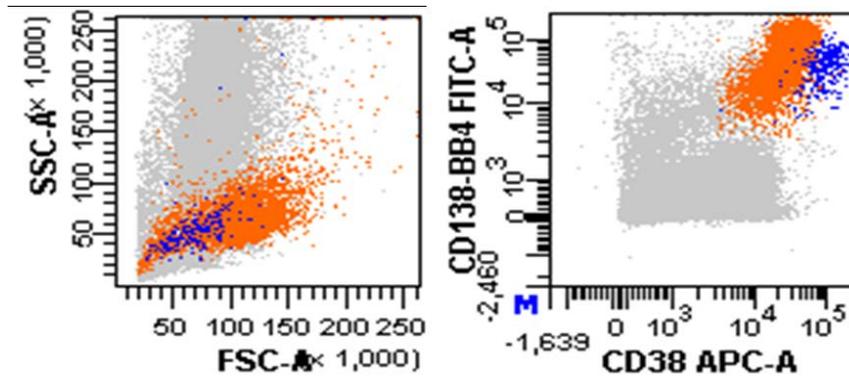


Figura 3. Representación en gráficos de puntos de células procedentes del aspirado de médula ósea de un paciente con Mieloma múltiple(dot plots). En el gráfico de la izquierda se representa *Forward scatter* (FSC) y *Side scatter* (SSC) correspondientes al tamaño y a la granulación/complejidad celular, respectivamente. Se pueden detectar dos poblaciones de células plasmáticas (CPs), CPs sanas (azul) con menor FSC (0.37% del total celular) y patológicas (naranja) con mayor FSC (7.35% del total celular). En el gráfico de la derecha se representan los marcadores CD138 (conjugado con Fluoresceína) y CD38 (conjugado con Alociocianina). Ambas poblaciones de CPs son CD138+ aunque las CPs sanas (azul) tienen mayor intensidad de CD38 que las patológicas (naranjas).De los Reyes N *et al*, *Revista de hematología* Vol12,nº2,2011

CD19: es un marcador de línea B de gran utilidad para diferenciar las CPs patológicas de las sanas. En la mayoría de los pacientes con MM (97'5%) se manifiesta una pérdida de la expresión de CD19sobre las CPs patológicas, mientras que las CPs sanas habitualmente retienen la expresión de este marcador (Bataille R *et al.*, 2006; Raja KR *et al.*, 2010). Algunos pacientes con MM presentan una población de CPs patológicas que retienen marcadores de linfocitos B, como CD20 y, más raramente CD19, aunque no se conocen casos de co-expresión de ambos. En los pacientes con una población de CPs CD19+ o CD20+ se detecta una mayor asociación con reordenamiento t(11;14), diploidía y buen pronóstico. Por otro lado, el fenotipo (CD19-CD20-CD27-) se relaciona con reordenamientos de IgH de pronóstico adverso, t(4;14) y t(14;16), y a ausencia de hiperdiploidía.

La expresión de CD20 también se asocia a CPs pequeñas, la de CD28 con del(17p) y a t(14;16) e igualmente la del(13q) y t(4:14) se han asociado a la falta de expresión de CD117.

CD56: molécula de adhesión perteneciente a la superfamilia de las Ig, típicamente asociada a las células NK (*Natural Killer*). Es uno de los marcadores más característicos que definen a las CPs patológicas. Se expresa de forma aberrante en las CPs del 78% de los pacientes de MM, mientras que en las CPs sanas y en las células de la leucemia de CPs, su expresión es más restringida (Bataille R *et al.*, 2006; Raja KR *et al.*, 2010). La expresión de CD56 parece estar en relación con el nicho de localización de las CPs. De hecho, CD56 es una molécula de adhesión entre las CPs y entre éstas y los osteoblastos. Además, el fenotipo CD56⁻ se asocia a ausencia de osteolisis, a isotipo de cadena ligera λ y con mal pronóstico.

1.2.2 MARCADORES DE VALOR PRONÓSTICO

CD27: Marcador de memoria inmunológica, cuya expresión suele restringirse a células linfoides del centro germinal, células memoria y CPs sanas. La expresión de CD27 en CPs patológicas está claramente disminuida en el 50% de los pacientes (Bataille R *et al.*, 2006; Raja KR *et al.*, 2010). Cuando su expresión se mantiene en niveles normales, se asocia a un mejor pronóstico. Por otro lado, se ha descrito que CD27 reduce su expresión con la progresión de la enfermedad.

CD28: Esta es una molécula presente con normalidad en linfocitos T, su expresión es aberrante en CPs patológicas en el 47,8% de los pacientes (Bataille R *et al.*, 2006; Raja KR *et al.*, 2010). En linfocitos T, CD28 se implica en la activación celular y en la secreción de citoquinas, pero se desconoce su función en las CPs de pacientes con MM. No obstante, su expresión se asocia a una peor evolución (progresión de la enfermedad por aumento del riesgo de recaída).

CD45: Marcador asociado a malignidad y a pronóstico adverso. Es una tirosina-fosfatasa de expresión casi universal en las células del sistema hematopoyético o “marcador panleucocitario”. Se expresa intensamente en las CPs sanas, pero su expresión se reduce o se negativiza en las CPs patológicas. Se ha descrito, además, que las CPs en proliferación tanto sanas como patológicas presentan una expresión intermedia de CD45(CD45^{intermedias}) y que existe una correlación entre el índice de proliferación y CD45, que se confirma por estar a su vez inversamente relacionada con la presencia de Bcl-2, una proteína que regula la apoptosis celular

(Bataille R *et al.*, 2006). Además CD45 se relaciona con otra molécula asociada a malignidad, CD221 o IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*).

Los estudios clínicos revelan que la ausencia de CD45 en CPs patológicas se asocia a peor pronóstico y que aparentemente, la ausencia CD45 favorece la activación de la proteína-quinasa AKT, una molécula relacionada con la supervivencia celular mediada por IGF-1 e insulina.

CD117: Es el receptor de c-Kit o *cytokine stem cell factor* y se expresa de forma natural en células progenitoras de estirpe mieloide y de forma anormal en CPs patológicas en un 30% de los casos. La expresión de CD117 en CPs patológicas se asocia a hiperdiploidía, a ausencia de translocaciones y a mejor pronóstico (Bataille R *et al.*, 2006).

CD200 (OX-2): Es una glicoproteína de membrana de carácter inmunoregulador que al interactuar con su receptor (CD200R o OX-2R) suprime la respuesta mediada por células T. De hecho se ha demostrado que los pacientes que muestran expresión positiva de CD200 sobre sus CPs patológicas tienen una supervivencia libre de eventos más reducida (14 meses) comparada con los que no la expresan (24 meses) tras terapia y trasplante. Además, es un parámetro pronóstico independiente del estadio clínico y de los niveles de β 2-microglobulina sérica (Moreaux J *et al.*, 2006).

CD221 se expresa de manera aberrante en CPs de MM, por lo que los pacientes con fenotipo CD221++ muestran supervivencias más cortas (Bataille R *et al.*, 2006). Además su expresión se asocia a translocaciones de mal pronóstico t(4;14) y t(14;16).

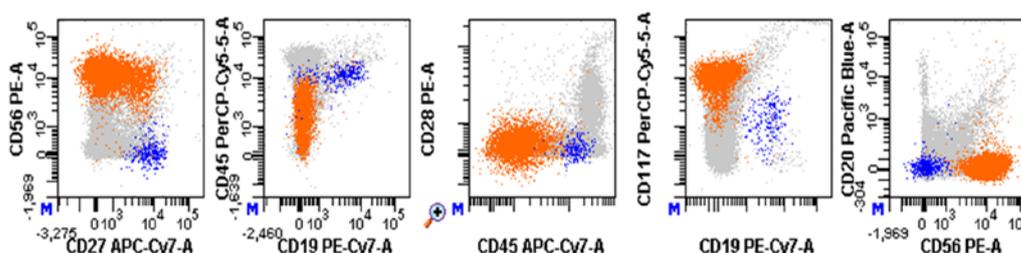


Figura 4. Representación en gráficos de puntos de marcadores de malignidad y pronóstico. Las CPs sanas (azul) muestran un fenotipo CD56- CD27++ CD45++ CD19+/- CD28- CD117-/+ CD20-, mientras que el fenotipo de las CPs patológicas (naranja) es CD56++ CD27+/- débil CD45+débil/- CD19- CD28- CD117++ CD20-. De los Reyes Net al, Revista de hematología Vol12,nº2,2011.

En resumen, aunque el fenotipo de las CPs, tanto normal como mielomatosas, es variable y en parte condicionado por el grado de diferenciación celular, existen rasgos fenotípicos característicos que nos permiten distinguirlas. Comparadas con las CPs normales, las mielomatosas muestran una expresión incrementada de CD56 y CD138, mientras aparece disminuida para CD38 y negativa para CD19 y CD45 (Figura 4). Otros antígenos también negativos son CD20 y CD117 o que se expresan débilmente como CD28 y CD33 en CPs normales, pueden tener una expresión fuerte en CP mielomatosas en un número variable de casos.

1.2.3 CLONALIDAD DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS

El estudio de las inmunoglobulinas citoplasmáticas (IgCit), tanto de cadenas ligeras (kappa y lambda) como pesadas (IgA, IgD, IgG e IgM) permite establecer por un lado, la clonalidad de las CPs patológicas y diferenciarlas de las CPs sanas de distribución policlonal y por otro, identificar la presencia de múltiples líneas de CPs patológicas (Figura 5). Para la correcta identificación de la presencia de más de una línea de CPs patológica es necesario incluir en el panel de marcadores, tanto cadenas ligeras como pesadas y, a ser posible, una combinación de ambas. Por otro lado, cuando el fenotipo de membrana no permite diferenciar las CPs patológicas de las sanas, el estudio de la IgCit puede ayudar a establecer la relación de CPs patológicas/sanas.

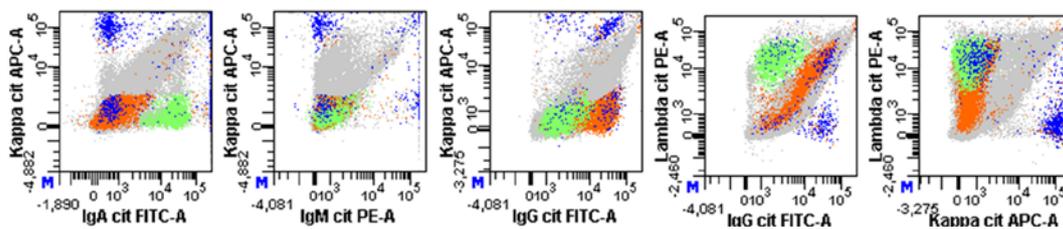


Figura 5. Representación en gráficos de puntos de las inmunoglobulinas citoplasmáticas. Las CPs sanas (azul) muestran una distribución policlonal tanto de las cadenas ligeras (kappa y lambda) como de las pesadas (IgA, IgG e IgM). Sin embargo, se pueden diferenciar dos líneas de CPs patológicas, una monoclonal de tipo IgA/Lambda (verde claro) y otra monoclonal de tipo IgG/Lambda (naranja). *De los Reyes N et al, Revista de hematología Vol12,nº2,2011.*

1.2.4 ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Y CONTENIDO DE ADN.

El análisis del ciclo celular de las CPs mediante CMF y doble tinción con yoduro de propidio y anti-CD38, aporta información sobre dos aspectos complementarios en el diagnóstico y pronóstico de las gammapatías. Por un lado, la identificación de anormalidades cromosómicas numéricas (aneuploidía) y por otro, la estimación del índice de proliferación de las CPs (Figura 6). Diversos trabajos han puesto de manifiesto que la determinación del contenido de ADN mediante CMF es un parámetro de utilidad para la evaluación clínica en MM ya que entre el 50% y el 70% de los pacientes de MM presentan aneuploidías, la mayoría de las veces por hiperdiploidía con ganancia de cromosomas, típicamente trisomías, y con menor frecuencia por hipodiploidía con pérdida de cromosomas. Generalmente la hiperdiploidía se asocia a mejor pronóstico, mientras que las hipodiploidías lo hacen a una peor evolución. La diploidía tiene un efecto neutro, salvo que se asocie a translocaciones de buen pronóstico t(11;14) o de mal pronóstico t(4,14) y t(14;16).

El análisis del ciclo celular por citometría ha permitido comprobar que la existencia de valores superiores al 3% de CPs en fase de síntesis (fase S) se asocia a pronóstico más adverso y que este es un parámetro independiente de la supervivencia en pacientes con MM. Por otro lado, San Miguel *et al.* describen que el número de CPs en fase S, junto a otros marcadores pronóstico como β 2-microglobulina, edad y estado del paciente, son de gran utilidad para la correcta estratificación de los pacientes de MM (San Miguel JF *et al.*, 1996).

Aunque los pacientes con MM suelen tener CPs con mayores índices de proliferación que los pacientes con MGUS o SMM, este no es un dato que permita una clara discriminación de este tipo de patologías.

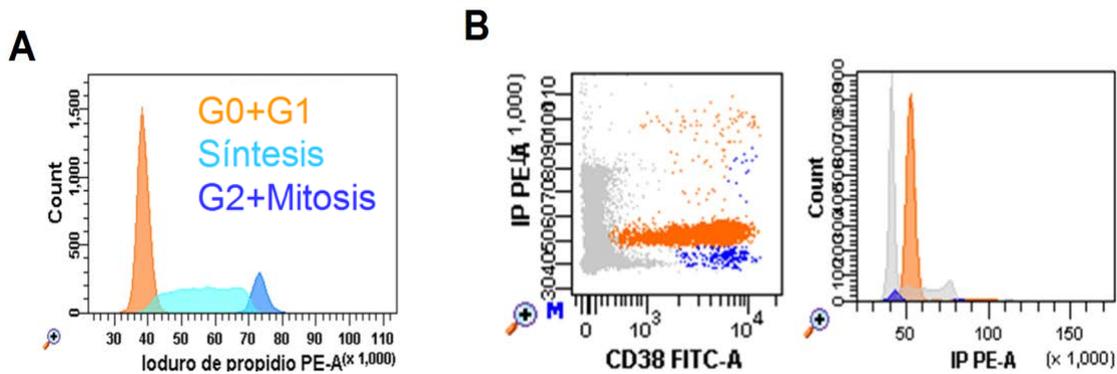


Figura 6. Análisis del ciclo celular y del contenido de ADN mediante citometría de flujo por doble tinción con ioduro de propidio (IP, contenido de ADN) y CD38 (CPs) de células de médula ósea paciente con MM. A) Histograma que muestra el contenido de ADN y la distribución en los diferentes estadios del ciclo celular, fase G0+G1 (Naranja), fase de síntesis (azul claro, S) y fase G2+M (azul oscuro) en las células no plasmáticas de la médula ósea. Se considera como “índice de proliferación celular” a la suma de las células en fase S y G2+M. B-izquierda) Gráfico de puntos que representa el ciclo celular de las CPs CD38++ sanas (azul) y patológicas (naranja) y del resto de células no-plasmáticas (gris). Las CPs sanas (azul) muestran un contenido de ADN diploide mientras que las CPs patológicas (naranja) son hiperdiploides. Además, se aprecia que parte de las CPs tanto sanas como patológicas se distribuyen en las diferentes fases del ciclo celular y por tanto se desplazan hacia arriba al tener mayor contenido en ADN y una mayor tinción con IP. B-derecha) representación en histograma del ciclo celular de las células que se muestran en el gráfico de puntos. *Natividad de los Reyes et al, Revista de hematología Vol12,nº2,2011.*

1.2.5 VALOR PRONÓSTICO DEL ÍNDICE DE APOPTOSIS DE LA CP PATOLÓGICA

En los estadios iniciales de la patogenia del MM tiene lugar una disregularización del ciclo celular que conduce a la expansión de la clona tumoral. De manera tradicional, se ha relacionado el MM con una patología de alta proliferación. Sin embargo, estudios recientes revelan que solo un pequeño porcentaje de la clona patológica prolifera y es la pérdida de control en la apoptosis o muerte celular programada de las CPs tumorales lo que lleva a su acumulación y al desarrollo de la enfermedad (Minarik J *et al.*, 2009).

Las nuevas terapias como el bortezomib, la talidomida o lenalidomida, poseen potentes mecanismos de acción como inductores de apoptosis. Sin embargo, hasta ahora han sido muy escasos los estudios dirigidos a evaluar el impacto del índice de apoptosis de las CPs patológicas en la evolución de la enfermedad y en la eficacia de las terapias. En la actualidad, la CMF permite un análisis rápido y sencillo, basado en la detección de moléculas de fosfatidil-serina en la membrana celular de las CPs mielomatosas mediante la utilización de **Anexina-V**(Figura 7). De hecho, la Anexina-V es un marcador ideal por reflejar el estado apoptótico de las células, con independencia de que el origen del estímulo que la indujo sea intrínseco o extrínseco.

Estudios recientes parecen demostrar que la estimación del índice de apoptosis en las CPs patológicas es un parámetro independiente y de gran valor predictivo sobre el pronóstico. De tal forma que pacientes con valores superiores a 4,5% de CPs apoptóticas, manifiestan una supervivencia total de 38 meses de media, mientras que esta desciende hasta los 16 meses en aquellos en los que se detecta un valor 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 estos nuevos fármacos ha reducido significativamente la capacidad predictiva de los factores pronósticos clásicos como la citogenética y las características proliferativas de las CPs, la evaluación del índice de apoptosis de las CPs por citometría se perfila como un marcador pronóstico de gran utilidad en el futuro.

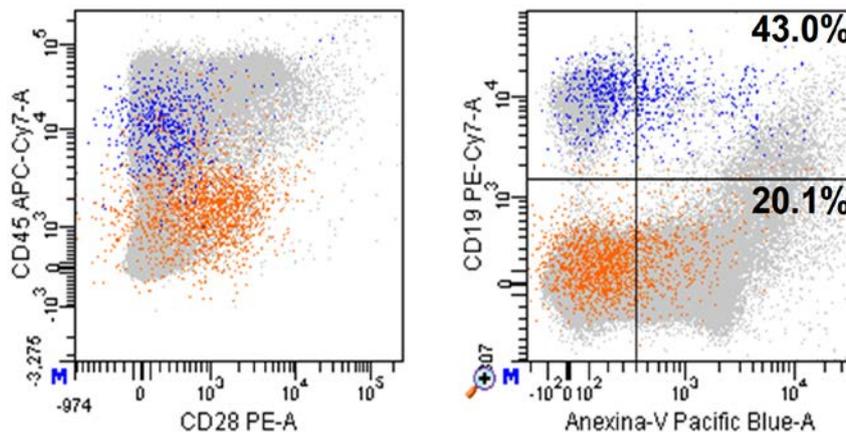


Figura 7. Estimación del índice de apoptosis en CPs sanas CD19+ CD45+ CD28- (azul) y patológicas CD19- CD45-/débil CD28+/- (naranja) en un paciente con gammapatía monoclonal. En el gráfico de puntos de la izquierda se muestra una representación de los parámetros CD45 vs CD28 y en el de la derecha una representación de CD19 vs Anexina-V. Las CPs sanas tienen un índice de apoptosis más elevado (43%) que las patológicas (20.1%).

1.2.6 DISCRIMINACIÓN CITOMÉTRICA DE MIELOMA Y OTRAS GAMMAPATÍAS

Existen diversas patologías que involucran células con diferenciación plasmocitoide y CM en suero: MM, SMM, MGUS, Macroglobulinemia de Waldenström y/o linfoma linfoplasmocitoide, plasmocitoma, leucemia de células plasmáticas, linfoma de la zona marginal y amiloidosis-AL. El análisis del fenotipo de las células patológicas en cada caso, mediante CMF, permite diferenciar dichas patologías.

Quizás, el parámetro que permite una mejor discriminación entre MM, SMM y MGUS, a parte de los parámetros clínicos y serológicos, es la relación entre número de CPs sanas y patológicas. En MGUS y SMM la coexistencia de CPs sanas y patológicas es habitual, pero es raro en MM. De hecho un 82% de los pacientes de MGUS y un 40% de pacientes de SMM muestran más del 5% de CPs sanas. Así, el parámetro que mejor parece discriminar los pacientes con MGUS de los pacientes con MM es la relación existente entre CPs sanas y patológicas, inferior o superior al 3%, respectivamente (Ocqueteau *et al.*, 1998). En este estudio del Grupo Español de Mieloma, se puso de manifiesto además que el riesgo de progresión a MM de los pacientes con MGUS y SMM era del 25% y 63% respectivamente, si las CPs patológicas eran superiores al 95%, frente al 5% y 8%, respectivamente, para valores de CPs patológicas inferiores al 95%. Más recientemente Han demostrado que pacientes con MM con relación de CPs sanas/patológicas superior al 5% tenían mejor pronóstico, menor frecuencia de citogenética de alto riesgo, mejores respuestas al tratamiento y mejores supervivencias libres de progresión y total (Paiva B *et al.*, 2009).

Por otro lado, las características fenotípicas de las CPs monoclonales suelen ser diferentes en MGUS y el MM. Generalmente las CPs monoclonales en MGUS, a diferencia del MM, suelen retener la expresión de CD19 y CD27 y su pérdida se asocia con progresión a MM. Además la expresión de CD28 en MGUS es rara (19% de los pacientes) y habitualmente débil (Raja KR *et al.*, 2010). Para discriminar MM de otras patologías de CPs es importante analizar la expresión de las moléculas CD19, CD45 y CD56.

1.2.7 UTILIDAD DEL ANALISIS DE INMUNOFENOTIPO EN SANGRE PERIFÉRICA

La presencia de CPs circulantes es un factor pronóstico en pacientes de nuevo diagnóstico con MM, SMM y MGUS (Witzig TE, 1994; Billadeau D *et al.*, 1996). En una elevada proporción de pacientes con mieloma múltiple (46-80%) es posible detectar células plasmáticas patológicas circulando en la sangre periférica, y aunque en menor frecuencia, también en pacientes con SMM (50%) y MGUS (20-25%) (Kumar Set *al.*, 2005, Paiva *et al.*, 2010). Este dato tiene además, valor diagnóstico y pronóstico, de manera que la SG disminuye según se incrementan las cifras de CPs detectadas en la sangre de pacientes con MM (Nowakowski GS *et al.*, 2005b; Kumar S *et al.*, 2005) y tiene significado pronóstico también para la progresión a SMM (Paiva B *et al.*, 2010). Grzegorz *et al.* demuestran en 2005 que el número de células plasmáticas circulantes detectadas por CMF es un factor pronóstico independiente en los pacientes de MM diagnosticados de novo. Con todo, la presencia de las células plasmáticas circulantes es independiente de la masa del tumor y probablemente refleja las diferencias en la biología del tumor (Grzegorz S *et al.*, 2005). Existen resultados contradictorios respecto a la relación entre la frecuencia de CPs en SP y la carga tumoral, estadio de la enfermedad o anomalías citogenéticas (Paiva *et al.*, 2010).

Bianchi *et al.* sugieren que los pacientes diagnosticados de SMM con niveles altos de CPs circulantes, tienen más elevado riesgo de progresión en los primeros 2-3 años del diagnóstico que aquellos que no las presentan (Bianchi *et al.*, 2013). La presencia de CPs circulantes, especialmente cuando se combina con el tamaño de la proteína M, han sido capaces de construir un modelo de estratificación (Bianchi *et al.*, 2013).

La presencia de CPs circulantes, en combinación con otros factores pronóstico conocidos como la concentración del CM y el isotipo de la Ig, identifican un grupo de individuos con MGUS con mayor riesgo de progresión a mieloma (Kumar Set *al.*, 2005, 2013).

Por último, el estudio en sangre periférica del grado de activación de linfocitos T también ha demostrado ser útil en pacientes con linfomas y mielomas. Es posible detectar cifras más elevadas de linfocitos T que expresen marcadores de activación CD57+, CD62L-, CD(16+56)+, CD28- en pacientes afectados de MM que en controles

sanos y que en pacientes con MGUS (Van den Hove LE *et al.*, 1998) mostrando una tendencia aumentada a la apoptosis en cultivo.

1.2.8 MONITORIZACIÓN DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

Las técnicas convencionales para evaluar la respuesta al tratamiento en MM no siempre tienen suficiente sensibilidad para identificar de forma temprana pacientes que podrían beneficiarse de nuevas terapias tras el trasplante. Sin embargo, técnicas recientes de biología molecular (ASO-PCR) y las de CMF, sí alcanzan el grado de sensibilidad necesario. Según Rawstron *et al.*, 2002 mediante CMF es posible detectar CPs tumorales a los 3 meses post-trasplante en al menos el 40% de los pacientes. Una vez detectadas, la cifra de CPs tumorales se incrementa hasta alcanzar la progresión clínica. Estos pacientes en los que se detecta la presencia de CPs patológicas tempranamente post-trasplante, o en los que a los 6 meses sólo se detectan CPs patológicas (sin CPs sanas residuales) tienen una supervivencia libre de progresión (SLP) inferior que la de los pacientes en los que no se detectaron.

1.3 GAMMAPATÍAS MONOCLONALES ASINTOMÁTICAS

1.3.1 GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO

El término gammapatía monoclonal de significado incierto fue acuñado por Kyle en 1978 para describir el trastorno más frecuente de las células plasmáticas. Su incidencia aumenta con la edad y en un realizado por este autor informó que la prevalencia de MGUS fue 3.2% y 5,7% en personas mayores de 50 y 70 años, respectivamente (Kyle RA *et al.*, 2006). La prevalencia de MGUS en familiares de primer grado también está incrementada, lo que sugiere la participación de factores genéticos (Landgren O *et al.*, 2009; Vachon CM *et al.*, 2009).

La inclusión de pacientes en esta entidad clínica requiere del cumplimiento de todas y cada una de las siguientes condiciones:

- Presencia de CM en baja cuantía en sangre (<3,0 g/dL) y/u orina (<1,0 g/24 horas).
- Infiltración medular de células plasmáticas en baja cuantía (<10%).

- Ausencia de manifestaciones de daño orgánico como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas (acrónimo de CRAB: C hipercalcemia, R: insuficiencia renal, A: anemia, B (bones): afectación ósea) que puedan ser atribuidas a la proliferación de CPs.

Existen dos tipos de gammapatías monoclonales asintomáticas, progresiva (*evolving*) y no progresiva (*no evolving*), con diferentes historias naturales y probablemente diferentes mecanismos patogénicos. La variante progresiva tiene mayor riesgo de transformación y menor tiempo hasta la progresión y la no progresiva con CM estable y una menor probabilidad de transformación maligna (Rosiñol *et al.*, 2007).

Aunque el MGUS se considera una etapa premaligna de MM, MGUS tiene un riesgo de transformación a mieloma múltiple o enfermedades relacionadas de aproximadamente 1% anual, por lo que los pacientes deben ser monitorizados durante toda su vida para evidenciar progresión (Kyke RA *et al*, IMWG 2003). Predecir qué pacientes, en el momento del diagnóstico, van a mantenerse estables en comparación con los que van a progresar continúa siendo difícil, aunque hay diversos estudios en los que se han descrito biomarcadores que pueden proporcionar información importante. Por primera vez, las guías de IMWG 2010 sugieren la estratificación de riesgo a todos los pacientes con MGUS y SMM y de monitorización según sus categorías de riesgo. (Kyle *et al.*, 2010) (Tabla 4).

Tabla 4. Modelos de estratificación de riesgo para MGUS según Clínica Mayo y el grupo de estudio español.

Factores de riesgo Clínica Mayo	Número de factores riesgo	% de progresión a 20 años
CM>1.5 g/dL	0	5
Tipo no IgG	1	21
FCL ratio<0.26 o >1.64	2	37
	3	58
Factores de riesgo Grupo Español	Número de factores riesgo	% de progresión a 5 años
≥95%aCP en MO por CMF	0	2
Aneuploidía ADN	1	10
	2	46

CM componente monoclonal; MGUS gammapatía monoclonal de significado incierto; FCL: ratio cadenas ligeras κ/λ en suero; aCP células plasmáticas con fenotipo aberrante. *Neha Korde et al, Blood. 2011 May 26; 117(21):5573-81*

Según guías IMWG 2010 los **MGUS de bajo riesgo**, CM<1,5 g/dL, Isotipo IgG y relación de cadenas ligeras libres en suero normal, deberían ser seguidos con proteinograma e inmunoelectroforesis (IEF) cada 6 meses y si está estable cada 2 o 3 años o si aparecen síntomas clínicos. A los pacientes **MGUS de intermedio-alto riesgo**, CM>1,5 g/dL, isotipos IgA o IgM o relación anormal de cadenas ligeras libres en suero, se debe realizar estudio medular basal y seguimiento en 6 meses con proteinograma e IEF y luego anual de por vida (Landgren O, 2010b). El grupo español utiliza la CMF en aspirados medulares para diferenciar CPs normales de las aCPs y estratifica a los pacientes en 3 grupos de riesgo en función de que no tengan ningún factor de riesgo, tengan 1 o 2 de estos factores (Tabla 4).

1.3.2 MIELOMA MÚLTIPLE ASINTOMÁTICO (*SMOLDERING*) O MIELOMA QUIESCENTE

El término mieloma quiescente se aplica a los pacientes que cumpliendo criterios diagnósticos e histológicos de MM, no presentan ninguna de las complicaciones clínicas propias de la enfermedad, como son anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, lesiones osteolíticas, infecciones bacterianas de repetición o plasmocitomas extramedulares.

Esta entidad fue descrita por primera vez por Kyle y Greip en 1980. Posteriormente se han empleado diversos criterios diagnósticos siendo en la actualidad definido por la IMWG en 2003 como aquellas gammapatías que cumplen las siguientes condiciones:

- Presencia de CM en sangre ≥ 3 g/dL y/o,
- Infiltración medular de células plasmáticas $\geq 10\%$ y
- Ausencia de daño orgánico como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas (CRAB) que puedan ser atribuidas a la proliferación de CPs

En esta entidad clínica se incluiría actualmente el mieloma en estadio IA de la clasificación de Durie-Salmon.

Tanto SMM como MGUS no presenta síntomas clínicos. Sin embargo, el SMM tiene que ser distinguido de la MGUS debido a un mayor riesgo de progresión a mieloma o enfermedades relacionadas: 10% por año durante los primeros cinco años,

3% por año durante los siguientes cinco años y 1,5% por año a partir de los 10 años (Kyle RA *et al.*, 2007, 2010)

Los predictores actuales más relevantes de progresión en SMM, son la cantidad de la proteína sérica monoclonal y el porcentaje de CPs en médula ósea (RA Kyle *et al.*, 2007). En base a esto, se desarrolló un modelo de riesgo-estratificación según los siguientes criterios:

- CPs $\geq 10\%$ y proteína monoclonal ≥ 3 g/dL, con un riesgo de progresión del 87% a los 15 años.
- CPs $\geq 10\%$ y proteína monoclonal < 3 g/dL, con un riesgo de progresión del 70% a los 15 años.
- CPs $< 10\%$ y proteína monoclonal > 3 g/dL, con un riesgo de progresión del 39% a los 15 años.

La mediana de tiempo hasta la progresión fue de 2 años, 8 años y 19 años, respectivamente.

La relación de cadenas libres κ/λ en suero es un factor de riesgo independiente para la progresión (Dispenzieri A *et al.*, 2008). Dispenzieri encontró que las cadenas libres en suero proporcionaban una información pronóstica adicional, de manera que una relación anormal de las mismas, definida como menor que 0,125 o mayor que 8, predecía mayor riesgo de progresión.

De modo similar a lo que hemos señalado para la MGUS, la presencia de más de un 95% de aCPs entre las CPs totales en MO detectadas por CMF (aCP/BMPC), junto con inmunoparesis (descenso de inmunoglobulinas policlonales), discrimina 3 grupos en SMM, como podemos ver en la Tabla 5, con un riesgo de progresión a 5 años de 72% (alto riesgo), 46% (riesgo intermedio) y 4% (bajo riesgo), respectivamente, si el paciente tiene 2, uno o ningún factor de riesgo. (Pérez-Persona E *et al.*, 2007)

Tabla 5. Modelo de estratificación del riesgo para SMM según Clínica Mayo y según grupo de estudio español

Clínica Mayo (FR)	Nº factores riesgo (FR)	% progresión a 5 años
CP en MO $\geq 10\%$	1	25
CM ≥ 3 g/dL	2	51
Ratio FLC $< 0,125$ o > 8	3	76
Grupo español (FR)		% progresión a 5 años
$\geq 95\%$ aCPs en MO	0	4
Inmunoparesis	1	46
	2	72

FR factores de riesgo; CP células plasmáticas; CM componente monoclonal; FLC: ratio cadenas ligeras κ/λ en suero. aCP: células plasmáticas con fenotipo aberrante. *Korde et al. blood 2011. Vol 117, nº 21.*

Rosiñol (Rosiñol *et al.*, 2003, 2007) identifica desde el punto de vista evolutivo dos variantes de SMM:

1. *Tipo progresivo*, caracterizado por un aumento continuado del CM, antecedentes de MGUS, mayor frecuencia de paraproteína tipo IgA y rápida evolución a MM sintomático (1.3 vs 3.9 años).

2. *Tipo no progresivo*, caracterizado por un CM estable hasta el momento de la transformación, ausencia de fase previa de MGUS y progresión tardía a MM sintomático.

Para los pacientes con SMM dado su mayor riesgo de progresión, la IMWG 2010 recomienda control a los 2-3 meses tras el diagnóstico y posteriormente cada 4-6 meses por un año y si está estable cada 6-12 meses.

1.4 MIELOMA MÚLTIPLE SINTOMÁTICO

El MM o enfermedad de Kaler es una neoplasia caracterizada por la proliferación de una sola clona de células plasmáticas derivadas de células B. Esta clona prolifera en la MO y frecuentemente invade huesos adyacentes produciendo destrucción esquelética, dando lugar a dolor óseo y fracturas. Ocasionalmente, las CPs infiltran múltiples órganos y producen otros síntomas. El exceso de producción de CM puede conducir a fracaso renal por la proteinuria de Bence Jones (PBJ, proteinuria de cadenas ligeras monoclonales) o hiperviscosidad por su exceso en sangre (Kyle *et al.*, 2003).

El MM representa el 1% de todas las neoplasias y el 13% de neoplasias hematológicas (Rajkumar SV, 2011). La incidencia anual en países occidentales es de 5.6 nuevos casos por cada 100.000 habitantes. La edad media al diagnóstico es de 70 años; 37% son menores de 65 años, 26% tiene entre 65 y 74 años y 37% son mayores de 75 años (Brenner H, 2008; Kumar SK, 2008).

En los últimos años, la introducción de trasplante autólogo y la disponibilidad de fármacos como talidomida, lenalidomida y bortezomib han cambiado el manejo clínico del mieloma e incrementado la supervivencia. En menores de 60 años, la supervivencia a los 10 años se aproxima al 30% (Palumbo, A *et al.*, 2011).

1.4.1 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MIELOMA SINTOMÁTICO

Los criterios diagnósticos de MM según la IMWG 2003 son las gammapatías que cumplen las siguientes condiciones:

- a. Presencia de CM en suero y/u orina (excepto mieloma no secretor).
- b. Presencia de CP clonales en MO o plasmocitoma. Aunque no se define una cifra, si se realiza citometría de flujo, la mayoría de las células plasmáticas (>90%) deben mostrar fenotipo mielomatoso.
- c. Evidencia de daño orgánico o tisular (CRAB): el daño orgánico se define como la presencia de hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas debidas a proliferación celular. Algunos pacientes pueden no tener síntomas pero tener daño orgánico o tisular.

Aproximadamente el 40% de MM sintomáticos tienen CM<3g/dL. Sin embargo, el 97% tendrán CM en suero y/u orina. No hay un nivel mínimo de infiltración medular de CP ya que el 5% de los pacientes con MM tienen <10% de CPs en MO (IMGW, 2003).

1.4.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los síntomas más frecuentes de MM son fatiga, dolor óseo e infecciones recurrentes. El **dolor óseo** constituye la manifestación inicial en el 70% de los casos (Kyle *et al.*, 2003). Generalmente se localiza en esqueleto axial: parrilla costal, columna vertebral o zona proximal de extremidades y es de características mecánicas. La radiografía convencional muestra anormalidades esqueléticas (lesiones líticas, osteoporosis y/o fracturas) en el 80% de los pacientes al diagnóstico (Rajkumar *et al.*, 2005). Los sitios más frecuentemente afectados son las vértebras, cráneo, caja torácica, pelvis, húmero y fémur. Típicamente las lesiones son osteolíticas únicas o múltiples sin reacción osteosclerótica, dando un aspecto en “sacabocados”. También son frecuentes la osteoporosis generalizada y las fracturas patológicas, mientras que las lesiones osteoscleróticas representan el 1% de los casos. Recientemente se ha destacado el valor de la tomografía por emisión de positrones (PET) en la estadificación y el seguimiento de pacientes con mínima o ausente secreción de componente monoclonal.

La **susceptibilidad a las infecciones bacterianas recurrentes** (> 2 episodios en 12 meses), son el resultado del deterioro de la respuesta inmune debido a la reducción de las inmunoglobulinas normales (no monoclonales) y a la neutropenia o a la combinación de ambas (IMGW., 2003). También pueden contribuir a aumentar el riesgo de infecciones, las alteraciones de la inmunidad celular, especialmente las observadas en los linfocitos T, NK y en monocitos. Además, hay una relación directa entre el grado de actividad de la enfermedad y la incidencia de infecciones, siendo mayor el riesgo en los primeros meses tras el diagnóstico y en los pacientes con enfermedad refractaria o en recaída (Augustson *et al.*, 2005). Las infecciones bacterianas recurrentes constituyen una complicación frecuente, siendo la principal causa de muerte (50% de los pacientes). Los microorganismos más frecuentemente implicados son el *streptococcus pneumoniae* y el *haemophilus influenzae*, aunque en pacientes con fracaso renal o enfermedad avanzada, más del 90% de los episodios infecciosos son debidos a bacilos gram negativos o *staphylococcus aureus*. La **fiebre** asociada al propio mieloma es excepcional (1%). La **insuficiencia renal** con niveles de creatinina superiores a 2 mg/dL aparece en el 25-30% de los pacientes en el momento del diagnóstico y es causa de muerte en el 20% de los casos. La etiología es multifactorial, siendo la excreción de cadenas ligeras un factor crítico ya que lesionan directamente las células de los túbulos renales proximales y ello da lugar a una nefritis intersticial pues precipitan en los túbulos renales distales en forma de cilindros causando obstrucción (riñón de mieloma). La hipercalcemia y la deshidratación son los factores que con mayor frecuencia desencadenan una insuficiencia renal.

Alrededor del 10% de pacientes presentan **plasmocitomas extramedulares** en el momento del diagnóstico. La manifestación más grave de un plasmocitoma extramedular es la compresión medular que puede dar lugar a paraparesia o paraplejía que requieren tratamiento urgente. El 20% cursa con **hepatomegalia** y menos del 5% con **esplenomegalia**. Alrededor del 5% tiene **amiloidosis** asociada, que puede manifestarse como síndrome nefrótico, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome del túnel carpiano, polineuropatías e hipotensión ortostática.

1.4.3 DATOS DE LABORATORIO

Una tercera parte de los pacientes presentan **anemia** normocítica-normocrómica, mientras que las cifras de leucocitos y plaquetas suelen ser normales. El origen de la anemia es multifactorial (infiltración medular, insuficiencia renal, y dilucional en caso de CM de gran cuantía). La **hipercalcemia** se encuentra en 15-20% de los pacientes. El aspirado de MO muestra una infiltración por células plasmáticas superior al 5% en el 90% de los pacientes con MM. El proteinograma electroforético sérico y/o urinario presenta una banda homogénea o CM en el 85% casos pero en el 15% restante, la electroforesis sérica es normal o muestra solo una pequeña banda (mieloma de cadenas ligeras, algunos casos de mieloma IgG o IgA con escaso CM y los raros casos de mieloma IgD o no secretor). En la mitad de los casos aparece proteinuria de cadenas ligeras (proteinuria de Bence Jones). El estudio cualitativo de las inmunoglobulinas por inmunofijación (u otras metodologías) resulta imprescindible para identificar la clase de Ig que se produce en exceso y confirmar su carácter monoclonal.

Los tipos de CM más frecuentes en el MM son IgG (50-60%), IgA (20-30%), cadenas ligeras Bence-Jones puro (15-20%), IgD (2%) y el no secretor (1-2%). Los tipos IgE e IgM son excepcionales. En condiciones normales la relación de cadenas ligeras kappa/ lambda es de 2:1, sin embargo en el MM esta proporción está siempre alterada porque todas las cadenas ligeras secretadas por células mielomatosas son Kappa o lambda, con excepción del mieloma IgD que suele ser lambda (Kyle *et al.*, 2003). Los niveles de las Ig normales restantes, no involucradas en el CM, están disminuidas en el 91% de los pacientes con MM, fenómeno conocido como inmunoparesis (Rawstron *et al.*, 1998), pero también están reducidas en el 80% de pacientes con SMM y en 30-40% de los pacientes con MGUS. Las manifestaciones clínicas del mieloma IgD y del de cadenas ligeras son muy similares entre sí, tanto desde el punto de vista clínico como biológico, y presentan mayor riesgo de insuficiencia renal, hipercalcemia y amiloidosis, a la vez que mayor cuantía en la proteinuria de cadenas ligeras que los tipos IgA e IgG.

1.4.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial en MM se plantea frente a la MGUS, el SMM, la amiloidosis y el carcinoma metastásico. Los pacientes con CM sérico inferior a 3g/dL y porcentaje de CPs en médula ósea inferior al 10%, sin lesiones osteolíticas ni anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, plasmocitomas extramedulares o síntomas atribuibles a la gammapatía monoclonal, se diagnostican de MGUS. Los pacientes asintomáticos con un CM sérico igual o superior a 3g/dL o 10% o más de células plasmáticas, sin daño orgánico ni otros síntomas cumplen criterios de mieloma quiescente (IMGW., 2003). En la amiloidosis primaria la proporción de células plasmáticas en médula ósea suele ser inferior al 10%, no existen lesiones osteolíticas y la proteinuria no acostumbra a ser masiva. En pacientes que presentan múltiples lesiones líticas y que no tienen CM sérico o urinario, se debe realizar un estudio inmunohistoquímico de las células proliferantes al objeto de excluir carcinoma metastásico.

1.4.5 PRONÓSTICO

La supervivencia del mieloma es muy variable ya que mientras unos sobreviven sólo unos meses otros lo hacen más de 15 años. Con los modernos tratamientos, la supervivencia de los MM sintomáticos se ha incrementado del 3-5% a 5 años en más del 70% en pacientes elegibles para trasplante y al 50% en pacientes no candidatos a trasplante. La identificación precisa de los pacientes de alto riesgo es el primer paso para mejorar los resultados. El pronóstico de los pacientes con MM depende de la carga tumoral, las características del paciente y la biología de la enfermedad. Para la estratificación del riesgo, se han utilizado diversos factores:

1.4.5.1 FACTORES RELACIONADOS CON LA CARGA TUMORAL/ESTADIO

El sistema de estadiaje establecido por de Durie-Salmon (DS) en 1976 incorpora varios factores correlacionados con la carga tumoral. Este sistema de estadiaje es predictivo del desenlace clínico después de quimioterapia a dosis estándar, no así con el uso de quimioterapia a altas dosis y nuevas drogas, limitándose cada vez más su uso a ensayos clínicos. Posteriormente se publicó el *International*

Staging System (ISS) que utiliza dos parámetros, los niveles de albúmina y el de β 2-microglobulina, estableciendo tres estadios pronósticos con diferentes medianas de supervivencia e independiente del tipo de tratamiento (quimioterapia convencional o trasplante). A diferencia de DS, el ISS solo se debe aplicar a MM sintomáticos, no en MGUS ni SMM y no es un indicador fiable de la carga tumoral. Por lo tanto, el ISS es superior a DS para identificar el subconjunto de pacientes verdaderamente de alto riesgo de los pacientes (Tabla 6).

Tabla 6. Sistemas de estadificación

Estadio	Criterios de Durie-Salmon	Criterios Índice pronóstico internacional (ISS)
I	Todos los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemoglobina >10g/dL ▪ Calcio sérico \leq 12mg/dL ▪ Nº de lesiones líticas: 1 o menos ▪ Bajo CM (alguno de ellos): <ul style="list-style-type: none"> ✓ IgG < 5 g/dL; ✓ IgA < 3 g/dL; ✓ PBJ < 4 g/24h 	β 2microglobulina < 3.5 mg/L Albúmina \geq 3.5 g/dL
II	Ni estadio I ni III	Ni estadio I ni III
III	Uno o más de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemoglobina < 8.5g/dL ▪ Calcio sérico > 12mg/dL ▪ Nº de lesiones líticas \geq 3 ▪ Alto CM (alguno de ellos): <ul style="list-style-type: none"> ✓ IgG > 7 g/dL; ✓ IgA > 5 g/dL; ✓ PBJ > 12 g/24h 	β 2microglobulina \geq 5.5 mg/L

Los pacientes son clasificados en A o B en base a creatinina < 2 o \geq 2 mg/dL

PBJ: proteinuria de Bence-Jones, Ig: inmunoglobulina

Posteriormente se demostró por el grupo francés de mieloma que la citogenética de alto riesgo tiene impacto pronóstico independiente de la ISS, lo que sugiere que la integración de ambos, ISS y la genética, genera un modelo más sólido.

Recientemente, se demostró que la extensión de la enfermedad detectada por resonancia magnética y tomografía de emisión de positrones/tomografía

computarizada (PET/TAC) correlaciona con la carga tumoral y tiene utilidad pronóstica. Estos resultados requieren la confirmación adicional antes de su aplicación clínica (Waheed S *et al.*, 2013).

Hay datos sólidos que demuestran una asociación entre la profundidad de la respuesta al tratamiento y los resultados del mismo a largo plazo, incluyendo la SLP y la SG. La mayoría, pero no todos los estudios muestran que el logro de la respuesta completa (RC) es un objetivo importante para la mejora de la SG (Mateos M-V *et al.*, 2015). Además, hay una serie de estudios indicativos de que el logro de la remisión inmunofenotípica, donde las células plasmáticas anormales ya no son detectables por CMF, se asocia con una supervivencia mayor que RC (Paiva *et al.*, 2012). También hay datos que sugieren que lograr una RC molecular es mejor que RC (Ladetto *et al.*, 2010). El mejor método para evaluar la medida de la respuesta, es en la actualidad es materia de debate.

El IMWG en 2014 (Chng *et al.*, 2014) propone el uso de un sistema pronóstico que combina el ISS con estudios de genética como un nuevo estándar para definir la enfermedad de alto riesgo (Tabla 7). En este caso, el grupo de alto riesgo se define por un ISS II/III y presencia de t(4;14) o del17p13 y el bajo riesgo se define por pacientes menores de 55 años, ISS I o II y ausencia de los tres marcadores de FISH t(4;14), del 17p13 o +1q21.

Tabla 7. Estratificación de riesgo en MM

	Alto riesgo	Riesgo estándar	Bajo riesgo
Parámetros	ISS II/III y t(4;14) o del 17p13	Otros	ISS I/II y ausencia de (4;14) o del 17p13 y +1q21 y edad < 55 años
Mediana SG	2 años	7 años	20%
% pacientes	20%	60%	20%

ISS índice pronóstico internacional, SG, supervivencia global, a supervivencia de pacientes con t(4;14) se mejora con el uso de tratamientos que incluyan Bortezomib.

1.4.5.2 FACTORES RELACIONADOS CON EL PACIENTE

La edad y el estado general del paciente son dos factores con valor pronóstico independiente. Ludwig observó que los pacientes mayores de 50 años tenían una supervivencia significativamente más corta cuando eran tratados tanto con quimioterapia sola como con quimioterapia seguida de trasplante (Ludwig H *et al.*, 2008). Mientras que los pacientes más jóvenes tendían a presentar características más favorables, la edad al momento del diagnóstico en sí fue un factor predictivo independiente de supervivencia general. Este mismo grupo ha comprobado que hay un acortamiento gradual de la supervivencia en cada incremento de edad en tramos de 10 años en pacientes tratados tanto con quimioterapia convencional como con nuevos agentes, lo que indica que aunque los pacientes más jóvenes tienen una mejor supervivencia, el número de años de vida perdidos fue mayor en pacientes jóvenes (Ludwig H *et al.*, 2010).

Por otro lado, el estado inmunológico del paciente es un factor importante en el control de la enfermedad. En este sentido se ha observado que las diferentes subpoblaciones de linfocitos NK varían a lo largo de la evolución de MM (San Miguel JF *et al.*, 2005).

1.4.5.3 FACTORES RELACIONADOS CON LA BIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Estos incluyen el índice de proliferación celular, medido por el *labeling index* (Greipp PR *et al.*, 1993), la presencia de células plasmáticas circulantes (Nowakowski GS *et al.*, 2005b) y la morfología plasmablástica (Greipp PR *et al.*, 1998). Sin embargo, los factores más importantes son las alteraciones citogenéticas y los perfiles de expresión génica y se ha demostrado que los pacientes que presentan la t(4;14) y la delección 17p13 tienen una pobre supervivencia. Los datos de la t(14;16) tanto para el grupo de la Clínica Mayo como el MRC (Medical Research Council) muestran que se asocia a peores resultados, mientras que este no era el caso en los estudios del grupo francés de mieloma. Otro factor con datos contradictorios es la ampliación del cromosoma 1q21 (1q21+) ya que algunos han mostrado que es un factor pronóstico independiente mientras otros no. Más recientemente, la supresión de 1p también ha mostrado ser un factor pronóstico independiente asociado con una supervivencia más corta (Hebraud B

et al., 2014). La importancia pronóstica de la delección 1p y el locus (1p21 o 1p32) necesita ser confirmada. No obstante, incluso dentro de estos grupos con factores pronósticos genéticos, puede haber más heterogeneidad, por ejemplo, un análisis reciente mostró que los pacientes con alteraciones genéticas de alto riesgo tienen diferencias significativas en la supervivencia dependientes de la presencia o ausencia de trisomías (Kumar S *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que con el estado actual de conocimientos acerca de la genética de mieloma, la genética por sí sola puede ser subóptima como factor pronóstico, mientras que la información combinada de anomalías genéticas con otros parámetros puede mejorar su valor pronóstico (Chng *et al.*, 2014).

1.4.6 TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE

El tratamiento del MM ha cambiado sustancialmente con la introducción de nuevas drogas -talidomida, bortezomib y lenalidomida- con mecanismos de acción diferentes a los de la quimioterapia convencional y que tienen como diana terapéutica no solo la célula tumoral sino también al microambiente medular. Estos fármacos están proporcionando beneficios tangibles para los pacientes con una neoplasia que permanece incurable en la mayoría de los casos. Es importante destacar que se ha observado una mejora en los resultados de supervivencia, no solo en pacientes jóvenes, sino también en pacientes de edad avanzada y para quienes el pronóstico solía ser generalmente pobre con los tratamientos convencionales (Ludwig *et al.*, 2012)

La decisión de cómo se tratará al paciente debe basarse en si es candidato a trasplante autólogo o no y está guiada por la edad biológica, el estado funcional y comorbilidades.

1.4.6.1 CANDIDATOS A TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Es la aproximación terapéutica universalmente aceptada para pacientes “jóvenes” diagnosticados de MM sintomático. Los pacientes considerados elegibles para trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (TASPE), deben ser tratados con 3-4 ciclos de tratamiento de inducción, seguido por la recolección de

células madre y altas dosis de quimioterapia con TASPE realizado de forma temprana o tardía en el momento de la recaída. El tratamiento de inducción debe incluir nuevos fármacos y varios estudios han demostrado superioridad de una triple combinación basada en bortezomib sobre VAD (Vincristina, Adriamicina, Dexametasona) o sobre la combinación de 2 fármacos (H Ludwig, *et al.*, 2014). En la Tabla 8 podemos observar distintos combinaciones de fármacos en el tratamiento de inducción.

Tabla 8. Regímenes de tratamiento de inducción previo a altas dosis de quimioterapia y TASPE

Tratamientos	Opción preferida: regímenes de 3 drogas basados en bortezomib	Regímenes de 2 drogas	Regímenes de 4 drogas
Basado en bortezomib	PAD,VCD	VD	
Basado en bortezomib+IMiD	VRD,VTD		VRDC,VDTC
Basado en lenalidomida		LD, Ld	
Basado en talidomida	TAD, CTD	TD	
Si no hay drogas nuevas	VAD		

Abreviaturas: PAD, bortezomib-adriamicina-dexametasona; VCD, bortezomib-ciclofosfamida-dexametasona; VD, bortezomib-dexametasona; VRD, bortezomib-lenalidomida-dexametasona; VTD, bortezomib-talidomida-dexametasona;VRDC,bortezomib-lenalidomida-dexametasona-ciclofosfamida; VDTC, bortezomib-dexametasona-talidomida-ciclofosfamida; LD, lenalidomida-altas dosis de dexametasona; Ld, lenalidomida-bajas dosis de dexametasona; TAD, talidomida-adriamicina-dexametasona; CTD, ciclofosfamida-talidomida-dexametasona; TD, talidomida-dexametasona; VAD, vincristina-adriamicina-dexametasona. IMWG recommendations for global myeloma care. *Tabla extraída de Ludwig et al., Leukemia, 2013*

Con la introducción de los nuevos fármacos y la alta tasa de respuesta a los mismos, el papel del TASPE como parte de la primera línea de tratamiento es objeto de debate. Sin embargo, la realización precoz del mismo debe continuar siéndolo hasta que los resultados de ensayos clínicos en curso no estén disponibles (Mateos M-V *et al.*, 2015).

El tratamiento de inducción irá seguido de una intensificación mediante un TASPE. El acondicionamiento para este procedimiento debe llevarse a cabo con melfalán 200 mg/m² (MEL200), considerado como estándar y aunque se han comunicado intentos para mejorar la eficacia del régimen de acondicionamiento mediante la adición de busulfán (Reece D *et al.*, 2013) o bortezomib a MEL200 (Roussel *et al.*, 2010) pero estos regímenes no pueden ser considerados como estándar todavía.

En general, la realización de un solo TASPE es el procedimiento habitual. Para pacientes seleccionados, con la finalidad de aumentar la tasa de RC postrasplante se ha propuesto la realización de dos TASPEs consecutivos o en “tándem” que mejora el grado de respuesta (Kumar A *et al.*, 2009) y puede beneficiar a pacientes con respuesta inferior a una muy buena respuesta parcial (VGPR del inglés *very good partial response*) tras el primer trasplante (Attal M *et al.*, 2003) y también aquellos a con alto riesgo citogenético (Ludwig *et al.*, 2014)

1.4.6.2 TRASPLANTE ALOGÉNICO

La introducción de una inducción más efectiva y una consolidación y mantenimiento que incluyen nuevo agentes farmacológicos, ha revolucionado el tratamiento del mieloma y ha cuestionado de hecho el papel del trasplante. Entre las potenciales ventajas respecto al trasplante de progenitores hematopoyético autólogo se encuentra la ausencia de contaminación del injerto por células tumorales y el posible efecto del injerto contra el mieloma, lo que le convierte en un potencial tratamiento curativo. Sin embargo debido a su elevada toxicidad, mayor riesgo de complicaciones y muerte, su uso es muy restringido y de forma infrecuente se realiza fuera de ensayos clínicos. Con el objeto de reducir la toxicidad asociada al procedimiento manteniendo el efecto antitumoral del injerto, se introdujo el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento de intensidad reducida (alo-TIR). La toxicidad de este tipo de trasplante es menor, pero excepto en paciente de alto riesgo, este procedimiento debe realizarse preferentemente en el contexto de ensayos clínicos.

1.4.6.3 PACIENTES NO CANDIDATOS A TRASPLANTE ESTÁNDAR

Los pacientes de 65 a 75 años por lo general no son candidatos a TASPE. Debido a que la edad biológica puede ser diferente de la edad cronológica, este rango puede variar en aproximadamente 5 años. De acuerdo con la edad y estado del paciente se pueden adoptar diferentes enfoques terapéuticos de modo que para los pacientes mayores de 65 a 70 años en situación clínica excelente, o pacientes más jóvenes con comorbilidades, un TASPE de intensidad reducida con melfalán 100 mg/m²

(MEL100) se pueden adoptar de forma segura, en vez de utilizar una dosis completa de melfalán 200 mg/m² (MEL200). En los pacientes mayores de 65 a 75 años en buena situación clínica, está indicada la quimioterapia convencional a dosis completa, mientras que para los pacientes frágiles de más de 75 años, o más jóvenes con comorbilidades, se sugiere una terapia de intensidad de dosis reducida.

Para la elección del tratamiento debe tenerse en cuenta el estado del paciente, la relación riesgo/beneficio de cada régimen y la calidad de vida del paciente (Tabla 9, Figura 8).

Más recientemente se ha incorporado la bendamustina al tratamiento del mieloma. En Europa está actualmente aceptada para el tratamiento de MM de nuevo diagnóstico que no es candidato a TASPE y que no puede recibir talidomida o bortezomib por neuropatía.

Otras combinaciones, incluyendo nuevos agentes de segunda y tercera generación como carfilzomib, marinozomib o elotuzumab están en fase de desarrollo clínico con resultados prometedores.

Tabla 9. Esquemas terapéuticos en pacientes no candidatos a trasplante.

Régimen	Referencia	RC(%)	SLP/SLE/TP (meses)	SG
Inducción				
MPT	Fayer PM,2011	13-16	20,3	39,3 meses
CTDa	Morgan GF,2011	13	13	33 meses
VMP	Palumbo A, 2010	24-30	22-27	A 2 años,85-87%
VMPT	Palumbo A, 2010	38	33	A 3 años,86%
VTP	Mateos MV,2010	28	31	A 3 años, 70%
VCD	Reeeder CB,2009, 2010	39	-	-
VRd	Richardson PG,2010	37	A 18m, 75%	A 18m,97%
Rd	Rajkumar SV,2010	4	25	A 2 años,87%
MPR	Palumbo A, 2012	3	14	No alcanzado
Mantenimiento				
T	Morgan GJ,2012	--	11	38 meses
R	Palumbo,2012	--	26	--
VT	Palumbo,2010, 2012	45	27	Mediana no alcanzada
Tratamientos de rescate				
V	Richarson PG,2005	6	6	A 1 año,80%
V-Peg	Orlowski RZ, 2007	4	9	A 15 meses, 76%
RD	Weber DM,2007	14	11	29,6 meses
Carfilzomib	Siegel DS, 2012	0,4	3,7	15,6 meses

RC, respuesta completa; SLE, supervivencia libre de eventos; TP, tiempo hasta la progresión; SG, supervivencia global; SLP, supervivencia libre de progresión; MPT, melfalán-prednisona-talidomida;CTDa, ciclofosfamida-talidomida-dexametasona; VMP, bortezomib-melfalán-prednisona; VMPT, bortezomib-melfalán-prednisona-talidomida; VTP, bortezomib-talidomida-prednisona; VCD, bortezomib-ciclofosfamida-dexametasona; VRd, bortezomib-lenalidomida-bajas dosis de dexametasona; Rd, lenalidomida-bajas dosis de dexametasona; MPR, melfalán-prednisona-lenalidomida; T, talidomida; R, lenalidomida; VT bortezomib-talidomida; V, bortezomib; V-Peg, bortezomib-doxorrubicina liposomal; RD, lenalidomida-altas dosis de dexametasona. IMWG consensus. *Tabla extraída de Palumbo et al, JCO 2014.*

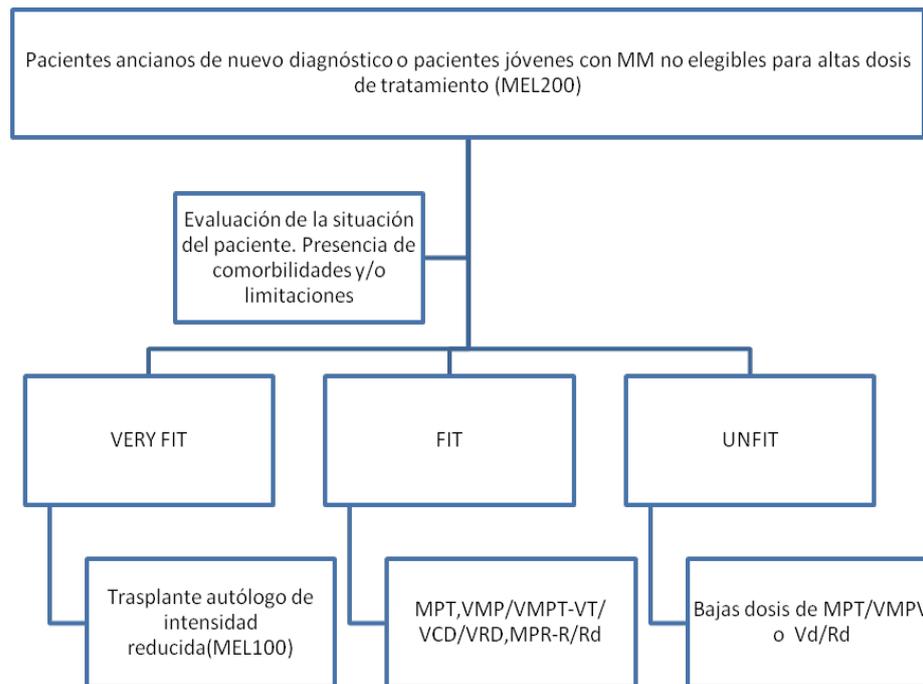


Figura 8. Algoritmo de tratamiento para pacientes de edad avanzada con MM. MEL100, melfalán 100 mg/m²; MEL200, melfalán 200mg/m²; MPR-R, melfalán-prednisona-lenalidomida seguido de lenalidomida; MPT, melfalán-prednisona-talidomida; Rd, lenalidomida-dexametasona a bajas dosis; Vd, bortezomib-dexametasona; VCD, bortezomib-ciclofosfamida-dexametasona; VMP, bortezomib-melfalán-prednisona; VMPT-VT, bortezomib-melfalán-prednisona-talidomida seguido de bortezomib-talidomida; VRD, bortezomib-lenalidomida-dexametasona. IMWG consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma multiple not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *Modificado de Palumbo et al. JCO vol 32, number 6, February 20, 2014*

1.4.6.3.1 OPCIONES DE TRATAMIENTO PARA PACIENTES NO APTOS.

Los pacientes no aptos, son más susceptibles a los efectos adversos del tratamiento con interrupciones posteriores que afecten significativamente la intensidad de dosis y su eficacia. En estos pacientes, se sugieren terapias intensas a dosis más bajas. La combinación de MPT ha mostrado sistemáticamente una mejora en la SLP que fue menos pronunciada en los pacientes de edad >75 años, mientras que la terapia con VMP fue superior a MP en pacientes >75 años. En un estudio aleatorizado, el resultado fue similar entre VD, VMP, y VT- dexametasona, pero la tasa de abandono fue menor con VD. La combinación Rd fue igualmente eficaz en los pacientes más jóvenes y los ancianos. Es importante utilizar bajas dosis de dexametasona (10-20 mg/semana) dada la mayor toxicidad y mortalidad asociada a altas dosis de la misma. Por lo tanto, las combinaciones de dos medicamentos tales como corticoides más

lenalidomida, talidomida o bortezomib deben ser opciones de tratamiento consideradas seguras en pacientes no aptos (Palumbo A *et al.*, 2014).

1.4.6.4 TRATAMIENTO DE CONSOLIDACION Y MANTENIMIENTO

El tratamiento de consolidación se define como un tratamiento intensivo administrado durante un período limitado de tiempo que se da tras la inducción, con la intención principal de la mejora de la calidad de la respuesta y por lo tanto de la SG. En la actualidad, los resultados obtenidos con bortezomib, lenalidomida-bortezomib-dexametasona (VRD), lenalidomida-dexametasona y VTD o TD están disponibles. Bortezomib administrado durante 21 semanas después de TASPE dio lugar a una prolongación significativa de la SLP, pero no se observó un aumento de la SG (Mellqvist UH *et al.*, 2013). El beneficio de SLP sólo se observó en pacientes con menos de muy buena respuesta parcial (del inglés, Very Good Partial Response) antes del inicio del tratamiento de consolidación. La consolidación con VTD tras TASPE incrementó la proporción de pacientes con remisión molecular (Terragna C *et al.*, 2011). Esto posiblemente se podrá traducir en una SG más prolongada pero aún no están disponibles los datos de supervivencia y por tanto, no se puede dar una recomendación definitiva respecto a un uso rutinario en la práctica clínica, aunque a pesar de estos hechos, se está utilizando cada vez más en la consolidación.

El tratamiento de mantenimiento se inicia después de un tratamiento de inducción exitoso y/o después de la terapia de consolidación, y su objetivo es prolongar el tiempo de la remisión con una buena calidad de vida, con el objetivo final de mejorar la SG. Este tratamiento, ha prolongado de forma consistente la SLP pero de forma inconsistente la supervivencia. El tratamiento con talidomida después del TASPE mejoró la SLP en 6 de 6 ensayos y SG en 3/6 estudios, pero la tolerancia a este agente es un factor limitante. Sin embargo, en pacientes de edad avanzada, se observó mejora de SLP sin ningún beneficio en la SG o incluso asociado a SG inferior en los pacientes de alto (Morgan GJ *et al.*, 2012). Bortezomib se ha usado como tratamiento único o en combinación con talidomida después de TASPE y en combinación con talidomida o con prednisona en pacientes de edad avanzada. En pacientes más jóvenes, la combinación de VT resultó en una SLP superior en comparación con talidomida o interferón de mantenimiento como agentes únicos (Rosiñol L *et al.*, 2012). En pacientes de edad

avanzada, VT produce una mayor SLP en comparación con VP (bortezomib-prednisona), pero hasta ahora, la SG en ambos grupos es comparable (Mateos MV *et al.*, 2012). El mantenimiento con lenalidomida se ha evaluado en pacientes de edad avanzada en un ensayo y en pacientes más jóvenes en tres ensayos. Los cuatro estudios mostraron una mejoría notable de la SLP, pero la SG fue superior en sólo 2 de los 3 ensayos realizados en pacientes más jóvenes. En el momento actual, la lenalidomida no se recomienda de forma rutinaria como tratamiento de mantenimiento (Ludwig *et al.*, 2012b).

1.4.6.5 TRATAMIENTO DE PACIENTES CON MM EN RECAÍDA/RESISTENTE

Para los pacientes con MM resistente en recaída o progresión, no existe una alternativa terapéutica estandarizada. En esta situación, la elección del tratamiento depende de factores específicos del paciente, las características del tumor, tales como la citogenética, la eficacia y la tolerancia del tratamiento anterior, el número de líneas de tratamiento anteriores, las opciones de tratamiento disponibles restantes y el intervalo de la última terapia (Mohty B *et al.*, 2011; Jakubowiak, 2012). Los fármacos con neurotoxicidad potencial, como bortezomib o talidomida, deben evitarse en pacientes con polineuropatía, mientras que los fármacos menos mielotóxicos serán preferibles en aquellos con función de la médula ósea comprometida. Sin recomendaciones oficiales generales, el TASPE de rescate se debe ofrecer a los pacientes con mieloma múltiple en recaída que tuvieron una respuesta duradera durante al menos 24 meses después de su primer TASPE (Jiménez-Zepeda *et al.*, 2012; Ludwig *et al.*, 2012).

Recientemente se han introducido nuevos agentes eficaces, como carfilzomib (Jakubowiak AJ *et al.*, 2013) y pomalidomida (Lacy MQ *et al.*, 2012) para el tratamiento de pacientes con recaída/refractaria. Los pacientes cuya enfermedad se ha vuelto resistente a los agentes novedosos presentan un desafío particular. Ellos se pueden enrolar en un ensayo clínico con agentes experimentales novedosas, en el caso de esta opción está disponible, o se les puede ofrecer tratamiento paliativo, con agentes alquilantes en combinación con corticosteroides.

2 LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES Y SU RELACIÓN CON LOS MECANISMOS DE INMUNOVIGILANCIA

2.1 EL SISTEMA INMUNITARIO

El Sistema Inmunitario (SI) lo constituye un conjunto de estructuras y procesos cuya función es defender al organismo de las agresiones, bien causadas por agentes infecciosos exógenos bien por alteraciones de las células propias. El gran reto del sistema inmunitario es el “aprendizaje” ya que debe ser capaz de distinguir entre células y moléculas propias de las no propias, entre agentes exógenos que no constituyen un peligro potencial y los que sí lo son y entre células propias alteradas - potencialmente tumorales- y normales.

El SI ofrece su respuesta a través de dos ramas que tradicionalmente se conocen como **respuesta inmunitaria innata o inespecífica** que comprende células y mecanismos que emiten respuestas genéricas que no desembocan en una inmunidad a largo plazo y la **respuesta inmunitaria específica** constituida por un entramado de proteínas, células, órganos y tejidos que emiten respuestas adaptadas a las características de cada antígeno. Además, el sistema inmunitario específico es capaz de desarrollar respuestas de “memoria inmunológica” que hacen que la respuesta a un patógeno en veces sucesivas ocurra de una manera más rápida y eficiente.

2.1.1 REPUESTA INMUNITARIA INNATA Y SUS COMPONENTES

La primera línea de defensa frente a cualquier agresión depende de la acción de la inmunidad innata o natural. Esta respuesta tiene tres características fundamentales:

- **Es constitutiva**, al estar preformados los elementos responsables y por eso, también es **inmediata**.
- **Es inespecífica**, puesto que reconoce patrones moleculares constantes en los patógenos, sin adaptarse a nuevos desafíos.
- **No genera memoria**, no responde de manera más eficaz frente a un determinado patógeno cuando se enfrenta a él por segunda vez.

La piel y las mucosas digestiva, respiratoria y urogenital constituyen la primera línea de defensa del SI inespecífico. Los componentes celulares del SI inespecífico son diversos. Los **granulocitos** están presentes en la sangre y tiene la capacidad de migrar a los tejidos y constituyen alrededor del 65% de todos los leucocitos. Estos incluyen a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los más abundantes son los **neutrófilos** que dan lugar a una respuesta de primera línea frente a patógenos, debido a su capacidad de reconocimiento rápido, fagocitosis y eliminación de microbios (bacterias y hongos) (Min, 2008). Los eosinófilos representan el 3-5% de los granulocitos circulantes. Sin embargo en los tejidos están presentes en cientos de veces más, donde se acumulan principalmente en la lámina propia de estómago, intestino delgado, colon y vías aéreas (Powell *et al.*, 2010), y nos defienden de la invasión microbiana, secretando mediadores solubles relacionados con respuestas inflamatoria y alérgica (Bochner y Gleich, 2010). Los **basófilos** son una población menos representada en la sangre periférica (menos del 0,2% de leucocitos totales), que cuando maduran dan lugar a macrófagos que se localizan en tejidos, donde al activarse liberan mediadores de inflamación y de respuesta alérgica. Los **mastocitos** o “células cebadas” que poseen vesículas cargadas de histamina, molécula implicada en la respuesta inflamatoria al favorecer la permeabilización de los vasos sanguíneos en zonas sometidas a agresión (Abraham y St John, 2010).

Los **monocitos** constituyen el 6-8% de los leucocitos circulantes y se caracterizan por una vida media breve ya que permanecen solo alrededor de 24 horas en la sangre. Desde aquí alcanzan los tejidos y puntos de inflamación donde evolucionan a macrófagos maduros (Volkman y Gowans, 1965). Los macrófagos constituyen un grupo de células grandes capaces de ingerir y destruir a la mayoría de los patógenos. Pero también cooperan con los linfocitos en la inmunidad específica como células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cell*).

Los linfocitos $T\gamma\delta$ (Bonneville *et al.*, 2010), las células NK (del inglés, *Natural killer*) y las células T con función natural killer (NKT) (Cooper y Yokoyama, 2010; Paust *et al.*, 2010) también forman parte del SI inespecífico o innato, aunque las estudiaremos con mayor detalles en apartados sucesivos.

2.1.2 RESPUESTA INMUNITARIA ESPECÍFICA O ADAPTATIVA

La inmunidad específica, adaptativa o adquirida, implica mecanismos más sofisticados de la respuesta inmunitaria y una eliminación selectiva del microorganismo implicado, a través del reconocimiento de moléculas concretas presentes en los patógenos “antígenos”. La respuesta inmunitaria específica mucho más precisa se caracteriza por dar una respuesta con:

- **Especificidad antigénica**, que permite la distinción sutil entre los diversos antígenos, llegando a discriminar entre péptidos antigénicos que difieren en un solo aminoácido. En este reconocimiento participan receptores específicos de antígeno presentes tanto en linfocitos T, los receptores de las células T (TCR, del inglés *T cell receptor*), como en linfocitos B, aunque en este caso puede estar unido a membrana formando el receptor de las células B (BCR, del inglés *B Cell Receptor*) o soluble en suero en forma de Igs o anticuerpos (Acs).
- **Diversidad**, enorme variabilidad estructural de los sitios de unión de los anticuerpos y de los TCRs, lo que multiplica las posibilidades de reconocimiento de determinantes antigénicos diferentes.
- **Memoria inmunológica**, desarrollada a partir del primer contacto con un antígeno determinado. De manera que cuando tiene lugar una segunda interacción, se produce una respuesta más rápida y efectiva. Esta memoria puede ser más o menos duradera, pudiendo perdurar de por vida.
- **Tolerancia hacia lo propio**, que permite a través de diversos procesos de selección, filtrado/eliminación o inactivación/regulación de clones celulares auto-agresivos, quedarse con células linfoides capaces de reaccionar frente a lo extraño, respetando lo propio.
- **Homeostasis**, característica que comparte con la inmunidad innata y que permite al sistema inmunitario recuperar su nivel basal tras cada desafío antigénico, lo que le permite estar siempre preparado para conferir salud al organismo.

Tradicionalmente, los procesos llevados a cabo por los componentes del SI específico han sido divididos en inmunidad humoral e inmunidad celular.

La **inmunidad humoral** hace referencia a la generación de anticuerpos por parte de los linfocitos B y las células plasmáticas y su secreción en suero u otros líquidos corporales, que son capaces de ligar antígenos nativos (no desnaturalizados) y desencadenar la respuesta inmunitaria para eliminar los patógenos. Los anticuerpos o Igs son proteínas que según sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas, se diferencian en cinco isotipos: IgG (con 4 subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (con 2 subclases, IgA1 e IgA2), IgM, IgD e IgE.

La **inmunidad específica celular** implica la presencia y expansión de linfocitos T y B con receptores específicos para determinadas estructuras presentes en regiones concretas de los antígenos conocidas como “epítopos”. Mientras Las Igs reconocen antígenos nativos completos, el TCR interacciona solo con epítopos procesados y presentados en pequeños fragmentos sobre moléculas del complejo principal de histocompatibilidad o MHC (*Mayor Histocompatibility Complex*). En la especie humana, el MHC se denomina HLA (*Human Leukocyte Antigens*) y su localización génica se representa en la Figura 9.

2.1.2.1 HLA: LOCALIZACIÓN, REGIONES, CLASES, GENES Y FUNCIONES

Los genes del sistema HLA se localizan en el brazo corto del cromosoma 6, banda 6p21.3, y se distinguen tres regiones:

- Clase-I: Incluye genes de los locis HLA-A, -B y -C (antígenos clásicos del trasplante) y HLA-E, -F y -G (antígenos no clásicos).
- Clase-II: HLA-DR, -DQ y -DP.
- Clase-III: factores de complemento (C4, C2 y Bf), citoquinas (TNF- α y TNF- β), proteínas de “choque térmico” Hsp (*Heat Shock Protein*) y otros genes sin relación directa con el sistema inmunitario o la inflamación (Klein y Sato, 2000; Shiina *et al.*, 2004).

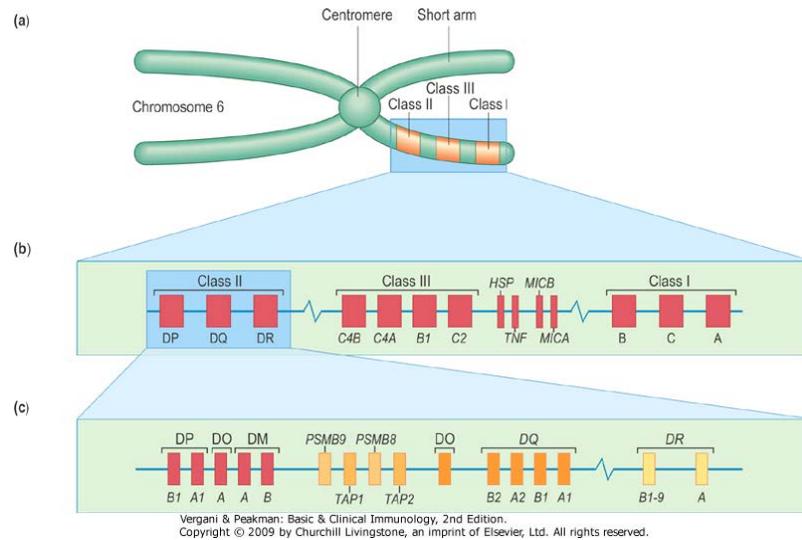


Figura 9. Las tres clases de genes conocidos de MHC humano.(a) Región del brazo corto del cromosoma 6 donde se encuentra la región HLA. (b) Principales subregiones (clases I, II and III) y genes dentro de cada una. (c) Mapa detallado de la región de clase II que muestra los principales genes que incluye esta región.

La herencia de los genes de HLA es de tipo mendeliano y cada individuo puede tener dos alelos por gen en su genotipo, que se heredan en grupos denominados haplotipos (2 por individuo) heredados respetivamente del padre y de la madre sin que haya recombinación genética entre ellos. Los loci del MHC constituyen uno de los grupos génicos con mayor variabilidad en los mamíferos y, por extensión, en los seres humanos. A fecha 20 de noviembre de 2012, hay identificados 2132 alelos para HLA-A, 2798 para HLA-B, 1672 para HLA-C y 1196 para HLA-DRB1 (consultar: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>).

Las moléculas HLA de clase I son glicoproteínas presentes en la superficie de todas las células del organismo, cuya función principal es presentar antígenos propios y no propios a los linfocitos T para desencadenar la respuesta específica. La moléculas codificadas por genes de clase II son más restringidas y su expresión se limita a células presentadoras de antígenos (monocitos y células dendríticas), linfocitos B y linfocitos T activados. En los últimos años además, está cobrando importancia la interacción de las moléculas HLA con receptores de células NK, lo que permite al sistema inmunitario detectar la pérdida de identidad (pérdida de expresión de HLA), y con ello la potencial presencia de infecciones virales o de malignidad.

2.1.2.1.1 PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS A LINFOCITOS T

Las moléculas de clase HLA de clase I tienen la capacidad de presentar péptidos de unos 8-10 aminoácidos (aa), generalmente de origen endógeno, es decir proteínas citosólicas propias o codificadas por virus y patógenos intracelulares, a los linfocitos T citotóxicos o CTLs (*Cytotoxic T lymphocytes*), la mayoría de los cuales posee en su superficie la molécula accesoria CD8.

Las moléculas de HLA de clase II se expresan en un rango de tejidos más limitado. Están presentes de forma constitutiva en la superficie de las células presentadoras de antígenos (linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas), si bien, citoquinas como IFN γ y/o TNF α , pueden aumentar el número de tejidos que las expresan, como el endotelio, linfocitos T, etc. Las moléculas de clase II unen péptidos de mayor tamaño que las de clase I, de entre 10 y 24 aa, y suelen tener un origen exógeno, es decir derivan de proteínas extracelulares o localizadas en la membrana celular y los presentan a los linfocitos T colaboradores o Th (*T helper*) que poseen también la molécula CD4+. En este caso los péptidos que entran en la célula por la vía endocítica, son degradados en los lisosomas y se ligan a la molécula de clase II para volver a expresarse en la membrana.

2.1.2.1.2 INTERACCIÓN CON RECEPTORES DE CÉLULAS NK, DETECCIÓN DE LA PÉRDIDA DE IDENTIDAD

Las células NK constituyen una población de linfocitos, tradicionalmente considerados de la inmunidad innata, que portan receptores capaces de detectar y eliminar de manera muy eficaz células infectadas por virus o que hayan sufrido transformaciones tumorales. Entre estos receptores, las células NK cuentan con los denominados receptores KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) que participan activamente en este reconocimiento.

En condiciones normales, las células del organismo expresan de manera constitutiva moléculas HLA de clase I las cuales, que al interactuar con los receptores KIR generan señales inhibitorias que impiden que la célula NK lisen o maten las células sanas. Bajo situaciones alteradas como las infecciones víricas o las transformaciones tumorales, las células pueden perder la expresión de HLA. En esta situación, la célula NK se libera de las señales inhibitorias y emite respuestas dirigidas a la destrucción de

la célula alterada. Este modelo de comportamiento se denomina modelo de **“Missing-Self”** (pérdida de lo propio) y fue propuesto en 1981 por Kärre (Ljunggren y Kärre, 1990) (Figura 10).

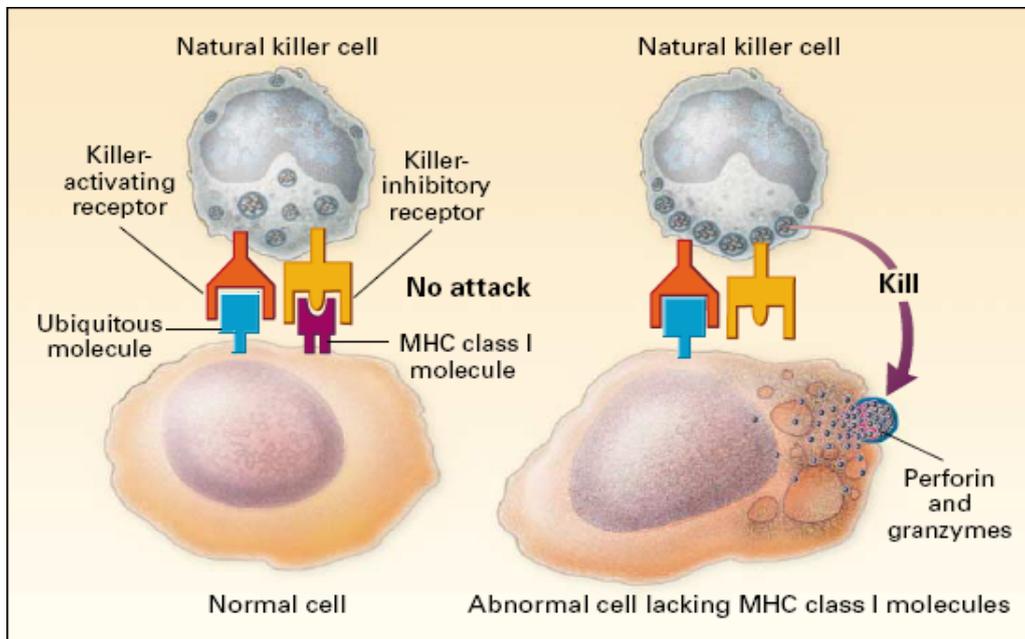


Figura 10. Sistema utilizado por las células NK para reconocer células normales y células que pierden el complejo mayor de histocompatibilidad clase I los receptores activadores de células NK reconocen moléculas presentes en la superficie normal de las células nucleadas y en ausencia de una señal inhibitoria de receptores inhibidores de células NK (que reconocen MHC de clase I), los receptores generan una orden a las NK para atacar y matar la otra célula. (*NEJM 2000; julio 6. Vol 343(1)*).

2.1.2.1.3 HLA Y MIELOMA MÚLTIPLE

Se han realizado numerosos estudios en los que se ha descrito la existencia de asociación entre diversas patologías y múltiples variantes alélicas de los genes HLA de clase I y de clase II. Asociaciones que tienen relación tanto con la susceptibilidad como con la protección frente a enfermedades autoinmunes, alérgicas, infecciosas, oncológicas, en trasplante alogénico, etc. Sin embargo, muy pocos trabajos han analizado la relación existente entre la diversidad genética de HLA y la susceptibilidad a padecer discrasias de células plasmáticas o más concretamente mieloma múltiple (MM). En 1991 se describió cierta correlación entre la presencia de HLA B65, -C2 y -DR14 y el desarrollo de MM en una población de raza negra, mientras que en población de raza blanca son más prevalentes los fenotipos HLA-A3 y -C2 (Pottern *et al.*, 1992).

2.2 INMUNOVIGILANCIA E INMUNOTOLERANCIA FRENTE A TUMORES

El sistema inmunitario desarrolla tres funciones primarias para prevenir la aparición del cáncer. La primera se refiere a la protección frente a tumores inducidos por infecciones virales; la segunda a la eliminación de patógenos y pronta resolución de la inflamación y que puede prevenir el establecimiento de un microambiente inflamatorio propicio para la tumorigénesis; y la tercera a la identificación y eliminación de células tumorales, al reconocer específicamente antígenos tumorales o moléculas inducidas por estrés (Swann *et al.*, 2007).

Un fenómeno muy extendido en el desarrollo tumoral y que apoya un papel relevante del sistema inmunitario en el control del cáncer, es la regulación a la baja de la expresión de moléculas HLA clase I en la membrana de las células malignas, lo que afecta al reconocimiento inmunológico de las células tumorales por los linfocitos CD8, y por tanto no se genera respuesta inmune eficaz, de modo que facilita el escape de las células transformadas a la inmunovigilancia de los linfocitos T antígeno específicos. Afortunadamente, según la hipótesis del Missing Self (pérdida de identidad), esta pérdida de HLA incrementa el riesgo de quedar expuestas a la acción lítica de las células NK. A pesar de la inmunovigilancia, hay tumores que consiguen escapar, por lo que surge un concepto más completo en la explicación del papel del sistema inmunológico en el desarrollo tumoral: la **inmunoedición**.

Según este concepto, en el desarrollo de tumores se podrían diferenciar tres fases:

- 1) una **fase de eliminación** que se asimila al concepto de inmunovigilancia previamente expuesto, en la que se pueden eliminar o no todas las células tumorales,
- 2) cuando la eliminación del tumor es parcial, la inmunoedición pasa por una **fase de equilibrio**, en la que es difícil prever si las células tumorales continuarán en un estado de dormición o evolucionarán, acumulando más alteraciones,
- 3) el propio sistema inmunológico al ejercer una presión selectiva puede favorecer el escape de variantes tumorales capaces de resistir, evitar o suprimir

la respuesta antitumoral, entrando en la **fase de escape** en la que el sistema inmunológico se torna incapaz de controlar la progresión tumoral

2.2.1 INMUNOVIGILANCIA E INMUNORREGULACIÓN POR LINFOCITOS T

Las células T constituyen una población clave en el control de infecciones intracelulares y del cáncer. La función de estas células no se limita a ejercer un efecto citotóxico sobre las células transformadas, sino que también realizan funciones tanto de apoyo a la respuesta inmunitaria como de regulación y supresión. Las células tumorales expresan antígenos asociados a tumores o TAAs (*Tumor Associated Antigens*) que, presentados sobre células dendríticas, pueden inducir respuestas T antígeno específicas. Bajo las condiciones adecuadas, estas células podrían erradicar el tumor; por ello, hoy muchas de las terapias anticáncer se han desarrollado bajo esta premisa. Pero existe una diferencia fundamental entre las infecciones y los tumores y es que las primeras tienen un origen extrínseco y las segundas, intrínseco al individuo. Por ello, la respuesta antitumoral requiere de un creciente ataque autoinmune, que puede implicar la rotura de la tolerancia. De hecho, la mayoría de los antígenos expresados por las células tumorales no son neo-antígenos que se identifiquen sólo en las células transformadas, sino que pueden ser antígenos de diferenciación tisular presentes también en células normales (Boon *et al.*, 2006; Rosenberg, 1999).

Las pruebas experimentales apoyan este hecho. En especial, los datos aportados por los grupos de Bogen y de Levisky quienes demostraron de manera independiente que las células T CD4+ antígeno-específicas se tornaban tolerantes durante el desarrollo tumoral *in vivo* (Bogen, 1996; Staveley *et al.*, 1998). Por lo tanto, parece indiscutible que existen mecanismos de escape inmunológico semejantes al mantenimiento de la autotolerancia. Por otro lado, se ha demostrado que la progresión del tumor se asocia con una deficiencia funcional en los linfocitos T CD8+, aunque existen discrepancias sobre cómo definir la falta de respuesta en este compartimento. Inicialmente se interpretó como “ignorancia” y existencia de delección clonal, puesto que las respuestas citotóxicas antígeno-específicas, la proliferación y la producción de citoquinas se veían moduladas negativamente por re-estimulación *in vitro* con antígenos tumorales (Ochsenbein *et al.*, 1999; Dalyot-Herman *et al.*, 2000). Con todo, las células cancerígenas emiten diversos mecanismos

inmunosupresores capaces de evadir las respuestas T, ya sea impidiendo el reconocimiento inmune o discapacitando a las células T efectoras (Drake *et al.*, 2006; Igney y Krammer, 2002; Whiteside, 2006). Entre estos mecanismos, se incluyen alteraciones de los componentes implicados en el reconocimiento del antígeno, defectos en la señalización proximal del TCR, secreción de factores inmunosupresores y proapoptóticos, activación de vías de regulación inhibitorias y reclutamiento específico de células reguladoras (Drake *et al.*, 2006; Steinman *et al.*, 2003; Blank *et al.*, 2005).

2.2.2 CÉLULAS NK Y RESPUESTA ANTITUMORAL

Las células NK son mononucleadas con morfología de linfocito grande granular. La población circulante en sangre periférica representa aproximadamente el 10% de la población linfoide y tiene capacidad biológica para eliminar de forma rápida y espontánea células alteradas, ya sean infectadas por virus o tumorales (Yokoyama *et al.*, 2002; Herberman *et al.*, 1981). Al producir citoquinas pueden contribuir a modular tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa. Las células NK están implicadas en el reconocimiento materno-fetal durante el embarazo (Moffett-King, 2002) y se han relacionado con el rechazo en trasplante y con procesos patológicos como inflamación y autoinmunidad (Yu *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 2000)

Las células NK maduras expresan CD56 de forma moderada (CD56^{dim}), marcador que adquieren de forma progresiva durante su maduración, junto a CD161, receptor Fc de IgG (CD16) y CD94. También expresan algunas moléculas asociadas a linfocitos T como CD2 y CD7, pero no CD3 o TCR. Durante su activación, aumenta la expresión de HLA-DR, CD38, CD11a, CD45RO, CD57 y CD2 y se reduce la de CD7, CD11b, CD11c y CD38. Además, en las últimas décadas se ha descrito que son portadoras de diversos receptores de activación e inhibición presentes en la membrana de las células NK que regulan su función. (Figuras 11 y 12)

La activación de las células NK puede ser inducida:

- a) bien mediante la unión del fragmento Fc al CD16 que expresan algunas NKs alteradas o a través de los **receptores citotóxicos naturales**, NCR (*Natural cytotoxic receptors*) como NKp44 o CD336, NKp46 o CD335, NKp30 o CD337,

DNAM-1 (*DNAX Accesoy Molecule 1*) o CD226, NKR2B4 o CD244, NKR-P1A o CD161 , NKG2D o CD314, entre otros;

b) o bien mediante la identificación de la pérdida de identidad de las células y tejidos alterados, al detectar una reducción o pérdida en la expresión de HLA, como ocurre con las células infectadas o malignas.

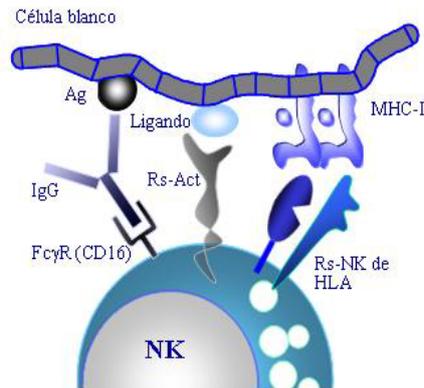


Figura 11. Esquema de interacción de algunos receptores de las células NK: CD16 (FcγR), receptor activador (Rs-Act) y receptores de moléculas HLA de clase I. Adaptado a partir de López-Botet y Bellon *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 301-7.

Para que las células NK desarrollen su función, tiene que identificar a la célula diana. Para ello, poseen diferentes tipos de receptores, aparte del CD16, con función de reconocimiento de moléculas en las células blanco y en consecuencia de inducir la actividad citolítica y/o secretora de citoquinas como ya se ha dicho. Como ya se ha dicho, los receptores responsables de la actividad citolítica pueden ser activadores o inhibidores.

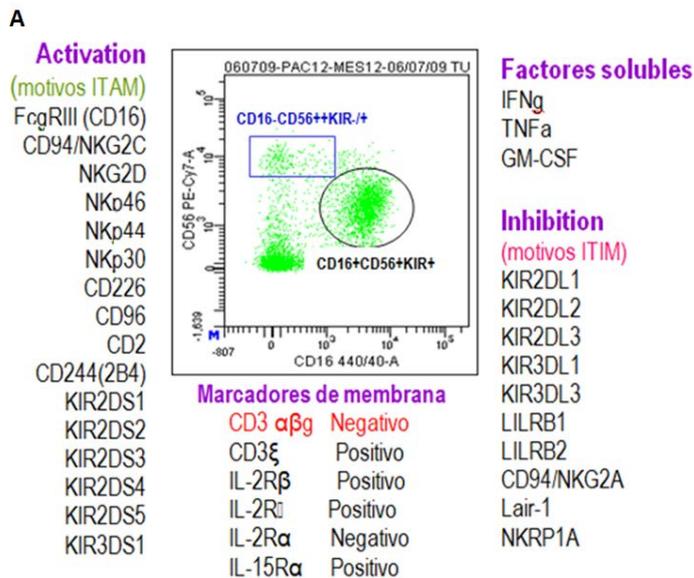


Figura 12. Caracterización de la población NK. Resumen de receptores de activación e inhibición (según la presencia de motivos ITAM o ITIM), marcadores de membrana y receptores de factores solubles de las células NK. Se incluye un plot de citometría que muestra la distribución de las poblaciones NK según la expresión de KIR.

La gran mayoría de los receptores de membrana de las células NK pertenecen a dos superfamilias estructuralmente bien diferenciadas: la superfamilia de las inmunoglobulinas (receptores tipo KIR y tipo ILT) codificadas en el cromosoma 19 y la superfamilia de las lectinas o KLR (*Killer-cells Lectin-like Receptors*), receptores NK tipo lectina como CD94 y NKG2 que son glicoproteínas codificados en el cromosoma 12 y se expresan en forma de homo o heterodímeros unidos por puentes disulfuro (Renedo *et al.*, 1997). Los receptores de estas dos familias comparten características funcionales que les proporcionan la capacidad de inhibir o activar las funciones de las células NK. Los receptores KIR, ILT y el homodímero CD94 pueden ejercer acciones inhibitorias como activadoras, y el que se ejerza una u otra acción depende de la cola citoplasmática de dichas moléculas y de las quinasas con las cuales se asocien.

Los **receptores inhibidores** comparten segmentos citoplasmáticos largos con motivos inhibidores ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) que sufren fosforilación por quinasas tipo *Src* tras la interacción receptor-ligando. Esta fosforilación facilita la unión de fosfatasas SHP1 y SHIP1, esenciales en la eliminación de la señal activadora.

Por su parte, el funcionamiento de los **receptores activadores** se basa en la posesión o asociación a moléculas portadoras de motivos activadores o ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif*). Estos receptores poseen un segmento citoplasmático corto y un residuo de carga positiva en el segmento transmembrana que les permite unirse al adaptador DAP12, portador de dominios

ITAM, que tras fosforilación en residuos de tirosina por acción de quinasas *Src*, facilita el acoplamiento a otros adaptadores (ej. Syk o ZAP70) responsables de la activación celular.

2.2.2.1 RECEPTORES KIR (KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS)

Los receptores KIRs son un grupo de moléculas de membrana que interactúan con moléculas de clase I, regulando la función de las células NK. Están constituidos por dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y una cola intracitoplasmática que se expresan en células NK y linfocitos T. La nomenclatura de estos receptores se basa en sus características morfológicas según el número de dominios inmunoglobulina (2D o 3D) o si el tallo intracitoplasmático es corto (“S” del inglés “*Short*”) o largo (“L” del inglés “*Long*”), seguido de un dígito que diferencia las moléculas codificadas por genes diferentes (Ej. KIR2DL1, corresponde al primer gen descrito con 2 dominios de tipo inmunoglobulina y cola larga) (Pavlova *et al.*, 2008) (Figura 13). Además, siguiendo la nomenclatura CD (Tabla 10), los receptores KIR se corresponden con las moléculas CD158, seguido de una letra para diferenciar los distintos receptores KIR (Ej. CD158a, que se corresponde con KIR2DL1).

Los genes KIR forman una familia multigénica de 16 genes (14 genes y 2 pseudogenes, KIR2DP1 Y KIR3DP1) localizada en el cromosoma 19 (19q13.4) dentro del Complejo de Receptores Leucocitarios o LRC (*Leukocyte Receptor Complex*) y se expresan en células NK y en una subpoblación de linfocitos T.

Dada la cercanía entre los distintos genes KIR, por lo general se segregan en haplotipos con alto desequilibrio de ligamento. Tradicionalmente, se distinguen dos grupos de haplotipos: **grupo A** que contiene sobre todo genes KIR inhibidores y **grupo B** cuya carga de genes KIR activadores es mayor, lo cual genera diversidad de asociaciones de presencia-ausencia de genes y de polimorfismos entre los presentes en cada genotipo (Figura 14) . Hasta la fecha se han descrito más de 100 haplotipos KIR diferentes en función del contenido de genes, con frecuencias varían en las distintas poblaciones. No obstante, los genes KIR (2DL4, 3DL2, 3DL3 y 3DP) están presentes en todos los haplotipos por lo que se denominan genes marco o *framework genes* (Shilling *et al.*, 2002).

En la Tabla10, se recogen los receptores KIR en relación con el tipo de haplotipo al que pertenece, su nomenclatura CD, su ligando y las vías de señalización.

Tabla 10. Receptores KIR: ligandos y vías de señalización

FUNCIÓN	HAPLOTIPO	KIR	CD	LIGANDO	SEÑALIZACIÓN
INHIBICIÓN	A	2DL1	CD158a	HLA-C2	ITIM
	B	2DL2	CD158b1	HLA-C1	ITIM
	A	2DL3	CD158b2	HLA-C1	ITIM
	B	2DL5	CD158f	Desconocido	ITIM
	A	3DL1	CD158e1	HLA-Bw4	ITIM
	A y B	3DL2	CD158k	HLA-A(débil)	ITIM
	A y B	3DL3	CD158z	Desconocido	ITIM
ACTIVACIÓN	B	2DS1	CD158h	HLA-C2 (débil)	DAP12
	B	2DS2	CD158j	HLA-C1(débil)	DAP12
	B	2DS3	-	Desconocido	DAP12
	A	2DS4	CD158i	HLA-Cw-04	DAP12
	B	2DS5	CD158g	Desconocido	DAP12
	A y B	2DL4	CD158d	HLA-G	FcεRI, ¿ITIM?
	A y B	3DS1	CD158e2	Desconocido	DAP12

Modificada de Torres-García et al.,2008 y Lanier,2005

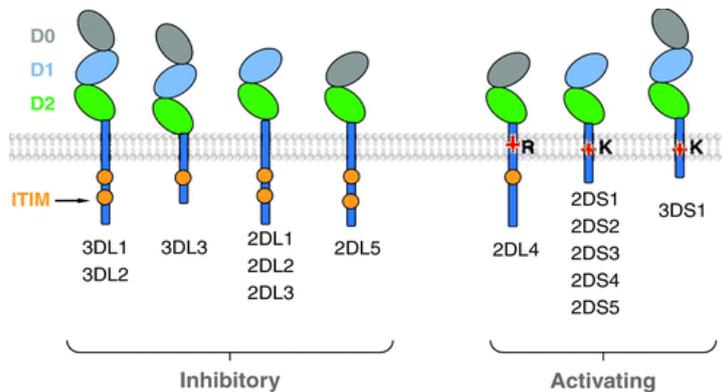


Figura 13. Estructura de los receptores KIR. En la Figura podemos observar esquemáticamente las tres parte constituyentes de cada receptor KIR (dominios extracelulares, tallo transmembrana y dominios intracitoplasmáticos). Destacar la presencia de motivos ITIM en los KIRs inhibidores y los residuos aminoacídicos cargados positivamente en los activadores(*extraída de Bashirova et al., 2006*).

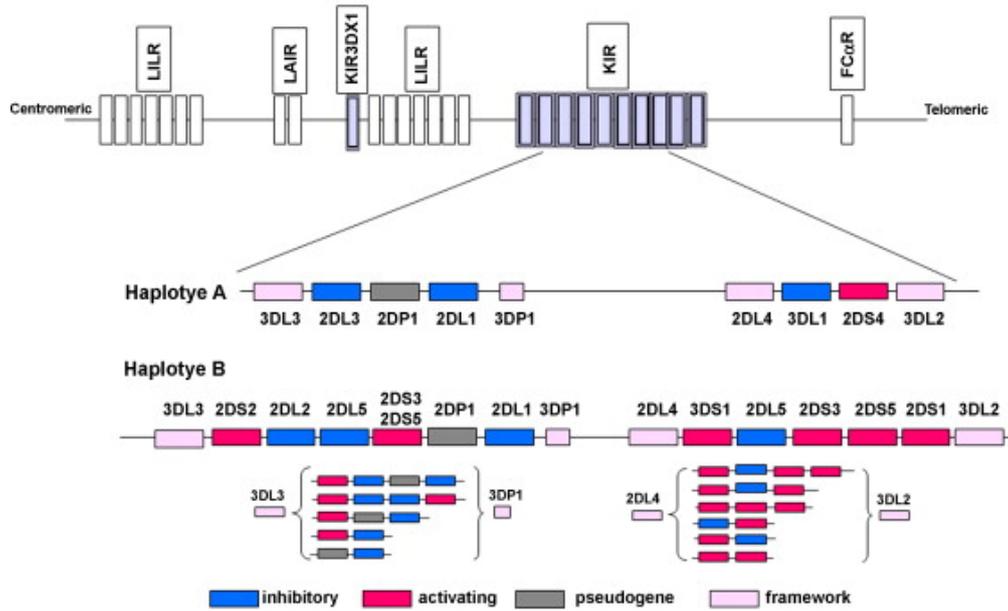


Figura 14. Complejo de genes KIR. Se esquematiza la posición del complejo de genes KIR dentro del LCR y las distribuciones posibles de pseudogenes y genes activadores e inhibidores dentro de los haplotipos (distinguiendo entre haplotipos A y B) así como los límites de las regiones centromérica y telomérica. (Extraído de Kulkarni et al., 2008).

2.2.2.2 EXPRESIÓN DE GENES KIR

El KIR2DL4 es el único gen KIR que se transcribe en todas las células NK, y a través de él se da acceso al complejo de transcripción al resto de genes KIR, que se transcriben siguiendo un mecanismo aleatorio y parcialmente desconocido, de tal manera que cada clon de células NK puede expresar diferentes combinaciones de genes KIR. El juego de genes KIRs que expresa cada célula NK queda fijado por metilación de los genes no expresados. De esta manera, el patrón de expresión pasa a la descendencia que, en conjunto, constituye un clon NK (Parham, 2005).

Al conjunto de clones de células NK que expresan diversas combinaciones de receptores KIR y CD94/NKG2A en un individuo se denomina **“Repertorio de células NK”**. Dado que estas moléculas se segregan de manera independiente a la de sus ligandos (HLA clase I) por estar en cromosomas diferentes (Vilches y Parham, 2002), muchos individuos poseen algunos receptores KIR para los que no poseen el ligando correspondientes. Mientras que cada célula NK funcional expresa al menos un receptor para HLA propio (auto-reconocimiento), la co-expresión de dos o más es un acontecimiento menos frecuente. Esto permite que la mezcla total de células NK de un

individuo sea capaz de detectar la pérdida de al menos un alelo HLA clase-I en las células propias debido a transformación tumoral o infección viral.

Durante el desarrollo, el genotipo HLA clase-I conduce la selección y la educación del repertorio de las células NK, dictaminado por receptores KIRs inhibidores para HLA clase-I propio (Shilling *et al.*, 2002). De este modo, la adecuada expresión del repertorio de KIRs inhibidores protege de la autorreactividad de las células NK. En ausencia de estas vías inhibitorias, las células diana se tornan susceptibles de ser objeto de lisis mediada por células NK.

Aunque la expresión de genes KIR en un clon NK determinado ocurre con cierta aleatoriedad, es un proceso modulado por el genotipo HLA clase-I del individuo, de manera que el genotipo HLA de clase-I modifica las frecuencias relativas de las células NK que expresan KIRs particulares. Ya que la expresión de los receptores KIRs es aleatoria, los clones NK que no expresan estos receptores, deben expresar CD94/NKG2A para asegurar la autotolerancia. Conviene señalar que prácticamente todas las células NK KIR- son CD94/NKG2A+ y viceversa (Ruggeri *et al.*, 2006; Yawata *et al.*, 2006). La presencia del ligando HLA clase-I para un determinado KIR aumenta la frecuencia de células que expresan dicho KIR. En individuos homocigotos para KIR2DL1, la presencia de su ligando (HLA-C de tipo C2) incrementa la frecuencia de células NK KIR2DL1+ casi al doble. También se han descrito evidencias de que la frecuencia de células NK KIR2DL2/3+ disminuye en ausencia de su ligando (HLA-C de tipo C1). Por último, las células NK que expresan KIR3DL1 también se ven favorecidas por la presencia de su ligando HLA-Bw4, siendo este efecto más evidente en individuos heterocigotos que en homocigotos.

2.2.2.3 LIGANDOS DE LOS RECEPTORES KIR

Los receptores KIR tienen como ligando de mayor afinidad las moléculas del MHC clase I y en particular los dominios $\alpha 1/\alpha 2$ (Storkus *et al.*, 1989). Dentro de estas moléculas en humanos, los ligandos más importantes de los receptores KIR serían en este orden las moléculas HLA-C, -B y -A.

La unión entre receptores KIR y sus ligandos HLA se establece a través de puentes de hidrógeno y de interacciones hidrofóbicas. La especificidad KIR-HLA se ve influida por la presencia de ciertos aminoácidos en posiciones específicas, clave en la

interacción. Así, algunos KIR inhibidores reconocen preferencialmente residuos lisina (Lys) o arginina (Arg) en la posición 80 del dominio de las moléculas HLA-C, lo que ha propiciado su conservación evolutiva en linajes tanto humanos como de chimpancés (Single *et al.*, 2007). En este sentido, hay que señalar que las moléculas HLA-C han sido clasificadas en dos grandes grupos diferenciados por la presencia de dimorfismo en el dominio $\alpha 1$ de la cadena pesada (Figura 15).

Así, según este dimorfismo las moléculas HLA-C se han clasificado en dos grupos:

- El grupo C1, constituido por aquellos alelos que presentan serina (Ser) en la posición 77 y asparagina (Asn) en la 80 y que incluye los alelos HLA-C*01, *03, *07, *08, *12, *14, *16, codificantes de moléculas HLA que interactúan con KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3.
- El grupo C2, integrado por moléculas con Asn77 y Lys80 y que incluye los alelos HLA-C*02, *04, *05, *06, *15, *17 y *18, caracterizadas por interactuar con KIR2DL1 y KIR2DS1.

HLA-C as KIR ligand

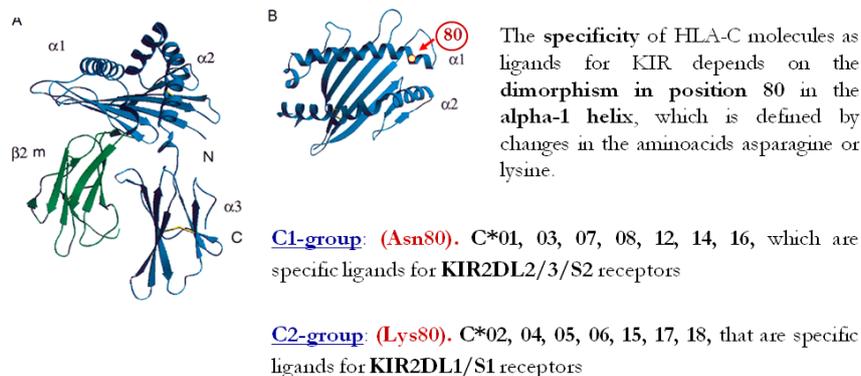


Figura 15. Ligandos HLA-C de los receptores KIR. Se representa la estructura tridimensional de la molécula HLA de clase-I, HLA-C, y se indica la situación del aa 80 en la hélice alpha-1. En función de la presencia de Asn80 o Lys80 en dicha posición, se pueden clasificar los diferentes alelos de HLA-C, como grupo-C1 o grupo-C2. López Álvarez MR. Tesis doctoral

2.2.2.4 EDUCACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS NK

Las formas maduras de las células NK constituyen una población heterogénea de células que difieren en su localización, potencial proliferativo, capacidad funcional y de respuesta a diversas citoquinas (Vivier *et al.*, 2008; Morett *et al.*, 2008). La complejidad de esta población se debe en buena medida a su variado repertorio de receptores inhibidores y activadores que les facilitan el reconocimiento de células diana, de manera que el estatus funcional de las células NK va a estar determinado por el equilibrio entre las señales activadoras y las inhibidoras que transmitan los receptores de su superficie (Béziat *et al.*, 2010).

Durante su desarrollo, **las células NK son “educadas” a través de receptores inhibidores** que interactúan con sus ligandos, principalmente HLA clase I, adquiriendo competencias funcionales a través de un mecanismo denominado de licencia o educación o “*Licensing*” (Kim *et al.*, 2005). Este mecanismo es un proceso mediante el cual la célula NK aprende a reconocer la identidad propia del individuo y tiene como resultado la aparición de dos grupos funcionales de células NK: licenciadas y no-licenciadas o lo que es lo mismo educadas o no-educadas para el reconocimiento de lo propio (Kim *et al.*, 2005).

Como los receptores de las células NK y sus ligandos MHC clase-I no están genéticamente unidos, al heredarse en cromosomas diferentes, se pueden dar situaciones en las que algunas células NK tengan receptores para ligandos que no porta el individuo, o por el contrario, que se tengan ligandos para los que no existen receptores sobre las células NK. De hecho, se han identificado individuos con clones NK que no expresan receptores inhibidores para las moléculas MHC clase-I que han heredado (Fernández *et al.*, 2005; Yawata *et al.*, 2008), y sin embargo, no sufren el efecto de un ataque autoinmune de sus células NK. Esto, ha llevado a plantear la cuestión de cómo las células NK que carecen de receptores inhibidores consiguen mantener la autotolerancia. Se han propuesto diversas hipótesis que explicarían esta tolerancia:

- 1) La primera postula el modelo de “licencia” que las células son inicialmente no-respondedoras o no-licenciadas, y que la unión de los receptores inhibidores a sus ligandos MHC clase-I durante el desarrollo, licencia o

arma estas células para convertirlas en efectores competentes (Kim *et al.*, 2005).

- 2) De manera alternativa, la hipótesis del “desarme” sugiere que todas estas células NK son en principio, reactivas, pero sin la estimulación crónica a través de receptores inhibidores, se tornarían anérgicas al interactuar con sus ligandos MHC clase-I específicos (Gasser y Raulet, 2006).
- 3) Existe un tercer modelo de “reóstato” que propone que la reactividad de las células NK se afina en base al número de receptores inhibidores específicos para el MHC clase-I que cada una de ellas exprese en su superficie y por la afinidad de cada uno de estos receptores por su ligando (Brodin *et al.*, 2009; Raulet y Vance, 2006). Las células NK que expresan dos o más receptores inhibidores responden de manera más frecuente y poseen funciones efectoras más fuertes que las que sólo expresan uno (Brodin *et al.*, 2009; Joncker *et al.*, 2009). La afinidad de la interacción entre el receptor inhibidor y su ligando MHC clase-I también afecta al proceso de educación (Jonsson *et al.*, 2010). Por ello, la educación de las células NK parece ser un proceso cuantitativo a través del cual la capacidad reactiva de la célula NK está determinada por la frecuencia y afinidad de las uniones entre los receptores inhibidores y sus ligandos MHC clase-I y esto es aplicable a los dos modelos descritos anteriormente.

Varios estudios han sugerido la existencia de un modelo por el cual la inhibición de las células NK a través de algunas combinaciones HLA-KIR es más fuerte que a través de otras. Así, la inhibición por KIR2DL1/HLA-C2 es la más fuerte, seguida por KIR2DL2/HLA-C1 y KIR2DL3/HLA-C1 (Carrington *et al.*, 2005; Khakoo *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2004; Hiby *et al.*, 2004, Parham, 2005). En consecuencia, las interacciones más débiles permitirían una mejor activación de las células NK y, por ende, mayor protección frente a infecciones virales o mayor susceptibilidad a procesos autoinmunes (Figura 16). Además, teniendo en cuenta los ligamientos genéticos más comunes de estos genes KIR, KIR2DL1 ligado bien a KIR2DL2 o bien a 2DL3, pero no estas dos últimos juntos pues se comparten como alelos, se obtiene una diversidad de combinaciones genéticas que pueden presentar una gradación decreciente de

actividad inhibidora o viceversa creciente en su función activadora, y todo además en función de que encuentren sus ligandos HLA-C en homocigosis o heterocigosis (Figura 16, derecha).

Por otro lado, parece que **los receptores activadores también pueden participar en la educación de las células NK**. Esta educación está dirigida a evitar situaciones de autoinmunidad. Por ejemplo, en ratón, los ligandos de NKG2D están relacionados con la eliminación de infecciones víricas y el rechazo de células hematopoyéticas (Orr y Lanier, 2010). Uno de estos ligandos es Rae-1, cuya expresión decae desde estados embrionarios a la madurez del individuo. En ratones transgénicos que expresan de manera constitutiva Rae-1 las células NK son incapaces de rechazar tumores portadores de ligandos de NKG2D, lo que significa que la presencia continuada de estos ligandos vuelve a las células NK tolerantes debido tanto a la regulación a la baja del receptor NKG2D como a un estado de hiporrespuesta a la señalización a través de este receptor activador (Champsaur y Lanier, 2010).

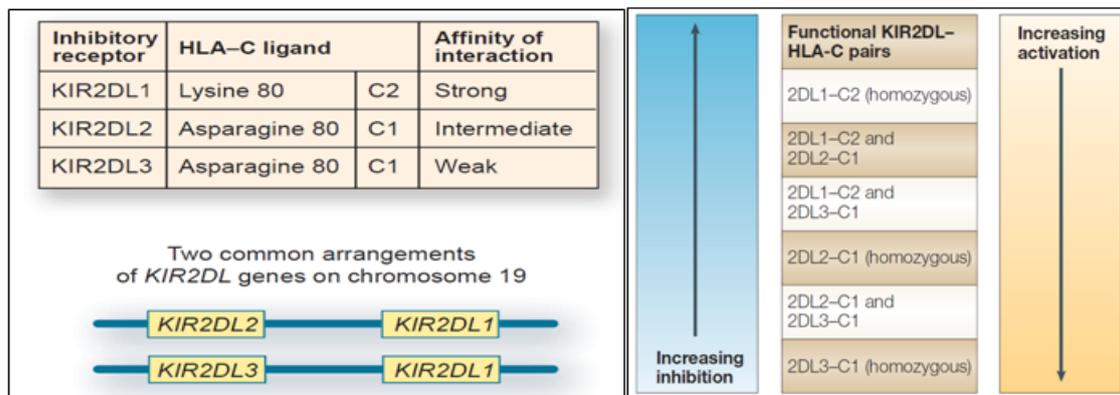


Figura 16. Predicción de la naturaleza de las interacciones KIR-HLA-C. Las interacciones KIR-HLA-C de mayor afinidad son las que tienen lugar entre KIR2DL1 y HLA-C2, siendo más débiles las de KIR2DL2-HLA-C1 y KIR2DL3-HLA-C1 (arriba izquierda). Abajo a la izquierda, se muestran 2 de las combinaciones genéticas más frecuentes de estos genes. En función del genotipo (derecha), se puede predecir las consecuencias de las posibles interacciones KIR-ligandos HLA-C. Así, se puede predecir mayor inhibición de las células NK en individuos homocigotos HLA-C2 que expresen KIR2DL1 y una más fácil activación en individuos homocigotos HLA-C1 que expresen KIR2DL3 homocigotos, con varias situaciones intermedias posibles. (Extraído de Parham, 2005).

Desafortunadamente, no hay pruebas directas de si las células NK humanas que expresan KIRs activadores y reconocen HLA-C propio causen desórdenes autoinmunes en estos individuos, aunque se ha establecido una asociación genética entre KIRs activadores y enfermedades autoinmunes (Kulkarni *et al.*, 2008) (ver Tabla 11).

2.2.3 RECEPTORES KIR Y ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD

Diferentes combinaciones de genes HLA y KIR se han asociado a protección o susceptibilidad de una gran variedad de enfermedades autoinmunes, cáncer, infecciones virales o fallo reproductivo. Los genes KIR manifiestan una rápida evolución que no puede ser justificada solamente en base a las divergencias en el sistema HLA (Vilches *et al.*, 2002). Muy probablemente, la diversidad KIR haya estado dirigida por la presión ejercida por los patógenos ambientales, de tal manera que buena parte de esta diversidad va a poder ser correlacionada con la susceptibilidad o resistencia a las enfermedades. De hecho, tal y como se resume en la Tabla 11 se han realizado numerosos estudios que revelan mayor o menor grado de asociación entre las interacciones HLA-KIR y el desarrollo de diversos tipos de enfermedad.

TABLA 11. Asociación entre enfermedad y combinaciones génicas KIR-HLA (Adaptado de Rajagolapan y Long, 2005 y Kulkarni *et al.*, 2008)

PATOLOGÍA	PARES HLA-KIR	EFECTO	REFERENCIA
ENFERMEDADES INFECCIOSAS			
Infección por VIH ¹	KIR3DS1/Bw4-80I	Menor progresión	Martin <i>et al.</i> , 2002
	KIR3DL1*004/Bw4	Menor progresión	Martin <i>et al.</i> , 2007
	KIR3DL1*h/Bw4-80I KIR3DS1	Riesgo reducido de infección	Long <i>et al.</i> , 2008; Ravet <i>et al.</i> , 2007; Jennes <i>et al.</i> , 2006
VHC ²	KIR2DL3/HLA-C1 (homocigosis)	Resolución de la infección	Khakoo <i>et al.</i> , 2004
CMVh ³	KIR2DL1	Infecciones recurrentes por CMV	Gazit <i>et al.</i> , 2004
	Más de un KIR activador en la médula ósea del donante de un trasplante	Protección frente a la reactivación del CMV en el receptor del trasplante	Cook <i>et al.</i> , 2006
VHS ⁴	KIR3DS1, en ausencia de HLA-Bw4	Reactivación del VHS durante IRD5 en SIDA	Price <i>et al.</i> , 2007
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	KIR2DL1, KIR2DL3	Susceptibilidad	Méndez <i>et al.</i> , 2006
<i>Plasmodium falciparum</i>	KIR3DL2*002	Alta respuesta a hematíes infectados	Artavanis-Tsakonas <i>et al.</i> , 2003
ENFERMEDADES AUTOINMUNES E INFLAMATORIAS			
Artritis psoriásica	KIR2DS1/2DS2, HLA del grupo Cw (homocigosis)	Susceptibilidad	Nelson <i>et al.</i> , 2004
Psoriasis	KIR2DS1/HLA-Cw6	Susceptibilidad	Luszczek <i>et al.</i> , 2004
	KIR2DS1; KIR2DL5; KIR haplotipo B	Susceptibilidad	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
Vasculitis reumatoide	KIR2DS2/HLA-Cw03	Susceptibilidad	Yen <i>et al.</i> , 2001

Escleroderma	KIR2DS2+/2DL2-	Susceptibilidad	Momot <i>et al.</i> , 2004
Síndrome coronario agudo	Expresión de novo de KIR2DS2 en células CD4+ CD28-	Susceptibilidad	Nakajima <i>et al.</i> , 2003
DM-T1⁵	KIR2DS2/HLA-C1	Susceptibilidad	Van der Slik <i>et al.</i> , 2003
Endometriosis	KIR3DS1/HLA-Bw4	Protección	Kitawaki <i>et al.</i> , 2007
Corioretinopatía tipo Birdshot	Combinaciones KIR/HLA débiles y KIR activadores en individuos HLA-A*29+	Susceptibilidad	Levinson <i>et al.</i> , 2008
Bronquiectasias idiopática	HLA-C1/C1 y KIR2DS1/2DS2	Susceptibilidad	Boyton <i>et al.</i> , 2006
Colangitis esclerosante primaria	KIR3DL1/HLA-Bw4; KIR2DL1/HLA-C2	Protección	Karlsen <i>et al.</i> , 2007
CÁNCER			
Melanoma maligno	KIR2DL2/2DL3; HLA-C1	Susceptibilidad	Naumova <i>et al.</i> , 2005
Leucemia	KIR2DL1; KIR3DS1	Susceptibilidad	Verheyden <i>et al.</i> , 2004
Linfoma de Hodgkin	KIR2DS1; KIR3DS1	Protección	Besson <i>et al.</i> , 2007
Carcinoma nasofaríngeo	Cinco o más KIRS activadores	Susceptibilidad	Butsch <i>et al.</i> , 2005
Cáncer cervical inducido por VPH⁶	KIR3DS1 y ausencia de HLA-C2 y/o HLA-Bw4	Susceptibilidad	Carrington <i>et al.</i> , 2005
	No KIR3DS1 con HLA-C2 y/o HLA-Bw4	Protección	
Leucemia linfocítica de células T grandes y granulares	Expresión de KIRs inhibidores en ausencia de ligando	Cuadro más severo	Nowakowski <i>et al.</i> , 2005
Leucemia linfocítica de células NK grandes y granulares	Expresión de Kira activadores	Posible contribución a la patogénesis	Morice <i>et al.</i> , 2003; Zambello <i>et al.</i> , 2003
Síndrome de Sezary	Expresión de KIR3DL2	Marcador diagnóstico útil	Bahler <i>et al.</i> , 2007
REPRODUCCIÓN			
Preeclamsia	Madre con fenotipo KIR AA; feto con HLA-C2	Susceptibilidad	Hiby <i>et al.</i> , 2004
Abortos espontáneos recurrentes	Ausencia de KIR2DS1 en madre y frecuencia aumentada de HLA-C2 tanto en madre como en su pareja	Susceptibilidad	Hiby <i>et al.</i> , 2008
	Frecuencias aumentada de KIR2DS2 y disminuida de HLA-C2; frecuencia global de KIRS activadores aumentada	Susceptibilidad	Wang <i>et al.</i> , 2007
	Mayor expresión en superficie de KIR2DL4	Susceptibilidad	Yan <i>et al.</i> , 2007
¹ VIH, Virus de Inmunodeficiencia Humana; ² VHC, Virus de la Hepatitis C; ³ CMVh, Citomegalovirus humano; ⁴ VHS, Virus del Herpes Simplex; ⁵ DM-T1, Diabetes Mellitus Tipo 1; ⁶ VPH, Virus del Papiloma Humano.			

Esta asociación se asienta sobre la base de que las células NK son importantes reguladores del sistema inmunitario y sus funciones van más allá de la simple eliminación de las células alteradas. Las células NK en su interacción con células dendríticas, macrófagos y células trofoblásticas pueden a su vez ver regulada su propia actividad en términos de producción de citoquinas, citotoxicidad y estimulación de las respuestas dependientes de linfocitos Th1 (Rajagopalan y Long, 2005). Así, una fuerte estimulación de células NK puede constituir un factor positivo en la resolución de infecciones virales, en la lucha frente a tumores y el embarazo, pero resultar indeseable en el contexto de patologías autoinmunes o, incluso, de transformación neoplásica, esto último, en relación con el riesgo de desarrollar cáncer en un contexto de inflamación crónica. Un ejemplo sería el Virus del Papiloma Humano (VPH) que estabiliza su latencia previniendo la lisis de las células infectadas mediada por células NK (Woodworth, 2002). En esta situación, la infección por el VPH provocaría una respuesta proinflamatoria a través de citoquinas secretadas por células NK en ausencia de citotoxicidad, favoreciendo la transformación neoplásica.

Sin embargo, el variado repertorio de receptores presentes en células NK que les permiten interpretar el ambiente en el que se encuentran, hace extraordinariamente difícil alcanzar una explicación simple. A esto se suma el alto grado de polimorfismo entre los receptores KIR, referido no sólo al polimorfismo de cada molécula sino también al contenido genético de cada individuo (Parham, 2005). Se sabe que haplotipos diferentes pueden contener un número variable de genes KIR, con pocos o ningún KIR activador (haplotipos A) o por el contrario contener varios KIR activadores (haplotipos B). De esta manera, los individuos con varios genes KIR activadores, simplemente tienen mayor posibilidad de expresar al menos uno de dichos KIR activadores en sus células, más si tenemos en cuenta que cada célula NK contiene su propio repertorio de receptores, que expresan de manera estocástica. Por lo tanto, la asociación a enfermedad de las combinaciones KIR-HLA no puede interpretarse simplemente como una suma de señales activadoras que ensalzan la actividad de las células NK.

Algunos trabajos sostienen que los receptores KIR activadores son absolutamente dispensables. De hecho, hay haplotipos KIR que carecen de genes KIR2DS y KIR3DS funcionales (Hsu *et al.* 2002). Además, todos los individuos tienen

células NK desprovistas de KIRs activadores. Si tenemos en cuenta que la expresión de receptores KIR activadores e inhibidores no está coordinada, resulta poco probable que las formas activadoras contribuyan a la función de las inhibidoras. Por otro lado, la especificidad por el ligando de los KIRs activadores, no está completamente esclarecida. KIR2DS1 y KIR2DS2 pueden unir HLA-C (Bassoni *et al.*, 1997; Valés-Gómez *et al.*, 1998), pero existe la posibilidad que se unan a ligandos alternativos, como ligandos no-HLA-C descritos en células de melanoma (Katz *et al.*, 2004). Existe la posibilidad que los KIR activadores puedan igualmente unirse a proteínas virales, tal y como ha sido descrito en modelos murinos para la proteína de m157 del citomegalovirus (Arase *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002), o incluso que los KIRs activadores manifiesten funciones ligando-independientes.

Es posible igualmente que la expresión de receptores KIR en algunas subpoblaciones de linfocitos T pueda contribuir a algunas de las asociaciones vistas en los estudios genéticos. Los KIRs activadores podrían establecer un efecto sinérgico con el TCR, para inducir activaciones inmunes y/o autoinmunes aberrantes. Por ejemplo, KIR2DS2 se expresa en un porcentaje elevado de linfocitos T CD4+CD28- en pacientes de artritis reumatoide con complicaciones vasculares y es un factor de riesgo para esta enfermedad (Yen *et al.*, 2001). Incluso en linfocitos T que carecen de DAP12, la expresión de KIR2DS2 coestimula las señales del TCR, para inducir la secreción de citoquinas (Snyder *et al.*, 2003).

2.2.4 CÉLULAS NK Y MIELOMA

El mieloma múltiple es una transformación tumoral asociada a una profunda disregulación inmunológica. Se sabe que las células NK pueden intervenir en la respuesta inmune frente al mieloma y algunas de las nuevas quimioterapias con fármacos inmunomoduladores median sus efectos anti-mieloma en parte potenciando las funciones de las células NK (Quach *et al.*, 2010). Estudios *in vitro* realizados en los últimos veinte años han verificado el efecto citotóxico de las células NK sobre células de mieloma (Frohn *et al.*, 2002). Junto a esto, otros estudios han demostrado que la función de las células NK se mantiene en pacientes con MGUS y mielomas de nuevo diagnóstico, pero conforme la enfermedad progresa desciende la supervivencia de las células NK y el efecto citotóxico contra las células mielomatosas (Godfrey y Benson,

2012). Estos hallazgos fomentan la idea de que las células NK pueden contribuir inicialmente al control de las células plasmáticas malignas, pero este efecto se va aminorando con la progresión de la patología.

Algunos factores del microambiente donde se desarrolla el mieloma, como TGF- β , IL-6, IL-10 o prostaglandina E2 (PGE2), propician no sólo la propagación tumoral sino también la disfunción inmunológica de las células NK (Pratt *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 1995). Así mismo, señales intermedias como STAT3 pueden promover el crecimiento de la población mielomatosa y suprimir simultáneamente la función de las células NK (Wang T *et al.*, 2004; Kortylewski *et al.* 2005). Los **linfocitos Treg** (CD4+CD25^{high}) están elevados en mieloma múltiple y pueden suprimir la función de las células NK mediante la producción de TGF- β . TGF- β puede inducir la fosforilación de SMAD3 (Small Mothers Against Decapentaplegic homologue 3) y suprimir la producción de IFN- γ mediada por CD16 y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o ADCC (Trotta *et al.*, 2008). **TGF- β** también reduce la capacidad de respuesta de las células NK a citoquinas proinflamatorias como IL-12 o IL-15 (Yu J *et al.*, 2006). Por otro lado, existen otras citoquinas cuyos niveles están elevados en mieloma y contribuyen a la disfunción de las células NK, como **IL-6** que afecta a la citotoxicidad de las células NK (Tanner *et al.*, 1991) o IL-10 que es un antagonista de la producción de IFN- γ (Tripp *et al.*, 1993; D'Andrea *et al.*, 1993). Otro ejemplo lo constituiría la ciclooxigenasa 2 o **COX-2** expresada por las células mielomatosas. Esta enzima está relacionada con la enfermedad avanzada y el pronóstico clínico pobre (Ladetto *et al.*, 2005; Cetin *et al.*, 2005). COX-2 dirige la producción celular de **PGE2** en estas células (Hoang *et al.*, 2006), que produce a su vez una supresión de la citotoxicidad, producción de citoquinas y migración de las células NK (Holt *et al.*, 2011).

Algunos factores específicos del mieloma también contribuyen a la evasión y atenuación de las funciones de las células NK. En primer lugar, hay que resaltar que la presencia de una **concentración elevada de inmunoglobulinas policlonales** *per se* pueden suprimir la ADCC realizada por las células NK (Komiyama *et al.*, 1986 y Gherman *et al.*, 1987), efecto que puede ser revertido por tratamiento con IL-2 exógena (Frassanito *et al.*, 1997; Moța *et al.*, 1999). En mieloma, la inmunidad de las células NK se puede ver igualmente afectada por la reducción en la concentración de citoquinas importantes en la activación, proliferación y función de las células NK. En

estos pacientes, se ha demostrado la presencia en suero de niveles elevados del **receptor de IL-2 soluble** (que se correlaciona con la concentración de inmunoglobulina monoclonal), lo que puede interferir en la activación de las células NK mediada por linfocitos T vía IL-2 (Nielsen *et al.*, 1991). **IL-15** es una citoquina que desempeña un papel importante en el desarrollo y la supervivencia de las células NK, sin embargo, se ha descrito la expresión funcional constitutiva de su receptor en las células mielomatosas, por lo que esta citoquina puede igualmente estimular el crecimiento tumoral (Tinhofer *et al.*, 2000).

Igualmente importante para la disfunción de las células NK en mieloma múltiple es la modulación negativa de receptores activadores como CD244 y CD16 (Fauriat *et al.*, 2006), DNAM-1, NKG2D y/o NKp46 (El-Sherbiny *et al.*, 2007), o de sus ligandos en la célula mielomatosa como MICA (un ligando para NKG2D) (Bedel *et al.*, 2011; Jinushi *et al.*, 2008; Carbone *et al.*, 2005). Fenómeno que también puede estar relacionado con la liberación de MICA soluble por la célula tumoral, lo que puede provocar la regulación a la baja del NKG2D en las células NK (Jinushi *et al.*, 2008). Otros estudios describen además, un aumento en las formas solubles de HLA clase-I y β 2-microglobulina a lo largo de la evolución tumoral hasta mieloma y hasta leucemia de células plasmáticas (Pérez-Andrés *et al.*, 2005), y los relacionan con peores pronósticos para este tumor (Pérez-Andrés *et al.*, 2005). El incremento en la concentración de HLA clase-I soluble puede estimular la señalización a través de receptores inhibidores y bloquear la respuesta de células NK.

Las células de mieloma expresan el ligando para PD-1 (*Programmed Death 1*) lo que puede suprimir tanto los procesos de la inmunidad innata como los de la adaptativa, al unirse a su receptor en linfocitos T y células NK (Benson *et al.*, 2010). Las células plasmáticas malignas pueden igualmente suprimir de manera activa la expresión de ligandos del receptor de activación DNAM-1 (Soriani *et al.*, 2009).

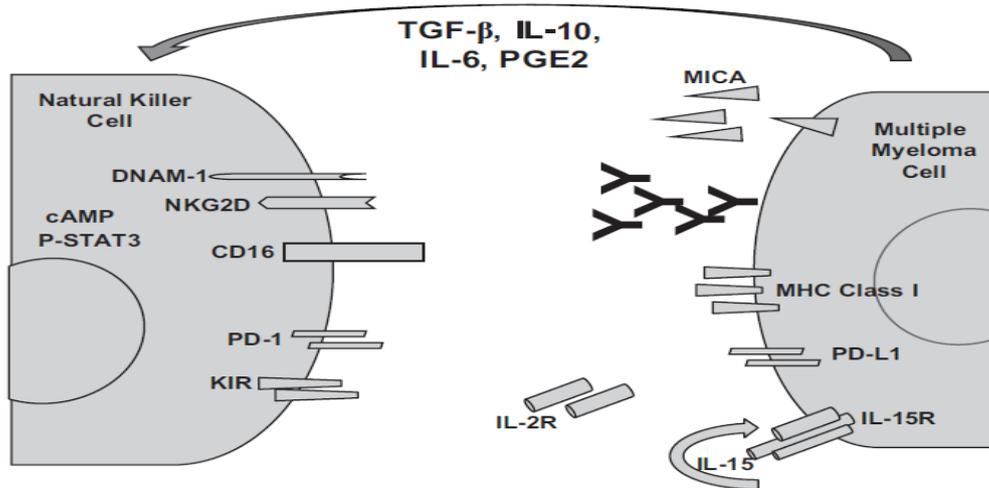


Figura 17: Estrategias de evasión del mieloma múltiple frente a células NK. Las células de mieloma secretan citoquinas tales como TGF- β , IL-6, IL-10 o PGE2, entre otras, y suprimen la función de las células NK. La inmunoglobulina monoclonal que este tumor produce también puede afectar directamente a las células NK. El mieloma múltiple se asocia con niveles aumentados del receptor soluble de IL-2 y las células patológicas secretan IL-15 y exhiben IL15R, creando un bucle de retroalimentación que contribuye a la homeostasis del mieloma. Además, el balance entre receptores y ligandos activadores e inhibidores de las células NK se altera a través de un aumento de receptores inhibidores como MHC clase-I y PD-L1, mientras que de manera simultánea, los ligandos activadores se reducen y las formas solubles de los ligandos de activación son secretadas. Las células NK en mieloma puede presentar mayores niveles de AMPc como resultado del PGE2 secretada por las células de mieloma, lo que inhibe la respuesta inmunológica, tal y como ocurre con la fosforilación de STAT3. En estados avanzados de mieloma, las células NK de los pacientes presentan niveles reducidos de receptores activadores como DNAM-1, NKG2D o CD16 y también expresan el receptor inhibidor PD-1.

2.2.4.1 TERAPIA CON CÉLULAS NK FRENTE A MIELOMA

A pesar de todos los mecanismos de evasión que desarrolla el mieloma múltiple para escapar del control de las células NK, un número creciente de trabajos experimentales y clínicos señalan la posibilidad de utilizar estas células en inmunoterapia contra el mieloma. Las primeras experiencias se llevaron a cabo utilizando citoquinas, como los interferones, capaces de estimular la actividad citolítica de las células NK in vitro (Uchida *et al.*, 1984; Ogmundsdóttir, 1988) e in vivo (Einhorn *et al.*, 1982), especialmente la de las células NK de la médula ósea de pacientes que respondían al tratamiento (Millar *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1997). Dos meta-análisis muestran que la terapia con IFN- α consiguen respuestas en torno al 20% de los pacientes, mejorando tanto la progresión libre de enfermedad como la SG, pero los efectos secundarios fueron considerables (Gisslinger, 1997; Fritz y Ludwig, 2000). Algunos estudios preclínicos y clínicos, asociaron la IL-2 al tratamiento con IFN- α , con resultados equiparables y de nuevo con elevada toxicidad (Porrata *et al.*, 2001). Aun

así, IFN- α continúa siendo una línea de tratamiento frente al mieloma múltiple (Anderson *et al.*, 2011).

2.2.4.1.1 AGENTES INMUNOMODULADORES DE LA FUNCIÓN DE CÉLULAS NK

Los agentes inmunomoduladores talidomida y lenalidomida ejercen efectos pleiotrópicos anti-mieloma, incluyendo un aumento en la actividad de las células NK frente al mieloma (Quach *et al.*, 2010). **Talidomida** es un agente inmunomodulador al inducir la producción de IL-2 por parte de LT, que a su vez estimula la activación de células NK, y es antiinflamatorio, pero no induce directamente la muerte de las células de mieloma. Además inhibe la producción de IL-1, IL-12, TNF- α y TNF- γ e incrementa el cociente de linfocitos T CD8/CD4 al reducir los linfocitos Th circulantes (Davies *et al.*, 2001). Por su parte, **Lenalidomida** es un derivado de la talidomida que inhibe el crecimiento y la proliferación de las células tumorales, posee acción antiangiogénica y potencia la actividad de linfocitos T y células NK, al incrementar la expresión de CD16 y favorecer la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) contra el mieloma (Tai *et al.*, 2005). Lenalidomida tiene también un efecto favorecedor en el balance entre receptores activadores e inhibidores de las células NK, lo que lleva a respuestas más efectivas frente a mieloma. Este fármaco incrementa la expresión de ULBP-1 en células de mieloma y disminuye la de PD-L1, lo que resulta en una mejora en la supervivencia, reconocimiento y lisis de las células mielomatosas por las células citolíticas (Benson *et al.*, 2010, 2011). Estos fármacos inmunomoduladores también disregulan la expresión de SOCS1 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1*) lo que deriva en una mayor sensibilidad a los estímulos del microambiente (Görgün *et al.*, 2010).

Actualmente, **Dexametasona** está demostrando en ensayos in vitro efectos sinérgicos con Lenalidomida contra el mieloma. Sin embargo, Dexametasona parece antagonizar los efectos inmunomoduladores de Lenalidomida como la producción de IL-2 por los linfocitos T (Gandhi *et al.*, 2010).

Bortezomib es un inhibidor del proteosoma (complejo proteico que rompe las proteínas innecesarias o dañadas dentro de una célula) que parece conferir eficacia contra el mieloma al aumentar la actividad anti-mieloma de las células NK. Esta droga, reduce la expresión de HLA clase I en las células de mieloma, lo que mejora la respuesta de las células NK (Shi *et al.*, 2008). Efecto que ha sido igualmente

confirmado para otros inhibidores del proteosoma (Wu *et al.*, 2011). Además, Bortezomib puede hacer a las células de mieloma más sensibles a la lisis vía TRAIL (una vía citotóxica utilizada por efectores inmunes como linfocitos T y células NK o vía Fas/Fas-L (Hallett *et al.*, 2008).

La terapia con anticuerpos monoclonales se inició tardíamente en el caso del mieloma múltiple. No se inició hasta que se identificó la expresión casi universal en la membrana de las células mielomatosas de la glicoproteína CS1, que parece modular la interacción entre estas células y el estroma medular (Hsi *et al.*, 2008). Esta glicoproteína es de expresión pobre en células normales. Elotuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 que reconoce a CS1 y parece conferir efectos anti-mieloma vía ADCC mediada por células NK (Van Rhee *et al.*, 2009).

IPH2101 es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG4 frente a los receptores inhibidores KIR2DL1, 2DL2 y 2DL3, que al impedir la señalización negativa que median dichas moléculas, mejora la capacidad citolítica de las células NK frente a células tumorales autólogas, tanto in vivo como in vitro (Benson *et al.*, 2011; Romagné *et al.*, 2009). Datos recientes obtenidos en un ensayo clínico fase I indican que la combinación de Lenalidomida con IPH2101 conduce a un efecto sinérgico en el que Lenalidomida favorece la activación de las células NKs y IPH2101 las libera de las señales inhibitoras (Benson *et al.*, 2011).

2.2.4.1.2 CÉLULAS NK Y TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA EN PACIENTES CON MIELOMA

Diversos datos sugieren que las células NK pueden contribuir al efecto antitumoral en el trasplante de células madre o SCT (del inglés *Stem Cells Transplant*), tanto de naturaleza autóloga como alogénica.

En el contexto del trasplante autólogo, numerosos estudios demuestran la relación entre la recuperación linfocitaria temprana y los resultados de supervivencia asociados al trasplante de células madre en mieloma (Porrata *et al.*, 2001,2004; Kim H *et al.*, 2006; Hiwase *et al.*, 2008). En esos estudios, no resultaba posible identificar qué población linfocitaria fue la responsable de dichos resultados. Sin embargo, se sabe que la reconstitución cuantitativa y funcional de los linfocitos T y B que sigue al trasplante de células madre puede verse aplazada meses, mientras que la

reconstitución de las células NK ocurre tan solo en dos semanas tras el trasplante (Porrata *et al.*, 2001). Estudios posteriores verificaron esta idea, demostrando que el valor absoluto de linfocitos en el día +15 ($>500/\mu\text{L}$) y en el día +30 ($>1000/\mu\text{L}$) tras el SCT se correlaciona con mejor supervivencia libre de enfermedad y SG en mieloma múltiple (Porrata *et al.*, 2004; Hiwase *et al.*, 2008).

En estos trabajos, tras la infusión de linfocitos se observó que la dosis de células NK infundida se correlacionaba con la recuperación temprana del valor absoluto de linfocitos (Porrata *et al.*, 2003). La subpoblación de células NK analizada reveló que, además, un conteo igual o superior a 80 células/ μL en el día +15 post-SCT se correlacionaba con mejor supervivencia libre de enfermedad. Esta correlación no se estableció de manera significativa con otras subpoblaciones linfocitarias como CD3+, CD4+, CD8+ y CD19+ (Siddiqui *et al.*, 2006).

Estos hallazgos sugieren que la recuperación temprana del recuento de células NK tras altas dosis de quimioterapia, puede facilitar la actividad de células NK frente al mieloma, posiblemente debido a una mejora en cociente de célula efectora: célula diana.

Otros autores sugieren que el melfalán, que es el agente más común en las terapias de acondicionamiento pre-SCT, puede regular positivamente la expresión de los ligandos activadores sobre células mielomatosas, haciéndolas más susceptibles a la lisis por células NK (Soriani *et al.*, 2009). Además, los agentes alquilantes como el melfalán no parecen suprimir la función de las células NK (Soriani *et al.*, 2009; Markasz *et al.*, 2007).

Aunque aún no se conocen todos los detalles sobre los mecanismos que acontecen en ese periodo post-SCT, parece que dicho periodo es particularmente atractivo para la inmunoterapia mediada por las células NK.

Sin embargo, donde mayores evidencias se han encontrado de un efecto injerto contra mieloma (Markasz *et al.*, 2007) de las células NK ha sido en el **trasplante alogénico de médula ósea**, tanto a nivel experimental (Alici *et al.*, 2008) como clínico, donde la infusión de células NK haploideénticas, seleccionadas para garantizar el reconocimiento de la ausencia de ligando para moléculas KIR inhibitoras con sus ligandos HLA clase I ha producido ratios de respuesta muy favorables en mielomas avanzados (Shi *et al.*, 2008). En estas situaciones, hay que destacar que no se produce

enfermedad injerto contra huésped ni fallo en las células madre alogénicas injertadas. Tal es el caso de la leucemia mieloblástica aguda (Ruggeri *et al.*, 2002), donde primero fue descrito este efecto, y donde el adecuado emparejamiento KIR-ligando en la selección donante-receptor puede mejorar los resultados tras el SCT en mieloma (Kröger *et al.*, 2005). Kröger y su equipo (Kröger *et al.*, 2011) han demostrado que el haplotipo KIR del donante puede influir en el resultado del SCT alogénico en mieloma. En su estudio, tanto la supervivencia libre de enfermedad como la SG fueron mejores en pacientes que recibieron injertos de donantes con haplotipos KIR de tipo B, más ricos en receptores activadores que los receptores de haplotipos A.

Los criterios de selección de un donante adecuado en este sentido se basan en los trabajos de los grupos de Moretta (2011), Ruggeri (2006) y Velardi (2012) y han resultado muy efectivos en las terapias de leucemias agudas agresivas. El donante ideal debe ser un individuo que tenga al menos una incompatibilidad con el receptor en los ligandos KIR (HLA-C1, -C2 o Bw4, son los más considerados), es decir, que al menos un ligando esté ausente en el receptor del injerto y presente en el donante. Esto permitiría que una clona NK KIR+ se licencie en presencia de su ligando correspondiente y manifieste capacidad alorreactiva frente a las células leucémicas del receptor, al reconocer en ellas la pérdida de su ligando correspondiente. Esta alorreactividad frente a las células del donante, se vería reflejada en diversos aspectos beneficiosos que se representan en la Figura 18:

- 1) Favorecer la implantación del injerto, evitando su rechazo al eliminar células T alorreactivas del huésped.
- 2) Eliminar la enfermedad residual, aprovechando la alorreactividad NK, según las directrices de la hipótesis de pérdida de ligando propio o "*Missing self*".
- 3) Limitar la enfermedad injerto contra huésped, al eliminar las células dendríticas del huésped, y evitar la presentación de aloantígenos.

La población NK alorreactiva se detecta a las 6-7 semanas post-trasplante y manifiesta un patrón de expresión KIR semejante al encontrado en el donante. Parece que este efecto se debe a la megadosis de células madre CD34+ transfundidas que pueden producir un microambiente medular semejante al presente en el donante

(Moretta *et al.*, 2011). De esta manera, el proceso de educación ocurriría en el receptor bajo las mismas condiciones dadas en el donante, lo que produciría células NK licenciadas de naturaleza alorreactiva.

Otra ventaja de la población NK es que actúa principalmente sobre células hematopoyéticas del huésped sin afectar a los tejidos sanos y por ello, esta población no está implicada en la Enfermedad Injerto Contra Huésped o EICH (Moretta *et al.*, 2011). En modelos murinos, está probado que son los linfocitos T alogénicos los causantes de dicho efecto y no así las células NK (Ruggeri *et al.*, 2002). Parece que la resistencia tisular al ataque NK se debe a la baja o nula expresión de ligandos para receptores activadores de las células NK (Bottino *et al.*, 2003).

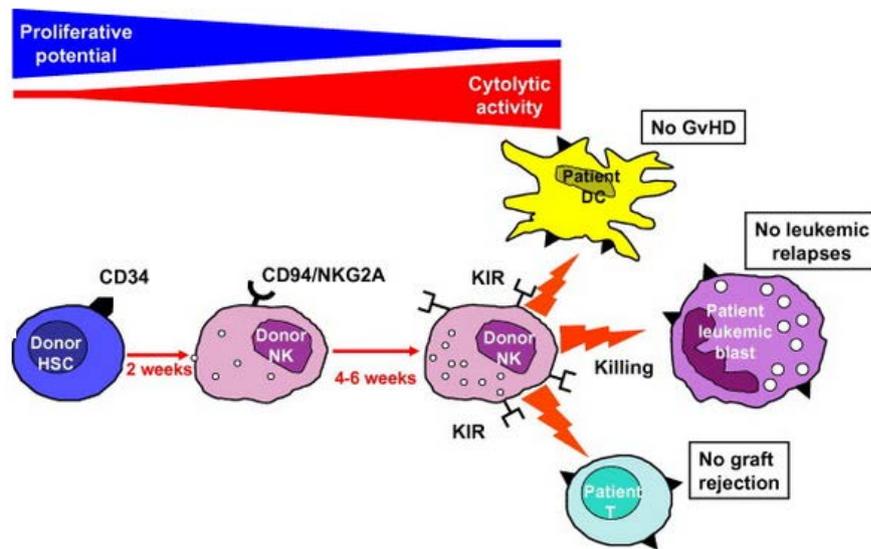


Figura 18. Generación de células NK alorreactivas y su papel terapéutico en el trasplante de células madre hematopoyéticas. Durante las dos primeras semanas, los precursores experimentan una proliferación intensa y se comprometen en la línea NK. En estados posteriores, la actividad proliferativa se ve mermada. Los primeros signos distintivos experimentados son la expresión CD94/NKG2A y la capacidad de secretar citoquinas; en especial, IFN- γ y TNF- α . Tras ello, aparece la expresión de los receptores KIR y aumenta la capacidad citotóxica, que es máxima en las células NK KIR+. Vemos, además, los efectos sobre las diferentes poblaciones del donante. La lisis de las células dendríticas evita la EICH; al eliminarse la población T, se reduce el riesgo de rechazo y la actividad frente a las células blásticas es crucial en la lucha contra la leucemia (Moretta *et al.*, 2011).

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La progresión clínica de un proceso tumoral se ve condicionada por diversos factores, algunos intrínsecos a la biología del propio tumor y otros, relacionados con el microambiente donde este se desarrolla. Las variaciones genéticas que pueden conducir a la transformación celular y a su malignización, se traducen en un fenotipo distintivo, un patrón de alteraciones genéticas específicas y una capacidad proliferativa y apoptótica bien definida. Estas características pueden tener valor predictivo de la evolución clínica de la enfermedad y de la supervivencia de los pacientes. Debido al envejecimiento actual de la población, la incidencia de discrasias de células plasmáticas se ha incrementado de forma notable, por lo que disponer de biomarcadores sencillos y económicos, es uno de los aspectos determinantes para prevenir el avance de la enfermedad, y orientar el manejo integral del paciente, evitando procedimientos innecesarios y costosos. Así, estos biomarcadores pueden ser de la máxima importancia en la selección del tratamiento más adecuado y en la monitorización de su eficacia en cada paciente. Por otro lado, el sistema inmunitario del huésped ejerce una presión anti-tumoral que es responsable de eliminar las células tumorales emergentes. Sin embargo, cuando este sistema de vigilancia se ve superado la enfermedad aparece y progresa, aunque de forma muy variable en cada paciente. Actualmente conocemos que los linfocitos T CD3+ y células NK CD56+, pueden tener un papel importante en el control de tumores en función de que la interacción de las moléculas KIR con sus ligandos HLA clase-I determine su actividad. Por eso, es posible que la cantidad y/o la calidad/diversidad de esas células del sistema inmunitario en tanto que mediadoras de la respuesta antitumoral, puedan condicionar igualmente la progresión de la enfermedad y ser de interés como marcador pronóstico tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Así pues, nuestra hipótesis se fundamenta en que un análisis conjunto de marcadores en sangre periférica y médula ósea, en pacientes con diversos tipos de discrasias de células plasmáticas, permitirá seleccionar biomarcadores sensibles y específicos, que pueden ser de utilidad tanto para el diagnóstico diferencial de las diferentes tipos de discrasias, como para la predicción del riesgo de progresión de la

enfermedad o la indicación de terapias individualizadas adaptadas a las características de cada paciente.

2 OBJETIVOS

Caracterizar en pacientes con diversos tipos de discrasias de células plasmáticas, biomarcadores en sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) para establecer parámetros con capacidad diagnóstica y pronóstica de la evolución clínica de los pacientes, en base al tiempo hasta la progresión de la enfermedad y la supervivencia global de los pacientes. Para ello, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Analizar las características biológicas de las células plasmáticas en MO (fenotipo, cariotipo, capacidad proliferativa y apoptótica), en un grupo control sano y en pacientes con discrasias de células plasmáticas, tanto en sus formas más benignas (Gammapatía monoclonal de significado incierto), como en las más agresivas mieloma múltiple quiescente y mieloma múltiple sintomático, y relacionarlas con las características clínico-patológicas y la evolución de la enfermedad de los pacientes.
- 2.- Estudiar la presencia y el fenotipo de células plasmáticas tumorales en SP, para establecer una relación con las características biológicas de las células plasmáticas de MO, con el diagnóstico del paciente y con la evolución de la enfermedad. Con el fin último de evaluar la capacidad diagnóstica y pronóstica del estudio de la sangre periférica en las discrasias de células plasmáticas.
- 3.- Analizar en células inmunitarias de sangre periférica, la expresión de las moléculas de activación/adhesión CD62L, HLA-DR y CD56 en linfocitos T, así como la expresión de moléculas KIR2DL en linfocitos T (CD4+ y CD8+) y células NK, y para correlacionarlas con las características biológicas de las células plasmáticas de MO y SP, el tipo de gammapatía al diagnóstico y la evolución clínica de la enfermedad.

III PACIENTES Y MÉTODOS

1 DISEÑO Y JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

El presente trabajo se plantea como un estudio prospectivo y multicéntrico, para evaluar las características fenotípicas, proliferativas, apoptóticas y citogenéticas de las células tumorales de médula ósea que aparecen en pacientes con diferentes tipos de discrasias de células plasmáticas de nuevo diagnóstico. En el mismo se pretende establecer una relación con las características clínico-patológicas y la evolución de la enfermedad de los pacientes, con el objeto de establecer biomarcadores sensibles y específicos que sean de utilidad tanto para el diagnóstico diferencial de las diferentes tipos de discrasias, como para la predicción del riesgo de la enfermedad y la selección de terapias individualizadas adaptadas a las características de cada paciente. Para ello comparamos las características biológicas citadas de los diferentes subgrupos de enfermedades entre sí y con un grupo control normal, así como su correlación con la evolución clínica.

En este trabajo, también evaluamos la utilidad del análisis de las muestras de sangre periférica de estos pacientes para establecer una correcta clasificación y estadificación de estas enfermedades, con el fin último de evitar la realización de punciones medulares y las morbilidades derivadas de esta técnica.

Por último, investigamos el papel del sistema inmunitario en estas enfermedades. A tal efecto, se propone estudiar la expresión de moléculas de activación y adhesión (CD57, CD62L y HLA-DR) en linfocitos T así como la de moléculas que regulan la función/activación de los linfocitos T y células NK particularmente receptores KIR2D en muestras de sangre periférica de pacientes al diagnóstico o aquellos que sin ser de reciente diagnóstico no han recibido tratamiento y de individuos sanos, con el fin de poder relacionarlos con la aparición y evolución de discrasias de células plasmáticas y con las características biológicas de sus células patológicas.

Por tanto, se trata de un proyecto de investigación multidisciplinar que involucra a aspectos hematológicos e inmunológicos y que cuenta con un componente de investigación básica y otro de investigación clínica aplicado a pacientes con diversos tipos de discrasias de células plasmáticas. Como se ha indicado en los objetivos

pretendemos aportar datos originales que nos indiquen nuevos biomarcadores en sangre periférica y médula ósea con valor diagnóstico y pronóstico, así como evaluar la implicación del sistema inmunitario en la evolución clínica de los pacientes, mediante un análisis de la tasa de progresión y de la supervivencia global.

2 PACIENTES, GRUPOS DE ESTUDIO Y MUESTRAS RECOGIDAS

El estudio incluye el seguimiento de pacientes de nuevo diagnóstico de discrasia de células plasmáticas (MGUS, SMM y MM) y pacientes que sin ser de nuevo diagnóstico no han recibido tratamiento, procedentes de los Servicios de Hematología del Hospital Universitario Rafael Méndez de Lorca, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y Hospital de Santa Lucía de Cartagena de la región de Murcia entre los años 2010 y 2012.

Para la inclusión de los pacientes en los distintos grupos experimentales se siguieron los criterios del grupo internacional de trabajo para el mieloma múltiple (IMWG 2003):

1. **Gammapatía monoclonal de significado incierto.** Debe cumplir todos los criterios siguientes:
 - a. Proteína monoclonal en suero <3 g/dL.
 - b. Células plasmáticas clonales en médula ósea <10%.
 - c. Ausencia de alteraciones como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas (cuyo acrónimo en inglés es *CRAB*) y que puedan ser atribuidas a un desorden de la proliferación de las CPs.
2. **Mieloma quiescente, Smoldering o MM asintomático.** Debe cumplir todos los criterios siguientes:
 - a. proteína monoclonal en suero (IgG o IgA) \geq a 3 g/1dL y/o
 - b. células plasmáticas clonales en médula ósea \geq a 10% y
 - c. ausencia de alteraciones como lesiones líticas, anemia, hipercalcemia o fallo renal que se atribuyan a un desorden de la proliferación de CP.

3. **Mieloma múltiple.** Debe cumplir todos los criterios siguientes:

- a. CPs clonales en MO \geq al 10% o plasmocitoma, aunque se acepta el diagnóstico de MM con valores inferiores a los fijados siempre que exista afectación orgánica atribuible al mieloma.
- b. Presencia de CM en suero u orina (excepto en pacientes con MM no secretor) y
- c. Evidencia de alteraciones que puedan ser atribuidas a la proliferación maligna de células plasmáticas, específicamente, hipercalcemia \geq 11,5 mg/dL o insuficiencia renal con creatinina sérica $>$ a 1,73 mmol/L; anemia (normocítica, normocrómica), entendida como el descenso de la cifra de hemoglobina 2g/dL por debajo del valor de la hemoglobina habitual del paciente o bien $<$ 10g/dL y lesiones óseas como lesiones líticas, osteopenia severa o fractura patológica.

Más recientemente el IMWG han propuesto nuevos criterios para el diagnóstico de MM (Rajkumar *et al.*, 2014). Siguiendo esta nueva clasificación, la mayoría de los pacientes SMM (17 de 25) de nuestro estudio se incluirían en el grupo de MM. Por lo que añadiremos a nuestros datos el estudio estadístico de un grupo denominado SMM+MM.

Como grupo control se han estudiado personas sanas voluntarias comparables en sexo y edad con los pacientes, de los que se obtuvieron el mismo tipo de muestras.

En todos los casos, la inclusión de pacientes y controles, se realizó bajo la estricta aceptación del consentimiento informado.

2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes de nuevo diagnóstico de discrasias de células plasmáticas (MGUS, SMD o MM) o pacientes ya diagnosticados que no habían recibido tratamiento y cumplieran los criterios de la IMWG descritos anteriormente.
- Pacientes que, además, durante su proceso diagnóstico requirieron de un estudio del aspirado de médula ósea para su correcta filiación, seguimiento o/y orientación terapéutica.
- Aceptación del consentimiento informado.

2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes que habían recibido tratamiento previamente frente a la discrasia de células plasmática.

- Pacientes con bandas monoclonales en suero procedentes de otras patologías linfoides, como el linfoma linfoplasmocitoide o el síndrome de POEMS.
- Pacientes con discrasias que recibieran tratamientos inmunosupresores o inmunomoduladores por otras patologías.
- Pacientes de los que a pesar de cumplir los criterios de inclusión, no se pudo conseguir sangre periférica para realizar el estudio completo.
- No aceptación del consentimiento informado.

2.3 GRUPOS DE ESTUDIO

- **Grupo control sano:** El grupo control queda constituido por individuos sanos que requirieron cirugía traumatológica de reposición de cadera, rodilla o patología similar, y que dieron su consentimiento para la obtención de muestras de médula ósea y sangre periférica durante el proceso quirúrgico bajo anestesia general. Se excluyeron los individuos con patologías del sistema inmunológico y/o hematopoyético, o que estuvieran bajo tratamiento con fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores. El grupo final constó de 30 individuos sanos con un rango de edad equiparable a los de los pacientes. Las muestras se recogieron en el mismo acto quirúrgico mediante aspirado medular y venopunción, siguiendo protocolos habituales, en colaboración con el Servicio de Traumatología del Hospital U. Virgen de la Arrixaca.
- **Grupos experimentales:** De los 175 pacientes recogidos en el periodo señalado, se descartaron 11 por diferentes causas, quedando finalmente un total de 164 de pacientes que cumplían los criterios de la IMWG. Estos se dividieron en los siguientes subgrupos experimentales:
 - a. Pacientes con MGUS: n = 86.
 - b. Pacientes con MM indolente (SMM): n = 25.
 - c. Pacientes con MM sintomático: n = 53.

2.4 MUESTRAS RECOGIDAS

- **Muestras de sangre periférica:** Se extrajo a la inclusión del estudio, tanto de pacientes como de controles sanos, una muestra de 3 ml sangre periférica anticoagulada con EDTA(etilendiaminotetraacético), que se utilizó para el análisis de poblaciones celulares y la expresión de receptores KIR2D en linfocitos T y células NK.
- **Muestras de aspirados de médula ósea:** Igualmente a la inclusión del estudio y tanto en pacientes como en controles sanos, se tomó una muestra de 3 ml de médula ósea anticoagulada con EDTA que se utilizó para realizar los estudios de fenotipo, los índices de proliferación y de apoptosis de las células plasmáticas y la técnica de FISH. Otra muestra, se envió de manera protocolizada a un laboratorio de referencia para estudio citogenética (Balague Center, Barcelona y Centro Inmunológico de Alicante).

2.5 TRATAMIENTOS

Del total de los 164 pacientes, solo los mielomas sintomáticos recibieron tratamiento compuesto por:

- Melfalán-prednisona: 6 pacientes
- Corticoides a altas dosis: 2 pacientes
- Esquemas basados en Bortezomib:
 - VMP (bortezomib-melfalán-prednisona): 12 pacientes (2 de ellos radioterapia asociada)
 - VelDex (bortezomib-dexametasona): 15 pacientes (2 de ellos con radioterapia asociada, 5 asociados a TAPH)
 - PAD (bortezomib-ciclofosfamida-dexametasona):17 pacientes (16 asociados a TAPH)
- Esquemas basados en lenalidomida:
 - Lenalidomida-dexametasona: 11 pacientes
- Otros: 3 pacientes (bendamustina, ponatinib, ciclo alternante VBMCP/ABVD)

Un paciente no recibió tratamiento por éxitus antes de iniciarlo y otro por rehusar el mismo. Los tratamientos administrados se registraron a lo largo de la evolución de los pacientes con el fin de valorar su impacto en la evolución de la enfermedad.

3 VARIABLES DE ESTUDIO

3.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICO-BIOLÓGICAS

- **Variables demográficas:** edad, sexo, hospital de procedencia.
- **Radiografía ósea convencional:** incluye lateral de cráneo, tórax, pelvis, huesos largos de brazos y piernas (ambos húmeros y fémures) y lateral y postero-anterior de columna cervical, dorsal y lumbar.
- **Variables clínicas:** seguimiento clínico de la enfermedad, para establecer su evolución y diferenciar MGUS o SMM “progresivos” y “no progresivos” y en caso de MM sintomático, permitir la estratificación pronóstica de Durie y Salmon e ISS y el tipo de tratamiento recibido.
- **Progresión y supervivencia:** se analizó la tasa de progresión y la SG.

3.2 VARIABLES CITOMORFOLÓGICAS

- Porcentaje de células plasmáticas en médula ósea observadas al microscopio óptico
- Presencia de células plasmáticas de morfología atípica (plasmablásticas)
- Signos de displasia en serie mieloide y eritroide
- Celularidad medular, aumentada, normal o disminuida

3.3 VARIABLES DE LABORATORIO

- Hematimétricas: hemoglobina, hematocrito, leucocitos y plaquetas.
- VSG(velocidad de sedimentacion globular)
- Bioquímicas: Creatinina, calcio sérico, β 2microglobulina, LDH, albúmina, proteína C reactiva (PCR) y proteínas totales.
- Inmunoquímicas: Cuantificación e identificación del componente monoclonal.
- Análisis de las cadenas libres en suero.

3.4 VARIABLES EXPERIMENTALES

Que se irán describiendo con mayor detalle en los resultados de esta memoria, pero que podrían englobarse de forma genérica en los siguientes apartados:

- Inmunofenotipo de células plasmáticas en médula ósea.
- Índices de proliferación y apoptosis de células plasmáticas en médula ósea.
- Ploidía de células plasmáticas en médula ósea evaluado por citometría de flujo.
- Alteraciones citogenéticas por citogenética convencional (cariotipo).
- Alteraciones citogenéticas detectadas por FISH en células plasmáticas purificadas.
- Células plasmáticas circulantes en SP.
- Marcadores de activación de linfocitos T en sangre periférica.
- Expresión de receptores KIR2D en células T y NK de sangre periférica.

4 INSTRUMENTACIÓN

4.1 EQUIPOS DE HEMATIMETRÍA Y BIOQUÍMICA

- Contador celular: la hematimetría se realizó en analizador Coulter® LH 750 analyzer (Beckman Coulter).
- Lector de VSG: Beckman Coulter.
- Analizador de bioquímica: los parámetros bioquímicos fueron determinados en DXC Beckman Coulter.

- Sistema Hydrasys focusing®: La cuantificación del componente monoclonal se realizó por electroforesis con sistema automatizado en Hydrasys focusing® (Sebia Hispania SA) utilizando proteínas Hydragel™. Tras la electroforesis el gel de proteínas se escaneó utilizando un densitómetro y las proteínas séricas incluyendo la proteína monoclonal se calcularon utilizando un software Sebia Phoresis™.
- Sebia Hydrasys®: La identificación del componente monoclonal se realizó utilizando IF hydragel™ tanto en suero como en orina.
- analizadores nefelométricos Siemens BNTM II y BN ProSpec®: El análisis de las cadenas libres en suero se realizó con usando como reactivos N Latex (Siemens) κFLC y λ FLC.

4.2 EQUIPOS DE CITOMETRÍA

En nuestro estudio se utilizaron los citómetros de flujo FACS-Canto II y FACS-LSR II Becton-Dickinson®. En la Tabla 12, se resumen las características técnicas de ambos equipos.

TABLA 12. Características técnicas de los citómetros de flujo utilizados.

		FACSCanto-II (10 parámetros, 8 FLs)	LSR-II (12 parámetros, 10 FLs)
Láseres	Parámetro o FL	Dicroico/filtro	Dicroico/filtro
405nm	Pacific blue	- / 440-40	- / 440-40
	AmCyan	LP505 / 525-50	LP505 / 525-50
488nm	FSC	Fotodiodo-488	Fotodiodo-488
	SSC	- / 488/10	- / 488/10
	FITC	LP502 / 530-30	LP502 / 530-30
	PE	LP556 / 575-26	LP556 / 575-26
	PE-Alexa610	No disponible	LP595 / 610-20
	PerCp/PE-Cy5	LP655 / LP670	LP655 / LP670
	PE-Cy7	LP735 / 780-60	LP735 / 780-60
635nm	APC	- / 660-20	- / 660-20
	Alexa-700	No disponible	LP685 / 710-20
	APC-Cy7	LP735 / 780-60	LP735 / 780-60

APC, alofocianina; FITC, fluoresceína; FL, fluorescencia; FSC, forward scatter; PE, ficoeritrina; PerCP, peridinin-chlorophyll-protein; PE-Cy5, PE-Cianina-5; PE-Cy7, PE-Cianina-7; SSC, side scatter

5 ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica de estudio celular multiparamétrica basada en el análisis de una suspensión de células marcadas con elementos que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda y que se hacen pasar alineadas de una en una por delante de un haz de luz focalizado procedente de uno o más láseres. La interacción del haz de luz sobre la célula produce señales que son recogidas por diferentes detectores y que permiten diferenciar distintos parámetros. Estos parámetros pueden estar relacionados con características intrínsecas de la célula, como el tamaño (FSC, del inglés, *Forward Scatter*) y la complejidad y granularidad celular (SSC, del inglés, *Side Scatter*), o con sus características antigénicas (Inmunofenotipo) ya sean marcadores situados en la superficie o el citoplasma/núcleo celular.

5.1 MUESTRAS ESTUDIADAS

Se utilizaron muestras de SP anticoaguladas con EDTA obtenidas mediante punción y aspiración venosa, que se utilizaron para la caracterización de CPs en SP, el estudio de marcadores de activación de linfocitos T (CD57, DR y CD62L) y la detección de la expresión de moléculas KIR2D en linfocitos T y NK.

Así mismo, se utilizaron muestras de MO anticoaguladas con EDTA obtenidas mediante punción y aspiración ósea (generalmente del esternón) que se utilizaron para caracterizar fenotípicamente las células plasmáticas (en superficie y citoplasma) y para evaluar su capacidad proliferativa/ploidía (citometría de ADN) y apoptótica (tinción con Anexina-V).

La concentración celular requerida para realizar los estudios por citometría es de entre 6 y 15 millones de leucocitos por mililitro, por lo que en algunas ocasiones, particularmente con muestras de MO hipercelulares, fue requerido una dilución de la muestra, que se realizó con PBS-1%BSA (fosfato-buffer-salino- 1% de seroalbúmina bovina) hasta obtener dicha concentración.

5.2 ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS (AcMo)

Tal como se detalla en la tabla 13, los AcMo utilizados estaban conjugados con diversos fluorocromos.

Tabla 13. Anticuerpos monoclonales (AcMo) y reactivos utilizado en citometría

Especificidad antigénica	Fluorocromo	Clon	Fabricante	Referencia
CD3	AmCyan	SK7	BD	339186
CD3	Pacific blue	UCHT1	BD-Pharmingen	558117
CD4	Alexa-700	RM4-5	BD-Pharmingen	557922
CD4	PE-Cy7	SK3	BD	348809
CD4	Alexa-700	RM4-5	BD-Pharmingen	557922
CD8	PerCp	SK1	BD	345774
CD8	APC	RPA-T8	BD-Pharmingen	555369
CD8	APC-Cy7	SK1	BD-Pharmingen	557834
CD13	PE	L138	BD	347406
CD14	APC	47-3D6	ImmunoStep	14A-100T
CD16	Pacific blue	3G8	BD-Pharmingen	558122
CD19	PE-Cy7	SJ25C1	BD	341113
CD20	Vioblue	LT20	Miltenyi Biotech	130-094-167
CD27	APC-H7	M-T271	BD-Pharmingen	560222
CD28	PE	L293	BD	348047
CD38	APC	HB7	BD	345807
CD38	PerCp	HIT2	BD-Pharmingen	551400
CD45	APC-Cy7	2D1	BD	348815
CD45	PerCP	2D1	BD	345809
CD56	PE	MY31	BD	345810
CD56	PE-Cy7	NCAM16.2	BD	335826
CD57	FITC	HKN-1	BD	333169
CD62L	PE	Dreg	BD-Pharmingen	555544
CD117	PerCP-Cy5.5	104D2	BD	333950
CD138	FITC	B-B4	IQP	IQP153F
CD158a (KIR2DL1)	FITC	143211	RyD	FAB1844F
CD158a/h (KIR2DL1/S1)	PE	EB6B	Immunotech	2277
CD158b (KIR2DL3)	APC	180704	RyD	FAB2014P
CD158bj (KIR2DL2/L3/S2)	PE-Cy5	GLI83	Beckman Coulter	A66900
Anexina-V	V450	No aparece	BD-Pharmingen	560506
HLA-DR	PerCP	L243 (G46-6)	BD	347402
IgA	FITC	Policlonal	Dako	F0057
IgG	FITC	G18-145	BD-Pharmingen	555786
IgM	PE	Policlonal	Dako	R5111
IgKappa	APC	Policlonal	Dako	CO222
IgLambda	PE	JDL-12	BD-Pharmingen	555797

5.3 PANELES DE ESTUDIO

Los paneles de estudio fueron predefinidos para cada tipo de muestra e indican los tubos diseñados con las combinaciones y cantidades de AcMos para el estudio de la SP y MO (Tablas 14 y 15 respectivamente). Por otro lado indica el método de tinción utilizado, el instrumento de análisis y el número de células adquiridas en las últimas líneas de la tabla.

TABLA 14. Panel de estudio de inmunofenotipo para caracterizar marcadores de activación/adhesión y KIR2D en linfocitos y la presencia de CP aberrantes en SP

Fluorocromo	Tubo-1. Activación T	Tubo-2. Expresión KIR2D	Tubo-3. CPs en SP
FITC	CD57	CD158a (KIR2DL1)	CD138 (20µl)
PE	CD62L	CD158a/h (KIR2DL1/S1)	CD56
PerCP	HLA-DR	CD158b/j (KIR2DL2/S2/L3)	CD45
PE-Cy7	CD4	CD56	CD19
APC	CD8	CD158b (KIR2DL3)	CD38
Alexa700	-	CD4 (2.5µl)	-
APC-Cy7	CD45 (2µl)	CD8 (2.5µl)	CD27
PB	CD16 (2µl)	CD16 (1µl)	CD20
AmCyan	CD3 (10µl)	CD3 (2.5µl)	-
Método	Tinción directa	Tinción directa	Tinción directa
Instrumento	FACSCanto-II (BD)	LSR-II (BD)	FACSCanto-II (BD)
Nº eventos	50.000*	200.000*	200.000**

La cantidad de AcMo añadido por 50µl de SP fue de 5µl, excepto donde se indican otras cantidades.

* Linfocitos definidos en ventana FSC/SSC (tamaño y complejidad).

** Células totales. Se adquieren 200.000 eventos para la prospección inicial. Ante la evidencia de aCPs en SP se incrementó el número de eventos a 1×10^6 .

TABLA 15. Panel de estudio de inmunofenotipo para caracterizar CP de MO

Fluorocromo	Tubo-1	Tubo-2	Tubo-3	Tubo-4	Tubo-5	Tubo-6
FITC	CD66	CD138 (20µl)	CD138 (20µl)	IgAcit	IgGcit	CD38
PE	CD13	CD56	CD28	IgMcit	Igλcit	IP
PerCP	CD8	CD45	CD117 (10µl)	CD38 (2µl)	CD38 (2µl)	
PE-Cy7	CD4	CD19	CD19	CD19	CD19	
APC	CD14	CD38	CD38	IgKcit	IgKcit	
APC-Cy7	CD45 (2µl)	CD27	CD45 (2µl)	CD45 (2µl)	CD45 (2µl)	
PB o V450	CD16 (2µl)	CD20	Anexin-V	-	-	
AmCyan	CD3 (10µl)	-	-	-	-	
Método	T. directa	T. directa	T. directa	Ig-citoplas	Ig citoplas	Cit.ADN
Nº eventos*	50.000	200.000	200.000	300.000	300.000	100.000

* Eventos adquiridos de células totales en FACSCanto-II (BD).

Todos los tubos fueron adquiridos en un FACSCanto-II (Becton Dickinson).

5.4 MÉTODOS DE TINCIÓN

- **Tinción directa de marcadores de superficie**

Para la caracterización de marcadores de superficie se siguió el siguiente protocolo:

- Tomar 50µL de la muestra a estudiar.
- Poner 5µL de cada AcMo en cada tubo según el panel, salvo cuando se especifique otra cantidad.
- Mezclar bien e incubar en oscuridad a temperatura ambiente 10min.
- Añadir 3mL de solución de lisado/fijado (1x BD FACS *Lysing Solution*, *Becton-Dickinson*®) y agitar bien.
- Incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante 5min.
- Centrifugar durante 5min a 1800rpm.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración, resuspender en 3mL de solución de lavado (PBS+1%BSA) y agitar.
- Centrifugar durante 5min a 1800rpm.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración, resuspender en 300µL de PBS+1%BSA y agitar
- Adquirir inmediatamente.

- **Eliminación de inmunoglobulinas séricas**

En aquellos casos en los que se quiere identificar la presencia de Igs, ya sean de superficie celular o intracitoplasmática, resulta necesaria la eliminación de las Igs presentes en el suero que interferirían en el estudio. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

- En un tubo de 10ml y fondo cónico, poner 300µL de la muestra.
- Completar el volumen del tubo con PBS-BSA-1%.
- Centrifugar a1800rpm, 5min, a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración
- Agitar y repetir el 2º y 3º paso.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración.
- Resuspender la muestra para proceder a su tinción.

- **Tinción de marcadores citoplasmáticos**

Las CP no suelen expresar inmunoglobulina en la membrana celular, por el contrario presentan grandes cantidades en vesículas citoplasmáticas para ser secretadas. Por ello, para poder estudiar su clonalidad se hace necesario realizar una tinción intracitoplasmática.

Este proceso se llevó a cabo utilizando el conjunto de reactivos de marcaje intracitoplasmático (*IntraStain, Fixation and Permeabilization Kit for Flow Cytometry, DAKO®*), que contiene reactivos de fijación (reactivo A) y de permeabilización (reactivo B). Para ello se siguió el protocolo que se describe a continuación:

- Tomar 50µL de la muestra a estudiar a un tubo de citometría.
- Añadir los AcMos de membrana (5µl o lo que corresponda según Tabla), e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Añadir 100µL de reactivo A (fijación) a la sangre y agitar.
- Incubar 20min a temperatura ambiente.
- Lavar con 4ml de PBS+1%BSA y centrifugar 5 min a 1800rpm.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración, agitar y añadir 50µL de reactivo B (permeabilización) y los AcMos para la tinción en citoplasma (5µl o lo que corresponda según Tabla).
- Incubar 20min a temperatura ambiente.
- Lavar con 4ml de PBS+1%BSA, centrifugar 5 min a 1800rpm.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración y agitar en vortex
- Resuspender en 300µL de FACS Flow-BD o PBS y adquirir.

- **Estudio de ploidía y ciclo celular (marcaje de ADN)**

Los estudios de ciclo celular en MM han demostrado poseer un importante valor pronóstico, y la detección de aneuploidías de ADN en CP se ha sugerido que podría constituir una herramienta de gran utilidad para la detección de enfermedad mínima residual en estos pacientes y contribuir al diagnóstico diferencial entre MM y MGUS. Mediante el reactivo *CYCLOSCOPE-MM, Cytognos®*, se optimiza el estudio de aneuploidías y distribución en las diferentes fases del ciclo celular (G0/G1, Síntesis y G2/M) de las CPs.

El procedimiento consiste en un marcado indirecto con FITC (floresceín-isotiocianato) del marcador CD38 para identificar las CP, seguido de tinción con yoduro

de propidio que se une al ADN (agente intercalante). Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

- Tomar 50 μ L de la muestra a la concentración adecuada en tubo de citómetro.
- Añadir 20 μ L del AcMo primario y agitar la mezcla.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Para eliminar el AcMo primario no unido, se debe rellenar cada tubo con 3 ml PBS (FACSFlow) y centrifugar a 1800rpm durante 5 minutos; después aspirar el sobrenadante y resuspender el botón celular golpeando suavemente con los dedos el fondo del tubo.
- Añadir 20 μ L del anticuerpo secundario conjugado con FITC y agitar la mezcla.
- Incubar en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Para eliminar los restos de anticuerpo secundario rellenar cada tubo con 3 ml PBS (FACSFlow) y centrifugar a 1800rpm durante 5 minutos; luego aspirar el sobrenadante y resuspender el botón celular golpeando suavemente con los dedos el fondo del tubo.
- Añadir 2mL de la solución de lisis (*FACS Lysing Solution*) para eliminar los hematíes. Cerrar el tubo, agitar la mezcla e incubar en oscuridad durante 10 minutos.
- Para eliminar de la mezcla los hematíes lisados centrifugar a 1800rpm durante 5 minutos, aspirar el sobrenadante y escurrir el tubo sobre papel de filtro, eliminando así los posibles restos de solución lisante. A continuación resuspender el botón celular golpeando suavemente con los dedos el fondo del tubo.
- Añadir 1ml de solución de marcado de ADN (yoduro de propidio) e incubar la mezcla durante un mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad (máximo 3 horas).
- Adquirir en un citómetro de flujo siempre en posición de velocidad baja (low).

- **Aislamiento de células mononucleadas para estudio de receptores KIR2D**

El aislamiento y purificación de células mononucleadas para estudio de receptores KIR2D en linfocitos T y NK se realizó siguiendo la técnica descrita por Böyum (1968). A saber, un mililitro de sangre anticoagulada con EDTA se diluye a ½ con suero salino fisiológico (solución de ClNa 0.9%) y se deposita cuidadosamente, sin romper la interfase, sobre el medio de separación (Ficoll-Hypaque), centrifugando 20 minutos a 600g. El anillo de células mononucleares formado en la interfase se recupera y se lava 2 veces por adición de PBS+1%BSA y centrifugación a 400g 5 minutos. Las células obtenidas se resuspenden rutinariamente en 50µl de PBS+1%BSA con posterior tinción directa como se describe en el apartado 5.4.1.

5.4.1 AJUSTE DE LOS CITÓMETROS

Ambos equipos, FACS-Canto II y FACS-LSR II son citómetros digitales de nueva generación en los que lo más crítico es el ajuste del voltaje de los fotomultiplicadores. Su ajuste se realizó de manera manual, siguiendo un procedimiento similar al utilizado de forma tradicional en los citómetros analógicos (tipo FACSCalibur).

- **Ajuste del voltaje de los fotomultiplicadores**

Brevemente, para este ajuste se utilizaron células de un origen similar a las estudiadas en la rutina diaria y en este trabajo, células totales de SP o MO frescas. Las muestras se tiñeron con un solo fluorocromo siguiendo el protocolo de tinción directa/lisado/lavado con AcMos conjugados con cada una de las fluorescencias. Habitualmente se utilizaron AcMos anti-CD4 disponible para todas las fluorescencias de nuestros equipos. A su vez, se lisaron células sin tinción alguna, que se utilizaron para ajustar basalmente todos los fotomultiplicadores.

Con las células sin teñir, se fueron ajustando los voltajes de FSC y SSC (trabajando en lineal) hasta dar la apariencia de tamaño/granulación deseada a las células. Igualmente se fueron ajustando todos los voltajes de las fluorescencias (trabajando en logarítmico) para que las células sin teñir estuvieran contenidas entre 100 y 103. Posteriormente se utilizaron los tubos marcados con fluorescencias simples, y se ajustaron finamente los voltajes de la fluorescencia correspondiente, para maximizar la señal positiva de la población celular teñida sin incrementar el fondo

("background") de la población negativa. Estos tubos también se utilizaron para ajustar las compensaciones entre fluorescencias, según protocolo que se describe a continuación.

En general el ajuste de los voltajes fue estable, y salvo grandes variaciones por averías, sustituciones de láseres, o la fibra óptica, no fue necesario reajustar los voltajes.

- **Ajuste de la compensación entre fluorescencias**

Las compensaciones de las fluorescencias, sin embargo, fueron más variables y por ello se requirió un ajuste diario para cada muestra y tubo. Los citómetros digitales de elevada sensibilidad, son sensibles a mínimas variaciones en la intensidad de la señal y por tanto se ven influidos de forma importante por las fluctuaciones diarias de la potencia de los láseres, lotes de los reactivos, el proceso de lisado, etc.

La "compensación de fluorescencias" es un proceso matemático que permite determinar y restar la cantidad de una fluorescencia que estimula indebidamente el resto de los fotodetectores que no se corresponden con su detector específico. Dado que los espectros de emisión de fluorescencia de los fluorocromos se extienden generalmente por un número más o menos amplio de nanómetros de longitud de onda, es habitual que la señal de un fotodetector se vea contaminada por la luz emitida por fluorocromos de espectros próximos.

Para el ajuste basal de las fluorescencias, se utilizaron los tubos marcados con fluorescencias simples, descritos en la sección anterior, en un protocolo que se resume en la figura 19. Se consideró una fluorescencia bien compensada, cuando la población positiva para dicha fluorescencia (Ej. FL-1+) mostraba una intensidad media de fluorescencia (IMF) para la otra fluorescencia (Ej. FL-2) del dot-plot (diagramas de puntos), similar a la de la población FL-1 negativa (FL-1-). Cuando se produce un exceso de compensación, la población FL-1+ adquiere valores de IMF para la FL-2 inferiores a la población FL-1-, y viceversa, si la compensación es insuficiente, la población FL-1+ adquiere valores de IMF mayores para FL-2 que la población FL-1-, obviamente siempre que dichas células no sean doblemente positivas para ambas fluorescencias.

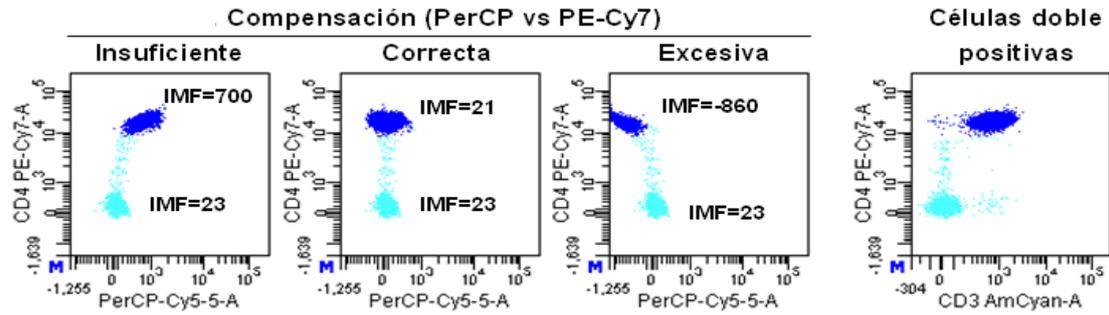


Figura 19. Ajuste basal de compensaciones entre fluorescencias. Se muestra un ejemplo de compensación para células teñidas con CD4 PE-Cy7 frente a la fluorescencia PerCP. Cuando la compensación es insuficiente, la IMF para PerCP de las células PE-Cy7+ es mayor que la IMF de las células PE-Cy7-. Por el contrario, si la compensación es excesiva, la IMF para PerCP de las células PE-Cy7+ es inferior (y negativa) a la de las células PE-Cy7-. Si la compensación es correcta, la IMF para PerCP de ambas poblaciones PE-Cy7+ y PE-Cy7- son similares. Este proceso se repitió para todas las combinaciones posibles de fluorescencias. Igualmente se muestran dichas células en doble tinción con CD3 en AmCyan, para diferenciar una doble positividad (“pot” más a la derecha) de una compensación insuficiente (Plot más a la izquierda).

Para el ajuste diario, se utilizó una planilla en la que se combinaron todas las fluorescencias dos a dos, en tantos dot-plots como fueron necesarios. En la figura 20 se muestra dicha planilla en la que se ha ajustado las compensaciones para las fluorescencias del tubo-1 de MO en el FASCanto-II.

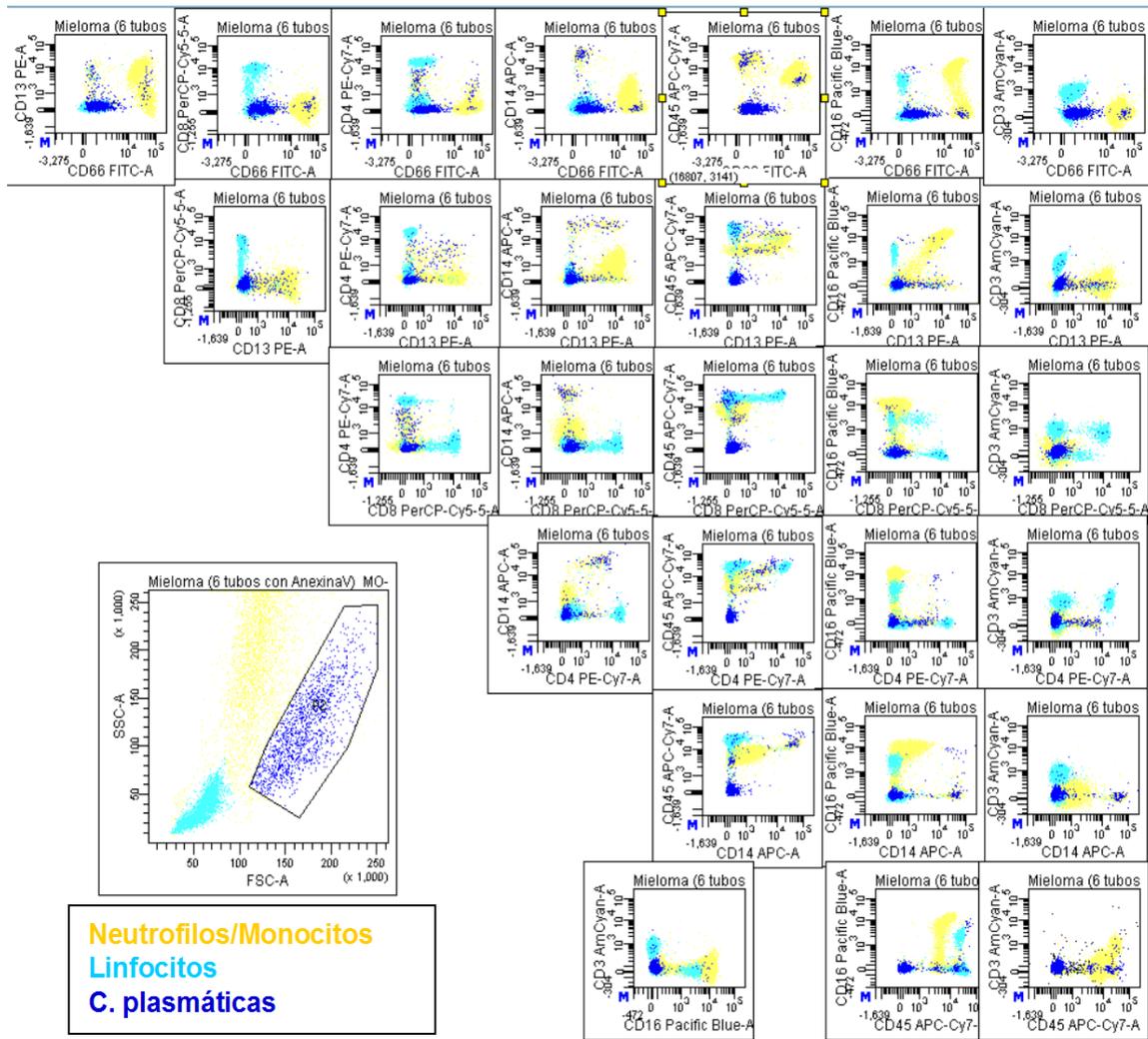


Figura 20. Sistemática de compensación diaria de fluorescencias. Este panel está asociado a cada tubo y permite de un vistazo rápido comprobar que todas las fluorescencias están compensadas unas con otras. En caso de detectarse alguna descompensación se ajustarían dos a dos cada una de las fluorescencias siguiendo los criterios de la figura-19.

5.4.2 SISTEMÁTICA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS

Tanto para FACSCanto-II como para LSR-II Se generaron plantillas (*templates* en inglés) de adquisición/análisis en Diva Software (*Becton-Dickinson*[®]) y para cada uno de los tubos, se diseñaron tantos *dot-plots* (gráficos de puntos, bidimensionales) o histogramas (unidimensionales) como fueron necesarios para la adquisición y análisis de las muestras. En los *dot-plots* y/o histogramas se diseñaron las ventanas (*gates* en inglés) de análisis necesarias, y estas se jerarizaron y ligaron lógicamente para obtener la información de los parámetros deseados en cada una de las poblaciones celulares de interés.

Dada la dificultad y lo extenso que resultaría explicar cada una de las ventanas de análisis realizadas, se muestra la sistemática de análisis en cada tubo de SP y MO en una impresión de pantalla para cada tubo (Figuras de la 21 a 29)

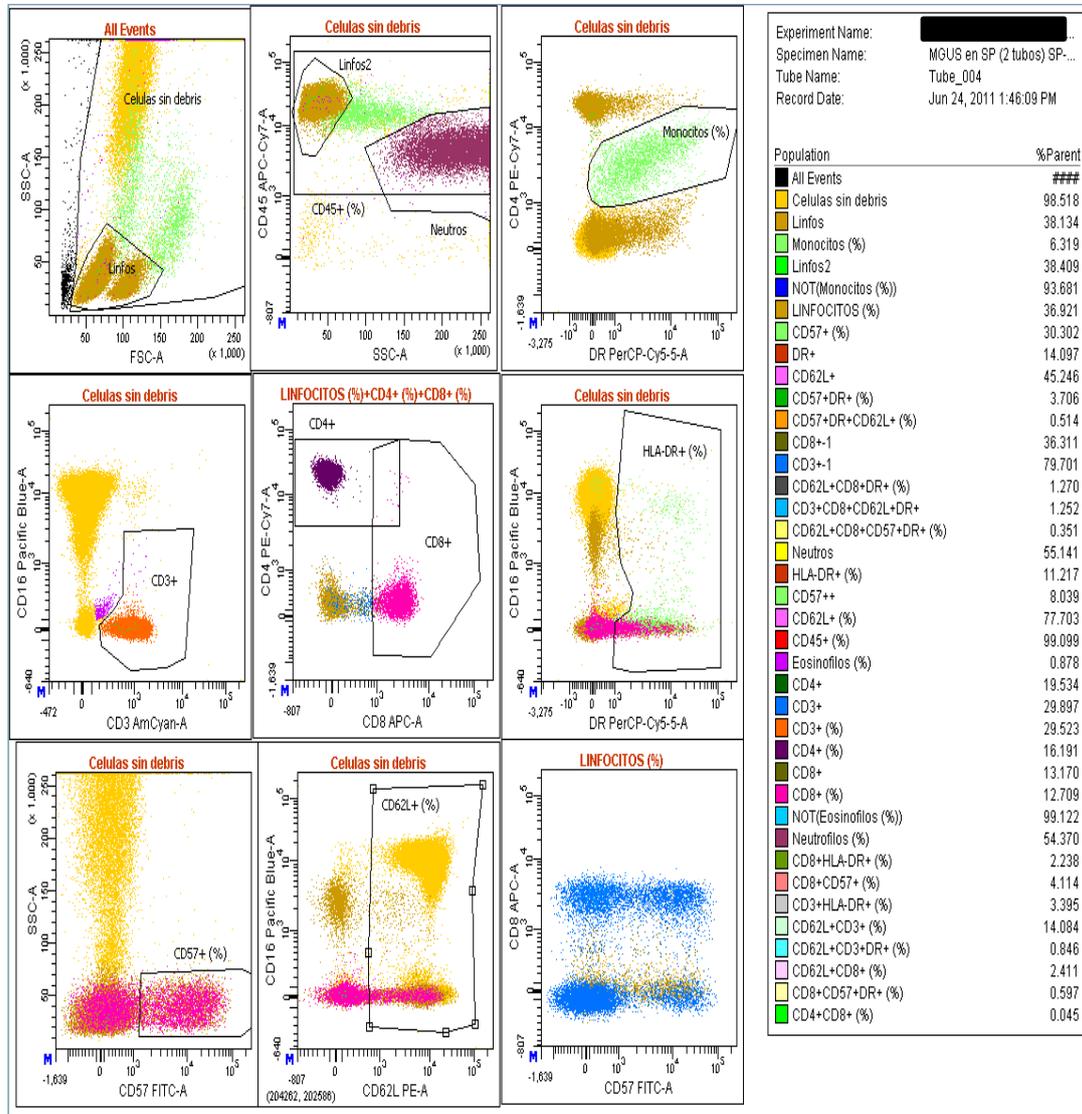


Figura 21. Tubo-1 de SP: diseñado para definir las poblaciones de linfocitos, monocitos y neutrófilos en SP, así como la expresión de moléculas de senescencia/activación/adhesión CD57, CD62L y HLA-DR en linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+.

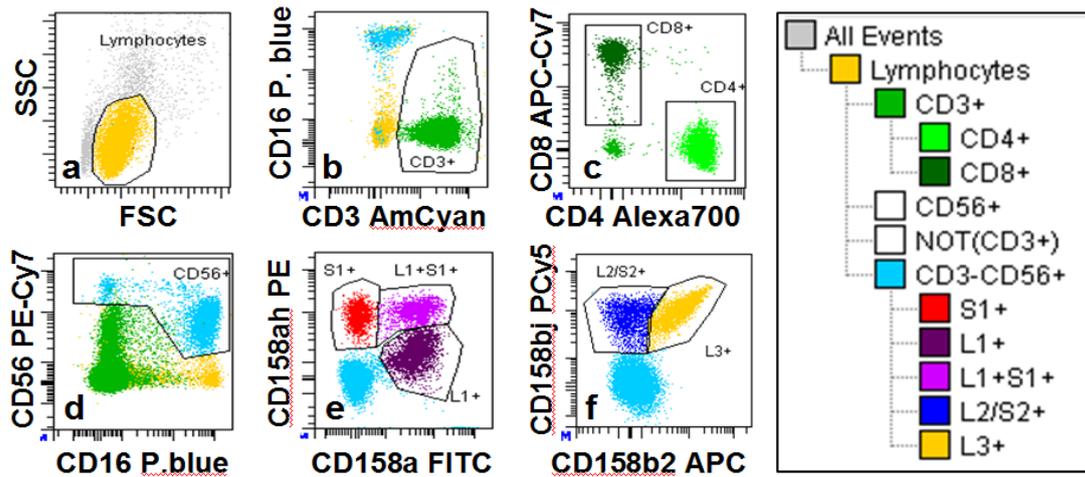


Figura 22. Tubo-2 de SP: diseñado para analizar la expresión de receptores KIR2DL1, 2DS1, 2DL2/S2 y 2DL3 en linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ y células NK CD3-CD56+, tanto CD16-CD56++ como CD16+CD56+.

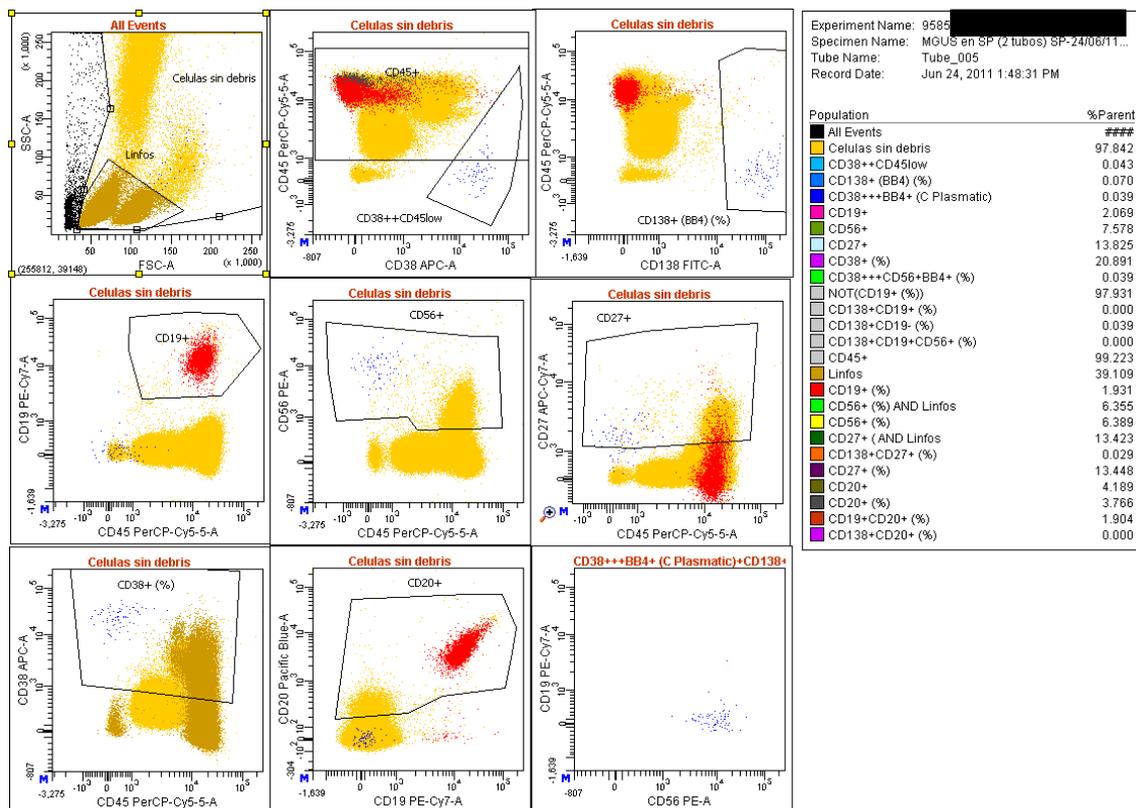


Figura 23. Tubo-3 de SP: diseñado para determinar la frecuencia de CP totales (CD38+++CD138+) y diferenciar CP sanas (CD19+ y/o CD27++ y/o CD45++) de las patológicas/aberrantes (CD19- y/o CD20+ y/o CD27-/+débil y/o CD45-/+débil y/o CD56+).

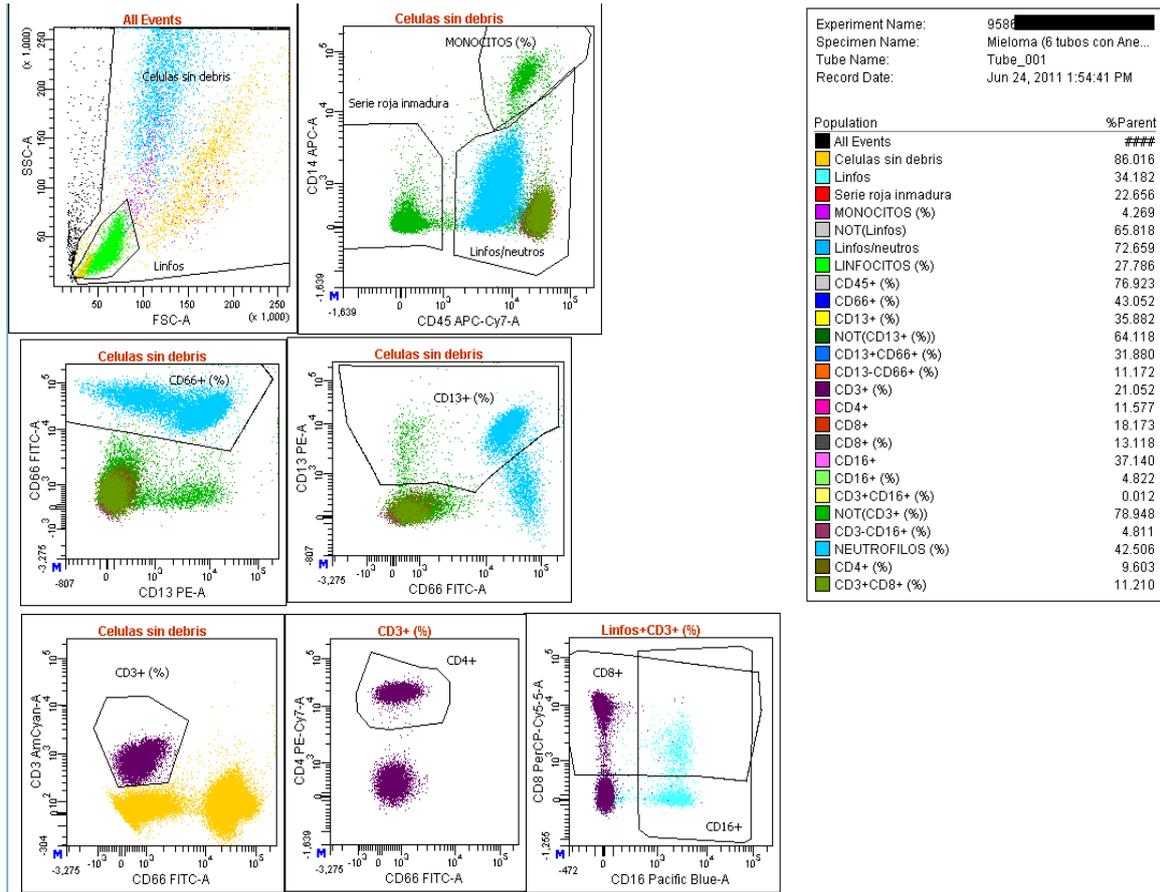


Figura 24. Tubo-1 de MO: diseñado para definir las subpoblaciones de linfocitos T y de serie mieloide (monocitos y neutrófilos) y la serie roja inmadura (CD45-) en MO.

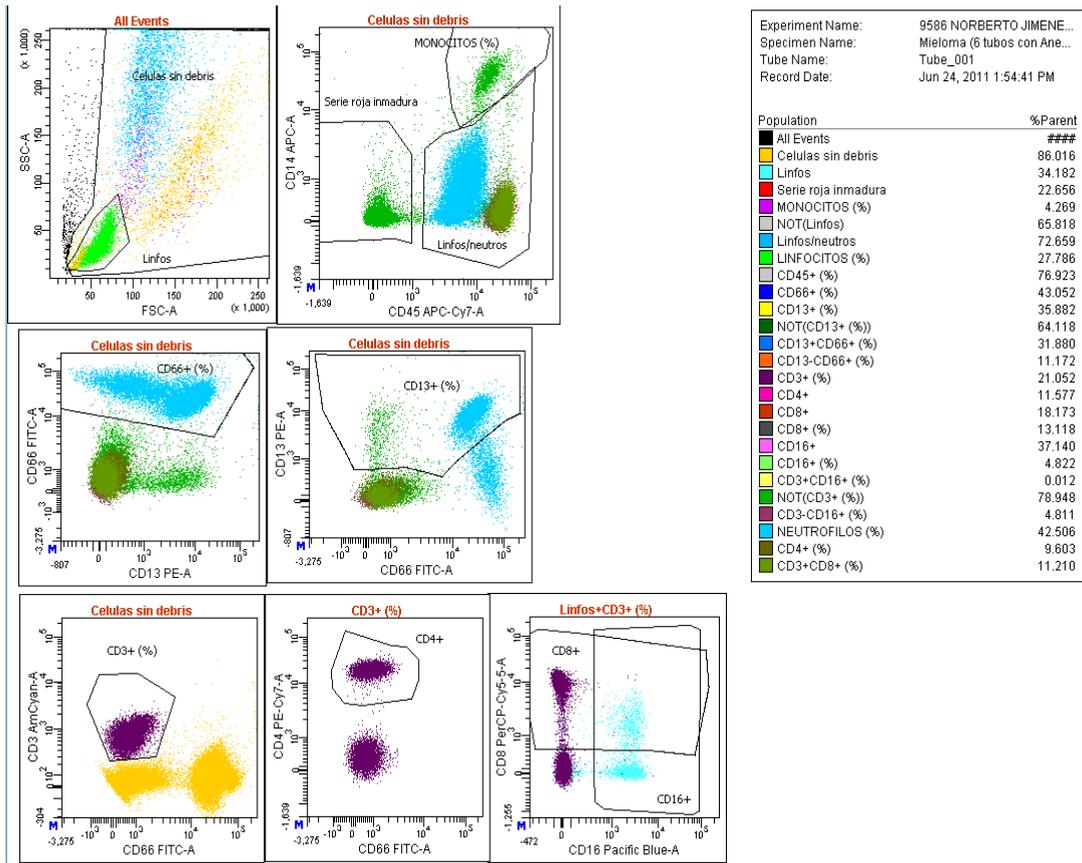


Figura 25. Tubo-2 de MO: diseñado para determinar la frecuencia de CP totales (en azul, CD38+++CD138+) y diferenciar CP sanas (CD19+ y/o CD27++ y/o CD45++) de las patológicas/aberrantes (en verde, CD19- y/o CD20+ y/o CD27-/débil y/o CD45-/débil y/o CD56+).

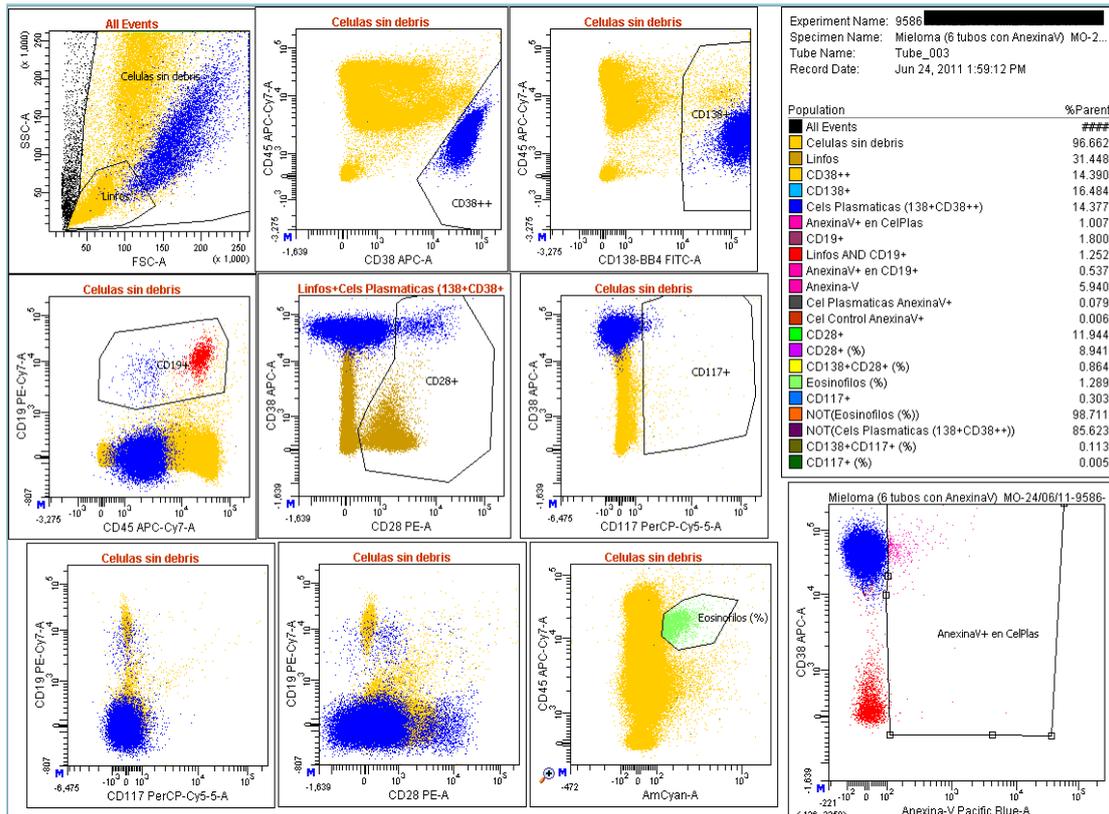


Figura 26. Tubo-3 de MO: diseñado para analizar marcadores de valor pronóstico en CP de MO (CD28, CD117 y Anexina-V). Las células anexina-V+ se consideraron como apoptóticas tanto para CP (azul) como para linfocitos B (rojo) que se utilizó como población control para establecer la mortalidad basal de la muestra de MO.

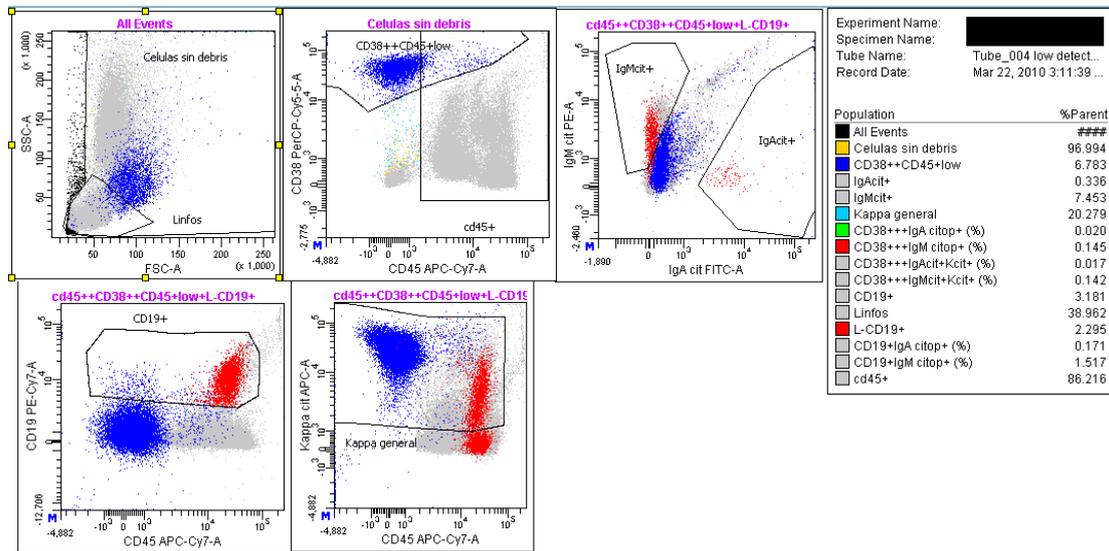


Figura 27. Tubo-4 de MO: diseñado para determinar la posible clonalidad de CP para las cadenas pesadas de IgA o IgM, y la cadena ligera Kappa.

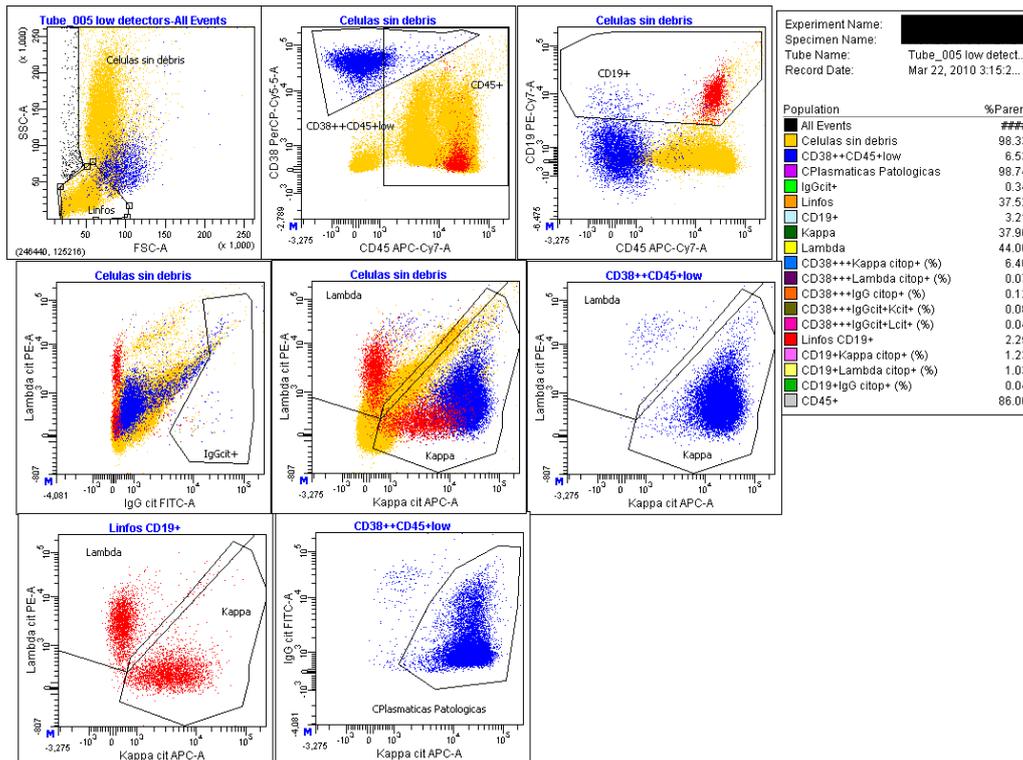


Figura 28. Tubo-5 de MO: diseñado para determinar la posible clonalidad de CP para la cadena pesada de IgG y las cadenas ligeras Kappa y Lambda. Además, facilita la diferenciación entre CP sanas/policionales y monoclonales/patológicas.

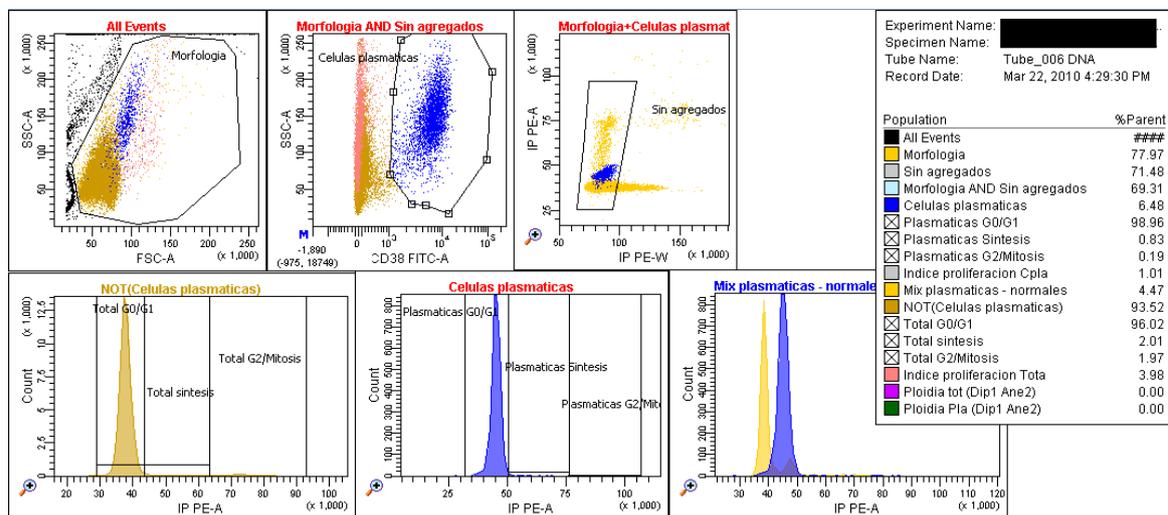


Figura 29. Tubo-6 de MO: diseñado para analizar el ciclo celular y el contenido de ADN mediante citometría de flujo por doble tinción con yoduro de propidio (IP, contenido de ADN) y CD38+CD138 FITC (identificación de CPs). Se valoraron los diferentes estadios del ciclo celular, fase G0+G1, fase de síntesis y fase G2+M tanto en las células totales de la médula ósea, no plasmáticas (en amarillo, ver debajo), como en CPs (en azul, ver debajo). Se considera como “índice de proliferación celular” a la suma de las células en fase S y G2+M. Se consideró el contenido de ADN diploide, hiperdiploide o hipodiploide de la CP cuando la IMF (intensidad media de fluorescencia) del pico G0+G1 de las CPs era similar, mayor o menor, respectivamente a la IMF del pico G0+G1 de las células sanas de MO.

5.4.3 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN SP Y MO

Para estimar la frecuencia de CP totales en SP y MO se utilizó el la combinación mostrada en tubo-3 en SP y en el tubo-2 en MO, con la misma combinación de anticuerpos monoclonales. Las células plasmáticas se definieron como células CD38+++ CD138+ (coloreadas en azul).

5.4.4 ESTIMACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS DE FENOTIPO ABERRANTE

La frecuencia de CPs de fenotipo aberrante se estimó sobre el total de células plasmáticas. Para ello, como hemos indicado en el apartado anterior se utilizó el tubo-2 en el que se definió la presencia de aCP basado en la pérdida de expresión de los marcadores CD19 y/o CD27 y/o CD45 y la ganancia de CD20 y/o CD56. Alternativa y/o complementariamente se utilizaron los tubos 4 y 5 para establecer el porcentaje de aCPs, en este caso se estimaron como aCPs las CPs con Ig Citoplasmática de tipo monoclonal para cadenas pesadas y/o ligeras de las Igs.

5.4.5 ESTIMACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS APOPTÓTICAS

Para estimar la frecuencia de las CP apoptóticas (Anexina-V+) se utilizó Anexina-V (tubo-3 de MO) y el porcentaje también se refirió al total de CPs. En el mismo tubo se estimó la frecuencia de linfocitos B (CD19+) apoptóticos (Anexina-V+) referidos al total de los linfocitos B y este dato fue tomado como valor control de la apoptosis basal de la muestra. El índice de apoptosis (IA) de células plasmáticas se determinó como:

$$\text{Índice de apoptosis} = \text{apoptosis en CPs} - \text{apoptosis en Linfocitos-B}$$

5.4.6 ESTIMACIÓN DE PLOIDÍA Y DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

La ploidía y el índice de proliferación celular se estimaron en el tubo-6 de MO. Las CPs se seleccionaron con una mezcla de anticuerpos (CD38 y CD138) conjugados con FITC y se colorearon en azul. Para estimar la ploidía, se evaluó la intensidad media de fluorescencia del canal del ioduro de propidio (FL2-Área) para las células en fase G0/G1 y cuando las CPs tenían una intensidad mayor o menor que el resto de células

de MO, se consideró una muestra “aneuploide”, por hiperdiploidía o hipodiploidía, respectivamente.

El índice de proliferación celular (IP) se estimó como la suma de las células en fase S (síntesis) y en fase G2/Mitosis y se expresó como un porcentaje referido al total de CPs.

5.4.7 ESTIMACIÓN DE MARCADORES DE CMF DE VALOR PRONÓSTICO (CD28 Y CD117)

El porcentaje de CPs que expresan CD28 o CD117 sobre el total de CPs, fue también evaluado. Las CPs se seleccionaron sobre la base su grado de expresión de CD38+++CD138+.

6 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS POR HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

El estudio de las alteraciones cromosómicas de mayor trascendencia diagnóstica y pronóstica en mieloma múltiple se analizó mediante hibridación “*in situ*” con sonda fluorescente (FISH o *Flourescent In Situ Hybridization*) que permite la detección de alteraciones cromosómicas en núcleos interfásicos.

6.1 PURIFICACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS.

Los especímenes objeto de estudio por FISH fueron las CPs purificadas de las muestras de aspirados MO de los pacientes.

La obtención de CPs purificadas se realizó con el equipo de reactivos *RosetteSep® Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail* que consiste en una mezcla de AcMo combinados tetraméricamente que se unen a eritrocitos y a todos los subtipos de leucocitos excepto a la población de interés, en nuestro caso las CPs. Tras el tiempo de incubación, se forman grandes complejos en los que las células de las diversas poblaciones quedan unidas a los eritrocitos que son elementos formes de alta densidad.

Tras el periodo de incubación, la muestra se somete a un gradiente de densidad, utilizando como medio de separación *Lymphoprep®*. Las poblaciones que no

son de interés son arrastradas al fondo del tubo por los eritrocitos y en el halo por encima del medio de separación permanecen las CP.

El halo de CPs se recoge con pipeta, se traspasa a tubo de fondo cónico y se lava con PBS+1%BSA.

6.2 CHOQUE OSMÓTICO.

La técnica FISH requiere tanto de la eliminación de restos de eritrocitos como de la presencia de núcleos distendidos que permita la correcta visualización de las señales emitidas por las sondas fluorescentes. Para ello, las CP purificadas se sometieron a un choque osmótico mediante incubación con una disolución de cloruro potásico 0'075M. Tras ello, las muestras fueron centrifugadas para eliminar el sobrenadante por aspiración.

6.3 FIJACIÓN Y MONTAJE DE PORTAOBJETOS.

Los "pellets" obtenidos en el paso anterior fueron sometidos a fijación del ADN mediante sucesivos lavados con solución de Carnoy (metanol:acético 3:1) hasta obtener sobrenadantes claros. Tras ello, el residuo celular resuspendido en Carnoy se coloca en portaobjetos bien identificados (identificación del paciente y tipo de prueba). Posteriormente se depositaron gotas de la suspensión celular con pipetas de vidrio. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente durante unos minutos.

6.4 HIBRIDACIÓN CON SONDAS FLUORESCENTES.

Las sondas FISH son secuencias de ADN o ARN combinadas con un fluorocromo, de secuencia complementaria a las regiones del genoma humano que resulten de interés.

En los estudios de MM, las sondas de interés son las específicas de los genes de proteínas supresoras de tumores como p53 y 13q o retinoblastoma (RB). La delección de ambos genes tiene una alta incidencia en MM.

Igualmente son muy frecuentes las alteraciones que por delección o amplificación afectan al cromosoma-1. Para analizar dichas alteraciones se utilizó la

sonda locus-específica 1p32/1q21 que detecta deleciones o amplificaciones en los brazos largo y brazo corto del cromosoma 1, concretamente en la región 1q21 se incluye el gen CKS1B y en la zona 1p32 se incluye el gen (p18) CDKN2C.

Por otro lado, al tratarse de una patología de estirpe B, son relativamente frecuentes los reordenamientos en el gen de la IgH. Por ello, de manera rutinaria, se realizó un cribado con una sonda de ruptura para verificar si este gen estaba roto y, potencialmente, se había translocado con otro gen. Cuando esta prueba fue positiva, se amplió el panel de estudio para verificar qué translocación había tenido lugar entre las tres más frecuentes: IgH/CCND1, IgH/FGFR3 o IgH/MAF.

Por último, las células mielomatosas presentan una alta incidencia de alteraciones en el número de cromosomas o aneuploidías, ya sean por hipo o hiperdiploidía, siendo las segundas de mejor pronóstico que las primeras. Los estudios de ploidía celular realizados por CMF se complementaron con la técnica FISH y se valoraron los cromosomas 5, 9 y 15 para detectar posibles alteraciones numéricas de estos tres cromosomas (en la Tabla 16, se resumen las sondas comerciales utilizadas).

La hibridación de las sondas se realizó calentando sobre placa calefactora (80°C, 4 minutos) los portaobjetos con las células fijadas a las que se les añade una alícuota (5µL) de la sonda de interés. A esa temperatura el ADN se desnaturaliza y, posteriormente, durante el proceso de renaturalización a temperatura fisiológica (37°C, 16-24 horas), la sonda se hibrida con su secuencia complementaria y queda fijada a ella. De esta manera el fluorocromo quedará unido a las secuencias de interés y se podrá visualizar posteriormente en un microscopio de fluorescencia.

TABLA 16. SONDAS FISH UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE MM.

PRUEBA	SONDA COMERCIAL
1q*	LSI 1q21/1p32 SpectrumGreen /SpectrumOrange. MetaSystems, Werfen.
P53	LSI TP53 SpectrumOrange/ CEP 17 SpectrumGreen, Vysis®, Abbott®
RB (13q)	LSI 13q14 (D13S319) SpectrumOrange/LSI 13q34 SpectrumGreen, Vysis®, Abbott®
IgH	IGH Breakapart Probe, Cytocell®, Vysis®, Abbott®
IgH/CCND1	LSI (11;14) IgH/CCND1 TX Dual Color Dual Fusion, Vysis®, Abbott®
IgH/FGFR3	LSI t(4;14) IgH/ FGFR3 Dual Color Dual Fusion, Vysis®, Abbott®
IgH/MAF	LSI t(14;16) IgH/MAF Dual Color Dual Fusion, Vysis®, Abbott®
Aneuploidías (Cr- 5-9-15)	MM Aneuploidy MultiColor Panel, Vysis®, Abbott®

* Esta sonda no estuvo disponible en nuestro laboratorio hasta 2013, por lo que se evaluó retrospectivamente sólo en pacientes con MM de los que se disponía de suficientes células plasmáticas purificadas preservadas a -20°C en Carnoy.

Tras la hibridación se realizaron dos lavados consecutivos a 72-74°C y temperatura ambiente con soluciones de 2xSSC y detergente Tween-20 con el fin de eliminar la sonda excedente y pegada inespecífica.

A continuación los portaobjetos se dejaron secar en oscuridad y los núcleos se contratiñeron con DAPI.

Finalmente, se procedió a su lectura en microscopio de fluorescencia (Nikon® Eclipse 50i).

6.5 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las sondas FISH presentan diversos diseños aplicables según la verificación que se quiera llevar a cabo. Las sondas más sencillas son las **específicas de locus**, diseñadas para verificar las deleciones o ampliaciones génicas. De esta manera, si de un gen se aprecian las dos señales de fluorescencia, el resultado de la prueba es negativo (no está delecionado ni ampliado). Hay deleción heterocigota cuando sólo se aprecia una señal del gen (se ha perdido uno de los dos alelos) u homocigota cuando no hay ninguna señal de ese gen (se pierden los dos alelos). Cuando la alteración es por amplificación se detectan un número variable de señales, siempre mayor de 2. Para evitar confusiones en la interpretación de los resultados debida a alteraciones en el número de cromosomas u otras causas, las pruebas suelen incluir una sonda control que verifique que la hibridación ha sido buena.

Las **sondas centroméricas** son específicas de secuencias del centrómero de cada cromosoma y se utilizan para el recuento de los cromosomas. Un número de señales diferente a dos indicaría alteraciones numéricas en el cromosoma estudiado.

Las **sondas “break apart”** están diseñadas para valorar la rotura de genes que potencialmente pueden translocar con otros (“genes promiscuos”). A ambos lados del punto de rotura identificado, se hibridan dos juegos de sondas de sendos colores (rojo y verde). Si no hay rotura, las señales aparecerán juntas (señales de fusión), mientras que cuando hay rotura, las señales del cromosoma que se ha roto se separan.

Finalmente, las translocaciones se valoraron con las **sondas “dual color/dual fusion”**. En este caso, las regiones que incluyen el punto de ruptura en ambos cromosomas se hibridaron en colores diferentes (rojo y verde). En condiciones normales, aparecerán dos señales de cada color, correspondientes a los dos alelos de cada gen. En cambio cuando hay una translocación, dos cromosomas se rompen y se intercambian regiones y aparece una señal verde y una roja de los cromosomas que no se han roto y dos señales de fusión de los dos genes derivativos.

En este estudio de tesis se evaluaron las alteraciones numéricas, por pérdida o ganancia, de los cromosomas 5, 9, 13, 15, 14 o 17. Variaciones numéricas en cualquier dirección nos llevó a clasificar los pacientes como con “aneuploidía”.

Un ejemplo representativo de cada uno de los tipos de sondas descritos anteriormente se muestra en la Tabla 17 donde se integraron figuras representativas, tanto para células normales como para células con alteraciones cromosómicas.

En la Tabla 18, se resumen los diferente diseños de sondas comerciales presentes en el mercado, las sondas FISH que son ensayadas en los estudios de MM (citadas anteriormente) y los resultados esperados.

Tabla 17. Tipos de sondas FISH y resultados esperados.

Sondas específicas de locus		Sondas centroméricas		<i>Break Apart</i>		<i>Dual Color/Dual Fusion(DC/DF)</i>	
Resultado Normal	Resultado Alterado*	Resultado Normal	Resultado Alterado*	Resultado Normal	Resultado Alterado*	Resultado Normal	Resultado Alterado*
							

*Se indica una posibilidad (la más común) entre otras opciones posibles.

Tabla 18. Tipos de Sondas y resultados esperados.

Prueba	Tipo de Sonda	Sonda Control	Resultados Normales	Resultados Alterados
1q21/1p32	Sonda específica de locus	1p32	Dos señales de cada color.	Por delección, menos de dos señales de cualquiera de ambas regiones. Pérdida de una señal de cada color, posible monosomía. Tres o más señales de cada color, posible trisomía o polisomía. Más de 2 señales rojas con 2 verdes, amplificación 1q (mal pronóstico).
p53	Sonda específica de locus	CEP17*	Dos señales de cada color.	Pérdida de una o las dos señales del gen problema (p53). La sonda control puede verificar alteraciones numéricas del Cr-17.
RB (13q14)	Sonda específica de locus	(13q34)	Dos señales de cada color.	Pérdida de una o las dos señales del gen problema (RB). Se pueden valorar alteraciones numéricas del Cr-13 o valorar la posibilidad de la pérdida completa de un brazo 13q completo.
IgH (14q32)	Break Apart	-	Dos señales de fusión	Una señal de fusión y una señal de cada uno de los colores, lo que indicaría rotura. Si hay más o menos de dos señales de fusión, se podrían considerar alteraciones numéricas del Cr-14.
IgH/CCND1 IgH/FGFR3 IgH/MAF	Dual color dual fusión	-	Dos señales de cada color.	Si hay translocación, aparecerán una señal de cada color (cromosomas no alterados) y dos señales de fusión (cromosomas derivativos).
Aneuploidía (Cr- 5-9-15)	Centromérica	-	Dos señales de cada color (rojo, azul y verde)	Las alteraciones numéricas en todos o en alguno de los tres cromosomas estudiados se valorarán por cambios en el número de señales de cada color (diferente de dos).

*La denominación "CEP" hace referencia a una nomenclatura comercial de las sondas centroméricas.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos procedentes de variables clínicas y experimentales se recogieron en bases de datos Excel (Excel2003; Microsoft Corporation, Seattle, WA). Para el análisis estadístico se utilizó SPSS-15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). El análisis ha tratado de correlacionar las variables clínico-patológicas, con las variables experimentales y con el tratamiento y la evolución de los pacientes, incluyendo la tasa de progresión y SG.

Las variables categóricas se analizaron mediante Tablas de contingencia y los test χ^2 de Pearson's o exacto de Fisher.

Debido a que la *n* para algunos de los grupos de estudio era escasa, y a que la distribución de sus valores con frecuencia no mostraba una distribución normal, las variables cuantitativas se analizaron con métodos no paramétricos tipo Mann-Whitney o Kruskal Wallis, para variables con dos o más de dos grupos de estudio,

respectivamente. Los datos se expresaron como media \pm SEM (error estándar de la media). Se utilizó la mediana cuando fue necesario para realizar comparaciones con otros estudios.

Mediantes análisis de curvas ROC se establecieron puntos de corte con la máxima sensibilidad y especificidad para diversos parámetros, de manera que nos permitiera explorar su utilidad como predictores de riesgo de progresión y SG. La calidad del análisis de curva ROC se estimó como el área bajo la curva, siendo 1 el estimador perfecto (sensibilidad y especificidad 100%).

Los análisis de tasa de progresión y SG se realizaron mediante Tablas de mortalidad, análisis de Kaplan-Meier y el test Log-rank para estimar la significación de las diferencias entre los grupos. Las diferencias en supervivencia entre los grupos de estudio se expresaron como porcentaje de progresión o SG a 36 meses (o 3 años), que fue la mediana de seguimiento en nuestro grupo de estudio. Cuando la supervivencia caía por debajo del 50%, se recogió la “mediana de supervivencia”, que hacía referencia al tiempo (en meses) en el que el grupo alcanzó el 50% de supervivencia. Cuando el grupo no alcanzaba un 50% de supervivencia, se refirió como “No se alcanzó la mediana de supervivencia”.

Para analizar la posible relación o dependencia en la capacidad predictiva de diversas variables relacionadas sobre algún parámetro, se realizaron análisis de regresión logística multivariante. Cuando los parámetros a analizar fueron la tasa de progresión o la SG se utilizó la regresión de Cox. La fuerza de la asociación se estimó mediante la Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %).

En cualquier caso, valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. El método de Bonferroni se utilizó para corregir por el número de comparaciones (P_c) cuando se estimó necesario.

IV RESULTADOS

1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

En primer lugar se presentaran las características clínico biológicas de los pacientes, seguidas del estudio de su incidencia sobre la progresión y la mortalidad. Así mismo, se expondrá la estratificación clínica y de riesgo en los diferentes grupos de estudio así como su impacto en la progresión y la SG.

Debido a la baja tasa de progresión y de mortalidad observados en el grupo de pacientes diagnosticados de MGUS (tres progresaron y ninguno falleció) no se pudo valorar la evolución clínica en este grupo.

1.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS

El estudio incluye 164 pacientes, 86 mujeres y 78 hombres, con una mediana de edad de 68 años (59-77 años) y una mediana de seguimiento de 27 meses (1-49 meses)(Tabla 19). En el momento del diagnóstico, 86 pacientes fueron clasificados como MGUS, 25 como SMM y 53 como MM. Sin embargo, de acuerdo con los nuevos criterios de IMGW para el diagnóstico de MM, Rajkumar *et al.*, 2014, la mayoría de pacientes SMM, 17 de los 25, pasarían a ser MM, por lo que a efectos de progresión y SG se ha incluido un grupo de estudio que aúna los pacientes SMM+MM.

La mediana de edad de los grupos de pacientes fue la siguiente: MGUS 68 años (38-91), SMM 66 años (37-87) y MM 70 años (35-91). La relación hombre: mujer difería poco entre los grupos MGUS y MM (1.05:1 y 0.96:1, respectivamente), pero en el grupo de SMM hubo un predominio femenino 1:2.1 (8/17). No se encontraron diferencias estadísticas en la edad ni en la distribución de género entre grupos de diagnóstico, ni tampoco con el grupo control.

Tabla 19. Variables demográficas por grupos de diagnóstico

		Control (n=30)	Total (n=164)	MGUS (n=86)	SMM (n=25)	MM (n=53)
Sexo , n (%)	Masculino	19(63.6%)	78(47.6%)	44 (51.2%)	8 (32%)	26 (49.1%)
	Femenino	11(36.7%)	86(52.4%)	42(48.8%)	17(68%)	27(50.9%)
Edad , años(Media±SEM) (Mediana, rango)		64.1±2.9	67.2±1.0	67.0±1.3	65.6±2.8	68.4±1.7
		67(53-77)	68(59-77)	68(38-91)	66(37-87)	70(35-91)

Así mismo se estudiaron 30 controles, 11 mujeres y 19 hombres con una mediana de edad de 67 años (53-77 años).

- **Impacto de la edad**

Para evaluar el impacto de la edad en la progresión y SG se efectuaron comparaciones en pacientes con edad superior e inferior a la edad media del grupo total (67.3 años). Tal y como se resume en la Tabla 20, la tasa de progresión a los 36 meses para estos grupos fue respectivamente del 50% y 7.7% en SMM (OR=12.0 p<0.027), del 66.7% y 56.6% en MM (p>0.05) y del 62% y el38.9% en SMM+MM (OR=2.55 p=0.043). Por su parte, la SG global a 36 meses para estos grupos fue del 66.7% y 100% en SMM (OR=1.5 p<0.039), del 50% y 82.6% en MM (OR=4.75 p<0.014) y del 54.8% y 88.9%en SMM+MM (OR=6.61 p<0.001). Por tanto, una edad superior a la media impactó negativamente tanto en la progresión como en la SG.

Tabla 20. Impacto de la edad en la progresión de la enfermedad y supervivencia global de los pacientes en los distintos grupos de estudio

Grupo	Progresión (Si/No), n (%)		Supervivencia global (Si/No), n (%)	
	Edad >media	Edad ≤ media	Edad >media	Edad ≤ media
SMM	6/6 (50%) ^a	1/12 (7.7%)	8/4 (66.7%) ^c	13/0 (100%)
MM	20/10 (66.7%)	13/10 (56.5%)	15/15 (50%) ^d	19/4 (82.6%)
SMM+MM	26/16 (62%) ^b	14/22 (38.9%)	23/19(54.8%) ^e	32/4 (88.9%)

^a OR=12.0 p<0.027; ^b OR 2.55 p=0.043

^c OR=1.5 p<0.039; ^d OR=4.75 p=0.014; ^e OR=6.61 p<0.001

El impacto de la edad en la progresión y SG se evaluó igualmente mediante análisis de Kaplan Meier y Log rank. En la Figura 30 se puede observar que la edad superior a la media asocia tasas de progresión más elevadas tanto en SMM (p=0.052) como en MM (p=0.022) o SMM+MM (p=0.004). Además muestra que la SG es más en SMM (p=0.028), MM (p=0.005) y SMM+MM (p<0.001).

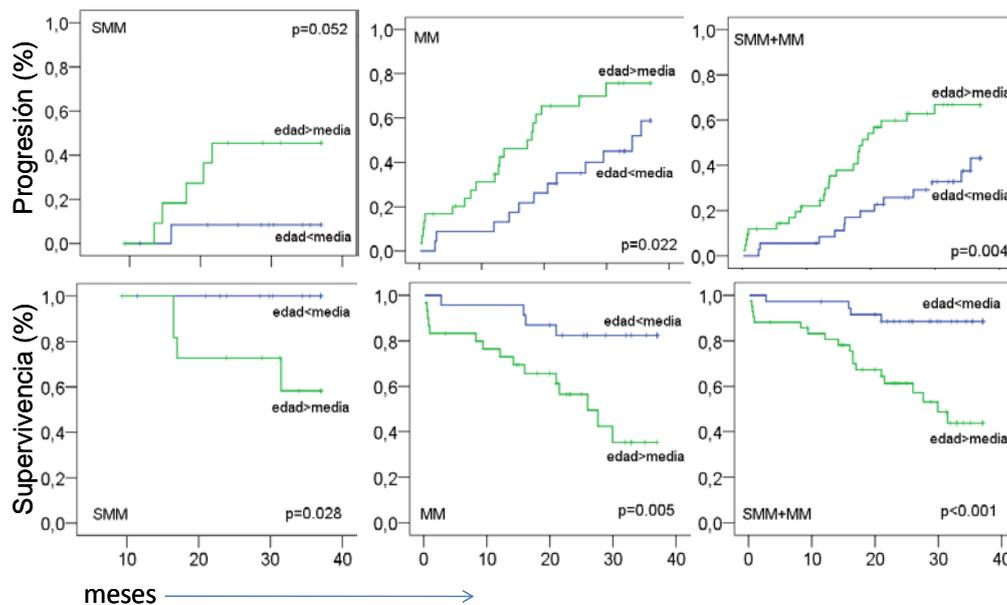


Figura 30. Impacto de la edad en la progresión de la enfermedad y la SG global de los pacientes. Las figuras muestran el análisis de Kaplan Meier de progresión de la enfermedad (arriba) y supervivencia global (abajo) en los grupos SMM, MM y SMM+MM, para pacientes con edad superior a la media (línea verde) e inferior o igual a la media (línea azul). En cada gráfico se indica la significación obtenida mediante el análisis de Log Rank.

- **Impacto del sexo**

Al analizar el impacto del sexo en la progresión y la SG global en nuestro grupo de estudio, tal y como muestra la tabla 21, se observó que en general los hombres presentaban, tasas de progresión más elevadas que las mujeres, aunque esta diferencia solo alcanzó significación estadística cuando se analizaron de forma conjunta todos los mielomas, es decir, el grupo SMM+MM (61.7% vs.43.2%, OR=3.7 p=0.047). Igualmente los hombres presentaron menores tasas de supervivencia a 36 meses que las mujeres, diferencia que fue más clara y significativa en los pacientes con MM (42.3.0% vs. 85.2, p<0.001) que con SMM (75.0% vs. 88.2, p>0.05).

Tabla 21. Impacto del sexo en la progresión de la enfermedad y supervivencia global de los pacientes en los distintos grupos de estudio.

Grupo	Progresión (Si/No), n (%)		Supervivencia global(Si/No), n (%)	
	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
SMM	3/5 (37.5%)	4/13 (23.5%)	6/2 (75.0%)	15/2 (88.2%)
MM	18/8 (69.2%)	15/12 (55.6%)	11/15 (42.3%)	23/4 (85.2%) ^b
SMM+MM	21/13 (61.7%)	19/25 (43.2%) ^a	17/17 (50%) ^c	38/6 (86.4%)

^a OR=3.7 p=0.047, ^b OR=7.84 p<0.001, ^c OR=6.33 p<0.001

Igualmente, el impacto del sexo en la progresión y SG se evaluó posteriormente mediante análisis de Kaplan Meier y Log rank. En la Figura 31, se puede observar que los hombres presentaban tasas de progresión más elevadas que las mujeres en el grupo SMM+MM analizado conjuntamente ($p=0.047$); así como niveles de SG más reducidos igualmente para el total de pacientes ($p=0.008$), para MM ($p=0.005$) y para SMM+MM ($p=0.002$).

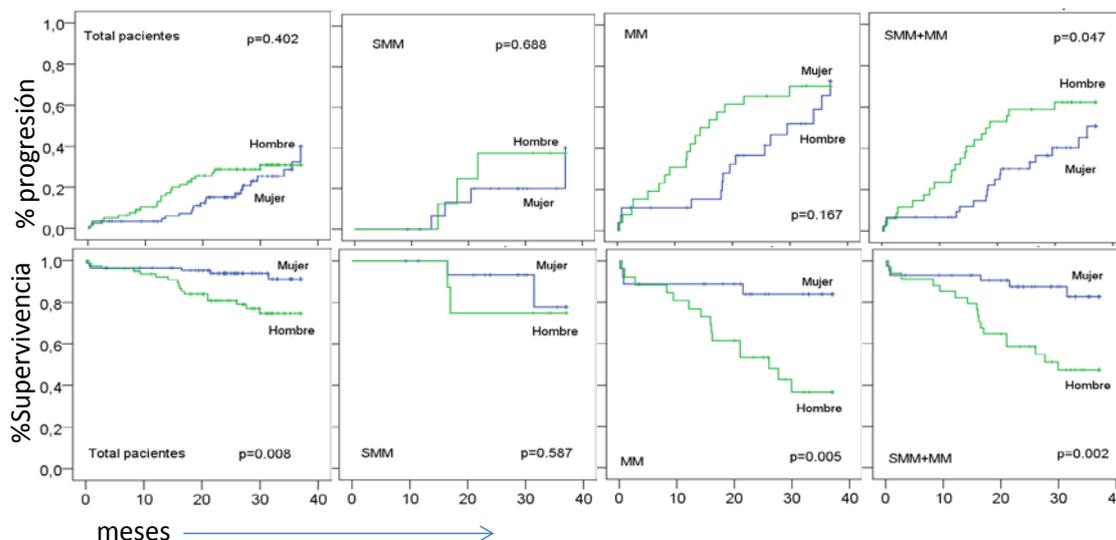


Figura 31. Impacto del sexo en la progresión de la enfermedad y la SG global de los pacientes. Análisis de Kaplan Meier de progresión de la enfermedad (arriba) y supervivencia global (abajo) en el total de pacientes y los grupos SMM, MM y SMM+MM. En línea verde se representa al sexo masculino y en la azul al femenino. En cada gráfico se indica la significación obtenida mediante el análisis de Log Rank.

1.2 VARIABLES CLÍNICAS

En este apartado se valoran las variables de las **patologías asociadas** a las gammopatías en el momento del diagnóstico. Entre estas patologías destacaba principalmente la presencia de otras enfermedades oncológicas y reumatológicas, siendo estas últimas estadísticamente menos frecuentes en el grupo MM que en SMM (11.3% vs 33.3%; OR=0.27, $p=0.0269$) y que en MGUS (11.3% vs 29.1%; OR=0.31 $p=0.015$). También se evaluó la frecuencia de aparición de **lesiones líticas**, que se objetivaron en 28 de 50 pacientes con MM (56.0%), pero sólo en 3 de 24 pacientes con SMM (12.5%; OR 8.9, $p<0.001$)

Cabe destacar que ni las patologías asociadas ni las lesiones líticas impactaron negativamente en la progresión de la enfermedad o en la SG de los pacientes.

1.3 HEMATIMETRÍA Y VARIABLES BIOQUÍMICAS

En el análisis de los parámetros hematimétricos y bioquímicos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos MGUS y SMM, pero sí entre cualquiera de estos grupos y el grupo MM. Tal y como se muestra en la Tabla 22, en el grupo de MM encontramos cifras de **hemoglobina**(10.75±0.36) más bajas que en el resto de grupos (13.20±1.7 en MGUS y 12.53±0.32 en SMM (p<0.001 y p=0.004 respectivamente). Igualmente la cifra de **plaquetas** fue significativamente más baja en MM (184.9±11.6) que en MGUS (222.2±7.5, p=0.005).

Tabla 22. Parámetros de hematimetría y bioquímicos

Datos bioquímicos cuantitativos	MGUS (n=86)	SMM (n=25)	MM (n=53)	p*
Hemoglobina(g/dL) ^a	13.20±0.17	12.53±0.32	10.75±0.36	<0.001
Plaquetas(x10 ⁹ /L) ^b	222.2±7.5	216.0±9.7	185.0±11.6	0.015
VSG (mm/h)	44.2±2.7	50.7±6.9	54.4±5.6	0.635
PCR (mg/L)	8.0±2.1	4.0±1.3	7.3±1.9	0.548
LDH (U/L)	168.6±4.3	159.4±7.1	178.4±7.6	0.154
β ₂ microglobulina(mg/L) ^c	3.0±0.2	2.9±0.2	5.8±0.7	0.001
Creatinina(mg/dL) ^d	1.1±0.1	1.1±0.1	1.7±0.2	0.023
Calcio(mg/dL) ^e	9.5±0.1	9.6±0.2	10.0±0.20	0.018
Albúmina (g/dL) ^f	4.1±0.1	4.1±0.1	3.7±0.1	<0.001
Proteínas totales(g/dL)	7.4±0.1	7.7±0.2	8.0±0.3	0.245

Resultados expresados en media±EEM. Los datos significativos se resaltan en negrita

* Diferencias globales obtenidas en el test de Kruskal Wallis.

^a MGUS vs MM p<0.001; SMM vs MM p=0.004; ^b MGUS vs MM p=0.005

^c MGUS vs MM p<0.001; SMM vs MM p<0.001

^d MGUS vs MM p=0.007

^e MGUS vs MM p=0.007; SMM vs MM p=0.043

^f MGUS vs MM p<0.001; SMM vs MM p=0.006

Los valores de **β₂microglobulina** fueron significativamente más altos en MM que en MGUS (5.8±0.7vs 3.0±0.2; p<0.001) y SMM (5.8±0.7vs 2.9±0.2; p<0.001). La **creatinina** se encontraba en niveles significativamente más elevados en MM que en SMM (1.6±0.2 vs. 1.1±0.1; p=0.021), el **calcio** más elevado en MM que en MGUS (10.0±0.2 vs 9.5±0.1; p<0.001) y SMM (10.0±0.2 vs 9.6±0.2; p<0.001) y la **albúmina** estaba más reducidos en MM que en SMM (3.7±0.1 vs 4.1±0.1; p=0.006) y en MGUS (3.7±0.1vs 4.1±0.05 p<0.001). Los valores de **VSG, PCR, LDH y Proteínas totales** no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

1.4 COMPONENTE MONOCLONAL EN SUERO

En relación con la concentración del **CM**, se pudo observar un incremento del mismo desde MGUS a MM con diferencias estadísticamente significativas para la comparación MGUS y SMM ($p=0.022$) y para la de MGUS y MM ($p<0.001$). El tipo de CM más frecuente en el conjunto del total de pacientes fue de IgG (60.5%), seguido por IgA (28.4%) y cadenas ligeras (7.4%). La cadena ligera Kappa predominaba entre los pacientes con MGUS y MM (60.2% y 58.8% respectivamente) mientras que en el SMM se distribuía al 50% con la cadena Lambda (Tabla 23).

Tabla 23. Concentración y tipo del componente monoclonal por patologías.

Componente	MGUS (n=85)	SMM (n=25)	MM (n=52)	SMM + MM (n=77)	p*
CM g/dL (media±EEM)	1.1±0.1 ^a	1.5±0.18	2.43±0.34	2.1±2.1	0.002
(Mediana, rango)	0.97(0.5-1.5)	1.5(0.7-2.3)	2.3(0.1-14)	1.9(0.7-2.5)	
IgG (n, %)	58 (68.2%)	13 (52%)	27 (51.9%)	40 (64.5%)	0.108
IgA (n, %)	24 (28.2%)	11 (44 %)	11 (21.2%)	22(15.6%)	0.116
Cadenas ligeras (n, %) ^b	0 (0%)	1 (4 %)	11 (21.2%)	12(15.6%)	0.000
Otras (n, %)	3 (3.6%)	0 (0%)	3(5.8%)	3 (3.9%)	

CM componente monoclonal.

* Diferencias globales obtenidas en el test de Kruskal Wallis.

^a MGUS vs SMM $p=0.022$; MGUS vs MM $p<0.001$

^b MGUS vs SMM $p=0.023$; MGUS vs MM $p<0.001$

Respecto al **comportamiento progresivo** del CM se objetivó que 4 de 74(5.4%) MGUS presentaban este fenotipo, incrementándose de forma estadísticamente significativa al 42.9% (9 de 21 pacientes) en el grupo de SMM (OR 13.8, $p<0.001$).

La **immunoparesis** estaba igualmente presente de forma creciente desde MGUS a MM y se encontró que aparecía en el 23% de los pacientes con MGUS, el 84% de los SMM y el 90% de los MM. La comparación entre grupos reveló diferencias estadísticamente significativas entre MGUS y SMM o MM ($p<0.001$, en ambos casos), pero no al comprar los grupos SMM y MM (Tabla 25).

El **cociente de cadenas ligeras κ/λ libres en suero** apareció alterado en el 32.5% de los MGUS, 93% de los SMM y en 79.3% de los MM, con diferencias estadísticamente significativas al comparar MGUS con SMM o MM ($p<0,001$, en ambos casos), pero no al comprar los grupos SMM vs MM (Tabla 24).

La presencia de **proteinuria de Bence-Jones** se incrementaba desde MGUS a MM, al igual que la cantidad de la misma. Así se objetivó la presencia de PBJ en el 14% de MGUS, el 47% de SMM y el 74% de MM con diferencias estadísticamente significativas al comparar MGUS con SMM ($p=0.001$) y con MM ($p<0.001$) y también al comparar SMM con MM ($p=0.032$).

Ninguno de estos últimos 4 parámetros se asoció a progresión o SG en los grupos SMM y MM por separado o conjuntamente.

Tabla 24. Incidencia de inmunoparesis, cociente K/ λ alterado y la PBJ

Variable	MGUS (n=86)	SMM (n=25)	MM (n=53)	p^{**}
Inmunoparesis (%) ^a	20 (23.3%)	21(84%)	48(90.6%)	0.000
Cociente K/ λ alterado*, n (%) ^b	13 (32.5%)	13 (92.9%)	23(79.3%)	0.000
Proteinuria Bence-Jones, n (%) ^c	10 (13.9%)	11 (47.8%)	34 (73.9%)	0.000
P.Bence-Jones (mg/24h, media \pm EEM) ^d	293 \pm 153	310 \pm 169	1128 \pm 211	0.018

*Cociente K/ λ alterado: definido como <0.26 o >1.65 .

**Significación estadística por test de Kruskal Wallis

^a MGUS vs SMM $p<0.001$; MGUS vs MM $p<0.001$

^b MGUS vs SMM $p<0.001$; MGUS vs MM $p<0.001$

^c MGUS vs SMM $p=0.001$; MGUS vs MM $p<0.001$; SMM vs MM $p=0.032$

^d MGUS vs MM $p=0.025$; SMM vs MM $p=0.030$

1.5 DATOS CITOMORFOLÓGICOS EN MÉDULA ÓSEA

En el estudio histológico de la médula ósea (Tabla 26) se detectó que el **porcentaje de CPs** ascendía desde MGUS (3.95%) a SMM (16.45%) y MM (33.9%), con diferencias que fueron muy significativas entre cada grupo ($p<0.001$ en todos los casos).

Tanto las **CPs polinucleadas** como las **plasmablásticas**, se observaron con mayor frecuencia en los pacientes con MM que con MGUS (59.6% vs. 17.3% y 48.9% vs. 5.4%, respectivamente; $p<0.001$ en ambos casos) y, también en los pacientes con SMM con respecto a los de MGUS (47.6% vs. 17.3%, $p=0.004$ y 25% vs 5.4%, $p=0.008$, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos SMM y MM.

El grado de **celularidad** de médula ósea y de **mielodisplasia** tampoco mostró diferencias estadísticas entre los grupos (Tabla 25).

Tabla 25. Variables histológicas en médula ósea

Variable	MGUS (n=86)	SMM (n=25)	MM (n=53)	p*
CPs-Histología (%) ^a	3.95±0.25	16.45±2.58	33.90±2.90	0.000
Polinucleadas, si/no(%) ^b	13/62(17.3%)	10/11(47.6%)	28/19(59.6%)	0.000
Plasmablásticas, si/no(%) ^c	4/70(5.4%)	5/15(25%)	23/24(48.9%)	0.000
Mielodisplasia, si/no(%)	9/66(12%)	5/16(23.8%)	9/37(19.6%)	0.327
Celularidad, n°(%)				0.573
• Aumentada	15(19.7%)	5(23.8%)	9(20.9%)	
• Normal	54(71.1%)	14(66.7%)	27(62.8%)	
• Disminuida	7(9.2%)	2(9.5%)	7(16.3%)	

*Significación estadística por test de Kruskal Wallis.

^aMGUS vs SMM o MM p<0.001; SMM vs MM p<0.001

^b MGUS vs SMM p=0.004; MGUS vs MM p<0.001

^cMGUS vs SMM p =0.008; MGUS vs MM p<0.001

1.6 ESTADIFICACIÓN CLÍNICA Y DE RIESGO. VALOR PRONÓSTICO

Según los dos modelos de **estadificación clínica** utilizados los pacientes se distribuyeron de la siguiente forma. Así mediante la clasificación de **Durie-Salmon** (Figura 32), los estadios I (37%) y II (44%) predominaron entre los pacientes con MGUS; el estadio I predominó mayoritariamente (88%) entre los pacientes con SMM, mientras que los pacientes con MM, estaban regularmente distribuidos en los tres estadios, con leve predominio del estadio III (42%) frente a los estadios II (32%) y estadio I (26%). La clasificación **ISS** es solo aplicable a los pacientes con MM, y atendiendo a esta clasificación se observó que los pacientes se distribuían en estadio I (23%), II (43%) y III (34%).

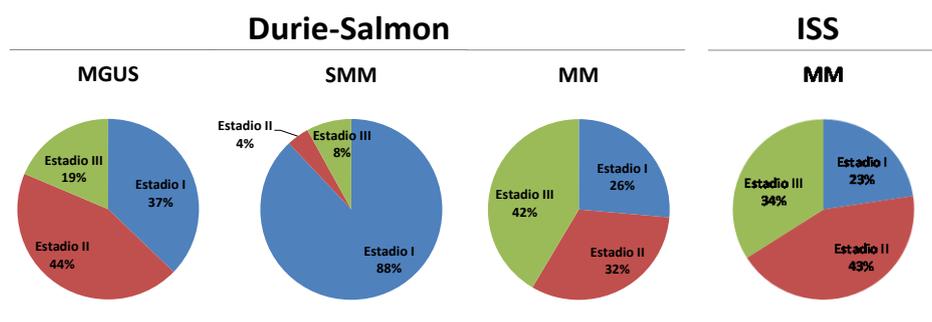


Figura 32. Estadificación clínica de los pacientes. Se representa la distribución según Durie-Salmon de los diferentes grupos clínicos y según ISS para los MM.

Igualmente, los pacientes con MGUS y SMM se **estratificaron** siguiendo los criterios de la **Clínica Mayo** y los del **Grupo Español de Mieloma**. Debido a que en uno de los hospitales no se disponía de la cuantificación del cociente de cadenas ligeras libres en suero, la estratificación según la Clínica Mayo solo se pudo establecer en el 43% de MGUS. De ellos, el 40% no presentó ningún factor de riesgo, el 30% mostró 1 ó 2 factores de riesgo y ningún paciente presentó los tres factores. Para SMM se dispuso de datos en el 52% de los casos, de modo que la mayoría (69%) presentaron 1 factor de riesgo, el 31% 2 factores de riesgo y ningún paciente presentó los tres (Figura 33).

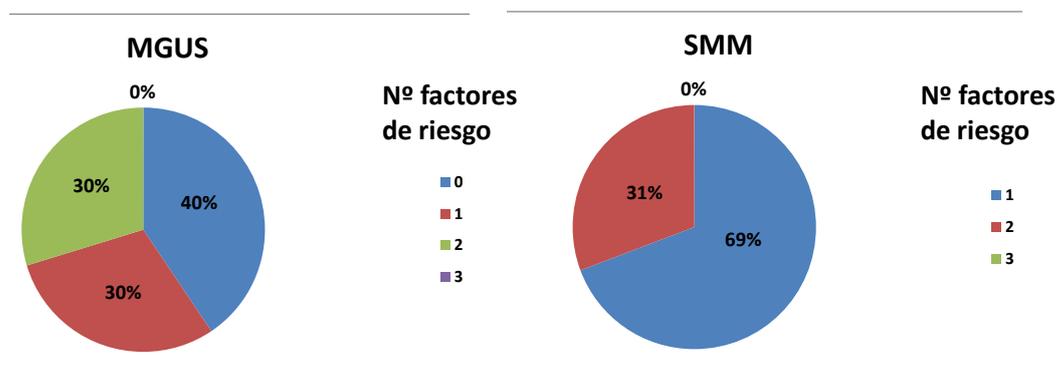


Figura 33. Estratificación de riesgo según Clínica Mayo para pacientes de los grupos MGUS y SMM. Factores de riesgo para **MGUS**: CM>1.5 g/dL, Tipo no IgG, FCL ratio<0.26 o >1.64. Factores de riesgo para **SMM**: CP en MO≥10%, CM≥3 g/dL, Ratio FCL<0.125 o >8.

Atendiendo a la clasificación del **Grupo Español**, la mayoría (70.9%) de los pacientes diagnosticados de **MGUS** no presentaban ningún factor de riesgo, el 26% presentaron solo un factor de riesgo y un 3% de los mismos presentó dos. Sin embargo

la mayoría de los pacientes diagnosticados de **SMM** (60%) presentaron dos factores de riesgo, el 28% uno y el 12% ninguno (Figura 34).

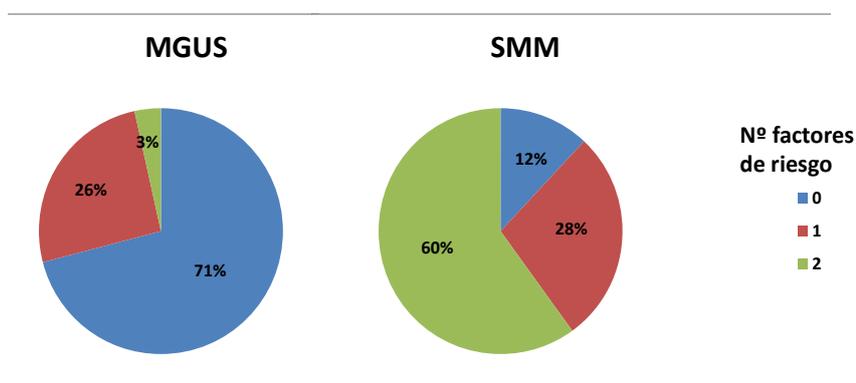


Figura 34. Estratificación de riesgo según Grupo Español para pacientes de los grupos MGUS y SMM. Factores de riesgo para MGUS: $\geq 95\%$ aPC en MO, aneuploidía ADN por citometría. Factores de riesgo para SMM: $\geq 95\%$ aPC en MO, inmunoparesis.

La estadificación de los pacientes según **Durie-Salmon** no tuvo aparentemente impacto en la progresión ni en la supervivencia en ninguno de los grupos de estudio (Tabla 26).

Tabla 26. Impacto de la estadificación Durie-Salmon en la progresión de la enfermedad y la SG.

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia; Si/No n (%)	
	Estadio I	Estadio II/III	Estadio I	Estadio II/III
SMM	3/12(20%)	3/7(30%)	12/3(80%)	9/1(90%)
MM	6/8(42.9%)	26/13(66.7%)	9/5(64.3%)	25/14(64.1%)
SMM+MM	9/20(31%)	29/20(59.2%)	21/8(72.4%)	34/15(69.4%)

La estadificación según **ISS** (Tabla 27) en los pacientes con MM reveló tasas de progresión del 41.7% vs. 68.3% y de SG del 58.5% vs. 83.3% más favorables en los pacientes con estadio I que los que tenían estadio II o III, aunque los resultados no alcanzaron significación estadística posiblemente debido al reducido número de pacientes. Sin embargo, cuando se analizaron los pacientes SMM y MM conjuntamente, siempre teniendo en cuenta que todos los SMM tuvieron un estadio ISS I, estas diferencias si resultaron significativas tanto para progresión (32.4% vs. 68.3%, $p=0.001$) como para la SG (58.5% vs. 83.8%, $p=0.007$). En la Figura 35 se muestran las gráficas de progresión y SG estimadas mediante Kaplan Meier.

Tabla 27. Impacto de la estadificación ISS en la progresión de la enfermedad y la SG.

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia; Si/No n (%)	
	ISS I	ISS II/III	ISS I	ISS II/III
MM	5/7(41.7%)	28/13(68.3%)	10/2(83.3%)	24/17(58.5%)
SMM+MM	12/25(32.4%)	28/13(68.3%) ^a	31/6(83.8%)	24/17(58.5%) ^b

^aISS I vs II grupo SMM+MM: p=0.001, ^bp=0.007

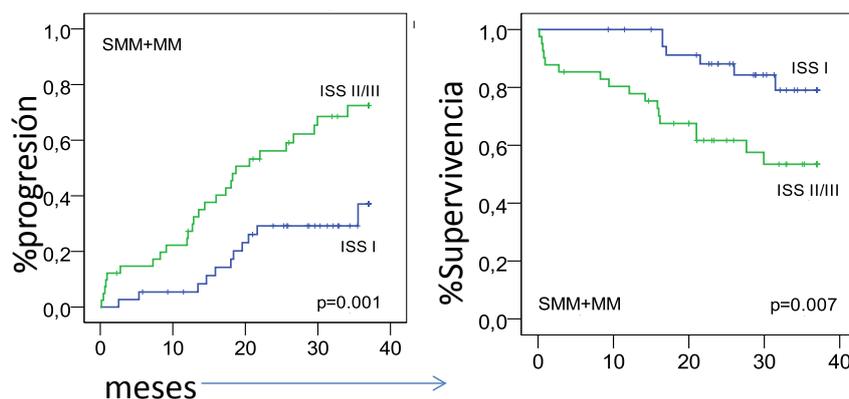


Figura 35. Valor pronóstico de la clasificación ISS en pacientes con mieloma (SMM+MM). Análisis de Kaplan Meier de progresión y SG en función de los estadios I o II/III de ISS. Se muestran valores de p determinados en análisis Log Rank (Mantel-Cox).

Por último, los factores de riesgo establecidos según el Grupo Español y la Clínica Mayo, no ofrecieron ningún tipo de impacto en la progresión o la SG de los pacientes de nuestra serie (datos no mostrados).

2 ANÁLISIS CELULAR DE MÉDULA ÓSEA POR CMF

En este apartado se describirán los estudios realizados mediante citometría de flujos para cuantificar y caracterizar el fenotipo de las células plasmáticas (sanas y aberrantes), así como su capacidad proliferativa y apoptótica. No obstante, antes se recogen los resultados obtenidos en el análisis de las líneas celulares principales y las subpoblaciones linfocitarias de médula ósea.

2.1 LÍNEAS CELULARES PRINCIPALES

El **recuento celular** de médula en contador hematológico no reveló diferencias entre los grupos y tampoco en las cifras de **linfocitos totales**. Sin embargo, como se resume en la Tabla 28, todos los grupos de gammapatías presentaban cifras elevadas de **monocitos** con respecto al grupo control, con diferencias estadísticamente significativas en MGUS ($p=0.007$) y MM ($p=0.0013$). Las cifras de **neutrófilos** estaban disminuidas en el grupo MM comparadas con las del grupo control ($p=0.0014$) y con las de los grupos MGUS ($p<0.000$) y SMM ($p=0.0044$), diferencia originada principalmente por una disminución en las cifras de las formas inmaduras de neutrófilos (CD66+CD13-) en MM con respecto al resto de grupos ($p<0.0001$, en todos los casos). Igualmente, las cifras de **eosinófilos** estaban disminuidas en MM comparadas con el resto de grupos (Control, $p=0.019$; MGUS, $p=0.003$ y SMM, $p=0.006$).

Tabla 28. Líneas celulares principales en MO cuantificadas mediante CMF

Células/ $\times 10^3/\mu\text{L} \pm \text{EEM}$	Control (n=30)	MGUS (n=86)	SMM (n=25)	MM (n=53)	p^*
Leucocitos	30.12 \pm 3.18	39.65 \pm 3.73	30.51 \pm 3.73	28.13 \pm 3.75	0.014
Linfocitos	12.38 \pm 1.14	13.58 \pm 1.08	14.38 \pm 1.75	15.22 \pm 1.03	0.184
Monocitos^a	3.34 \pm 0.16	4.18 \pm 0.17	4.00 \pm 0.36	4.80 \pm 0.31	0.009
Neutrófilos^b	65.60 \pm 1.55	65.50 \pm 1.06	65.60 \pm 2.47	54.51 \pm 2.29	0.000
Neutrófilos maduros	35.85 \pm 1.30	34.99 \pm 1.02	36.60 \pm 2.08	36.63 \pm 2.44	0.741
Neutrófilos inmaduros^c	29.73 \pm 1.57	30.51 \pm 1.06	29.00 \pm 2.42	17.88 \pm 1.47	0.000
Eosinófilos^d	2.44 \pm 0.43	2.08 \pm 0.13	2.12 \pm 0.18	1.65 \pm 0.27	0.011

Los resultados se expresan en Media \pm EEM (error estándar de la media)

*Valor de p determinada por test de Kruskal Wallis. P entre grupos mediante U de Mann Whitney.

^aControl vs. MGUS $p=0.007$; Control vs. MM $p=0.0013$

^bControl vs. MM $p=0.0014$; MGUS vs. MM $p<0.000$; SMM vs. MM $p=0.0044$

^cControl vs. MM; $p<0.000$; MGUS vs. MM; $p<0.000$, SMM vs. MM $p<0.0001$

^dControl vs. MM $p=0.019$; MGUS vs. MM $p=0.003$; SMM vs. MM $p=0.006$

2.2 SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T Y B

Las cifras de linfocitos B CD19+ se redujeron progresivamente de MGUS a MM, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Es importante destacar que este descenso ocurría fundamentalmente a expensas de linfocitos B

CD19+IgM+ (vírgenes o *naïve*), conservando las cifras de formas más maduras CD19+IgA+ o CD19+IgG+. Las de linfocitos B CD19+IgM+ fueron significativamente menores en pacientes con MGUS, SMM y MM que en el grupo control ($p=0.008$, $p=0.001$ y $p<0.001$, respectivamente)

Las cifras de linfocitos T CD3+ estaban más elevadas en pacientes con MM que en el resto de grupos y significativamente más elevadas que en el grupo MGUS ($p=0.017$). Esta diferencia se debía fundamentalmente al aumento de linfocitos T CD8+ en el grupo MM cuyo incremento fue significativo respecto a MGUS y controles ($p=0.0016$ y $p=0.029$, respectivamente). Todos estos datos se resumen en la Tabla 29.

Tabla 29. Subpoblaciones linfocitarias en MO: CD19, CD3, CD4 y CD8

	Control (n=30)	MGUS (n=86)	SMM (n=25)	MM (n=53)	<i>p</i> *
CD19+ (%)	2.46±0.42	2.15±0.20	1.84±0.27	1.67±0.21	0.182
CD19+IgM+ (%) ^a	1.60±0.25	0.74±0.16	0.62±0.12	0.50±0.09	0.000
CD19+IgA+ (%)	0.056±0.02	0.052±0.02	0.06±0.02	0.09±0.02	0.095
CD19IgG+ (%)	0.07±0.02	0.08±0.008	0.1±0.02	0.14±0.27	0.773
CD3+ (%) ^b	8.11±0.60	7.72±0.50	8.92±0.99	10.27±0.81	0.041
CD4+ (%)	4.0±1.70	3.89±0.27	4.44±0.57	4.63±0.40	0.356
CD8+ (%) ^c	2.27±0.50	3.38±0.27	3.75±0.49	4.83±0.42	0.006

Los resultados se expresan en Media±EEM (error estándar de la media)

*Valor de *p* determinada por test de Kruskal Wallis. *P* entre grupos mediante U de Mann Whitney.

^a Control vs. MGUS, SMM y MM ($p<0.000$, $p=0.001$ y $p<0.000$ respectivamente).

^bMGUS vs. MM $p=0.007$

^cControl vs. MM $p=0.029$; MGUS vs. MM; $p=0.0016$

2.3 CÉLULAS PLASMATICAS EN MEDULA ÓSEA

Las cifras de CPs en MO obtenidas mediante CMF, tal y como muestra la tabla 30, se incrementaban en MGUS (522cél/μl), SMM (1133cél/μl) y MM (4089cél/μl) respecto a controles (128 cél/μl) con un valor de $p<0.001$ en todos los casos. Esta diferencia también se constató entre los grupos MGUS y SMM o MM ($p<0.000$, para ambos), así como entre SMM y MM ($p=0.002$) tal y como muestra al Figura 36, izquierda).

Tabla 30. Recuento de células plasmáticas en MO mediante CMF e histología

Células plasmáticas	Control (n=30)	MGUS (n=86)	SMM (n=25)	MM (n=53)	P*
CMF (%) ^a	0.39±0.07	1.05±0.09	3.65±0.96	10.79±1.90	0.000
CMF (cél/μl) ^b	128±33	522±95	1133±315	4089±1162	0.000
Histología (%) ^c	nd	3.96±0.25	16.45±2.58	33.91±2.90	0.000

Los valores evaluados por CMF se expresan en porcentajes y células/μl ± EEM.

Los datos de histología se expresan solo en porcentajes ±EEM.

nd, no datos

*Valor de p determinada por test de Kruskal Wallis. P entre grupos mediante U de Mann Whitney.

^aControl vs. todos p<0.000; MGUS vs. SMM o MM p<0.000; SMM vs. MM; p=0.002;

^bControl vs. todos p<0.000; MGUS vs. MM p<0.000; MGUS vs. SMM p=0.033

^cMGUS vs. SMM o MM p<0.000; SMM vs. MM vs.; p<0.000

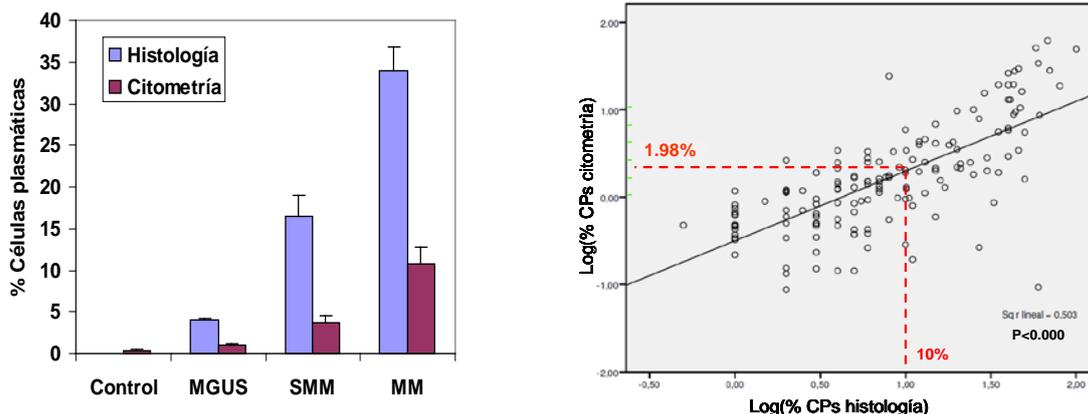
El recuento de CPs obtenido mediante CMF proporcionó valores inferiores a los estimados por histología en todas las patologías. No obstante, con ambos métodos se observó un aumento progresivo del porcentaje de CPs a medida que empeoraba el pronóstico de la enfermedad. Es decir, que existía una correlación positiva entre ambos métodos de medida (Figura 36, derecha).

La relación entre ambas variables metodológicas se ajustaba a una ecuación lineal:

$$\text{Log (CPs citometría)} = -0,501 + 0,798 \times \text{Log (CPs histología)}$$

Así, tal como se puede observar en la Figura 36 derecha, cuando se extrapoló el valor del 10% de CP estimadas por histología (punto de corte habitual para diferenciar MGUS de MM y SMM), se obtuvo un valor de 1,98% de CPs estimadas por citometría.

Para estimar el mejor valor de corte en las cifras de CPs, determinadas por citometría, que permitiera diferenciar pacientes MGUS de pacientes con mieloma (SMM o MM), se procedió a un análisis de curvas ROC, con área bajo la curva=0.83 e IC-95% 0.76-0.89 (p<0.001), de donde se obtuvo un punto de corte de 1,78% (Figura 37).



Figuras 36. Relación entre las cifras de CPs en MO estimadas por CMF e histología. La parte izquierda de la figura) representa los porcentajes de CP estimadas por histología (barras azules) y por CMF (barras moradas). En la parte derecha) se representa la correlación entre CP determinadas por histología y por citometría con una estimación del 10% de CPs estimadas por histología correspondiente a un valor de 1,98% por citometría.

Este punto de corte obtenido por curva ROC de 1.78% de CPs por citometría, proporcionó una sensibilidad del 74,4% y especificidad del 87,2% para diferenciar Mieloma (SMM+MM) de MGUS. La sensibilidad fue mucho menor cuando se trataba de diferenciar SMM de MGUS (52,0%) y claramente superior cuando se trataba de diferenciar MM de MGUS (84,9%).

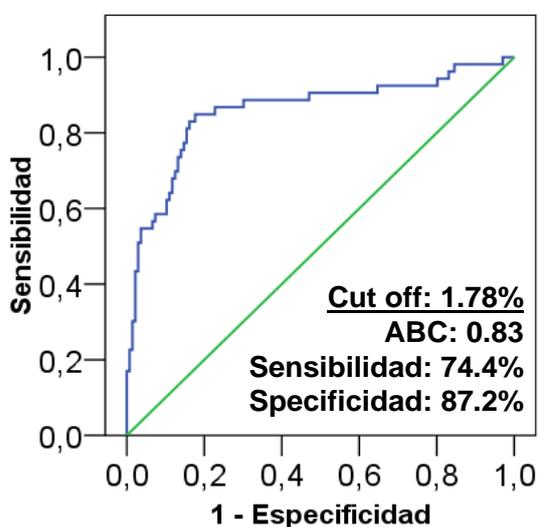


Figura 37: Curva ROC para estimar el punto de corte de %CPs-citometría para diferenciar MGUS de Mieloma(SMM+MM).

Además, se estimó si el valor de corte de CPs de 1,78% establecido por citometría, podría tener valor predictivo sobre la progresión de la enfermedad y SG de los pacientes. Así, al analizar el grupo conjunto de SMM+MM se pudo determinar que cifras de CPs > 1,78% por CMF se asociaban significativamente a una mayor tasa de progresión ($p=0.033$) y una peor SG ($p=0.008$). Tanto en los pacientes diagnosticados

de SMM como los de MM por separado, se observaba una tendencia hacia una mayor progresión de la enfermedad y menor SG a los 36 meses de seguimiento con valores de CPs > 1,78%, no llegando a alcanzar significación estadística en ningún caso. (Tabla 31 y Figura 38)

Tabla 31. Progresión y supervivencia global en función de CP por CMF > 1.78%

Grupo	Progresión enfermedad, Si/no n(%)		Supervivencia, Si/no n(%)	
	CPs ≤ 1.78% MO	CPs > 1.78% MO	CPs ≤ 1.78% MO	CPs > 1.78% MO
SMM	2/10 (16.7%)	4/9 (30.8%)	12/0 (100%)	9/4 (69.2%)
MM	4/4 (50%)	28/17 (37.8%)	7/1 (87.5%)	27/18 (60%)
SMM+MM	6/14 (30%)	32/26 (55.2%) ^a	19/1 (95%)	36/22 (62.1%) ^b

^aCPs ≤ o > 1.78% MO: p=0.33; ^b p=0.008

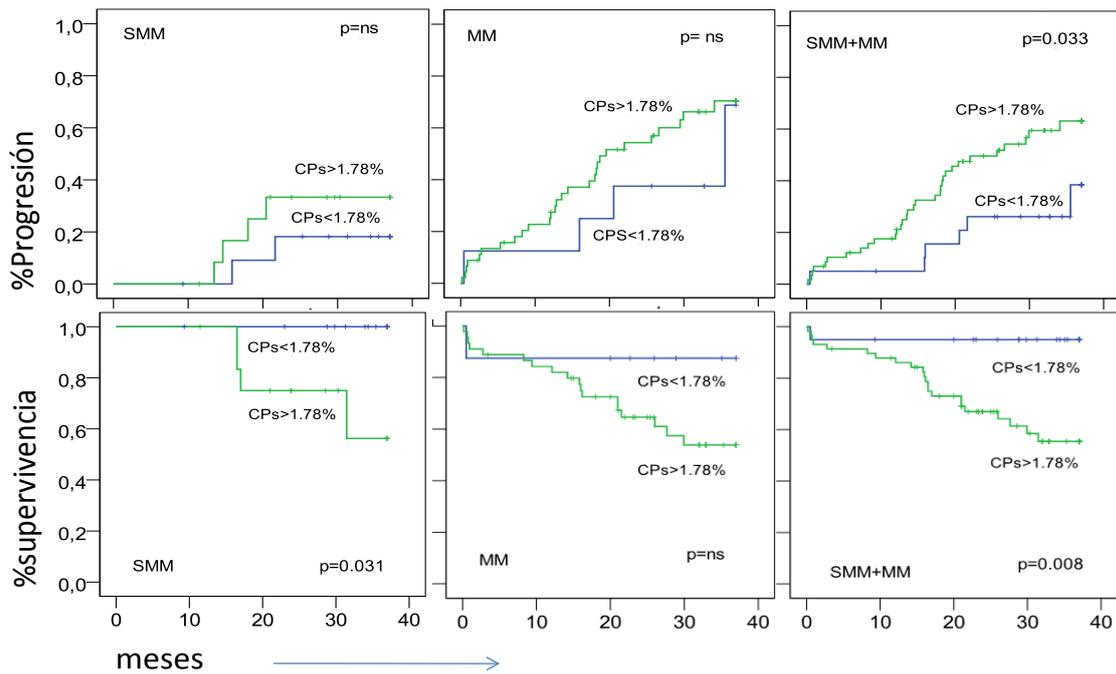


Figura 38: Impacto en la progresión y supervivencia de los pacientes de cifras de CPs en MO por CMF > 1.78%. Curvas Kaplan Meier de progresión de la enfermedad (gráficas superiores) y SG de pacientes (gráficas inferiores) a 36 meses, según la presencia de cifras de CPs por CMF > 1.78%. Los pacientes con CPs > 1.78% progresan más y sobreviven menos que aquellos con CPs < 1.78%. La significación estadística (Log Rank) queda reflejada en las gráficas. Las curvas con p > 0.05 aparecen como p=ns (no significativa).

2.3.1 UTILIDAD DE LA PROPORCIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN MO DENTRO DEL COMPARTIMENTO DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN MO

Una de las principales ventajas de la CMF frente al análisis histológico, es su capacidad para diferenciar las aCPs o potencialmente clonales de las CPs residuales sanas o policlonales. La proporción de aCPs en MO dentro del compartimento de CPs (cociente aCPs/BMPC) se ha descrito que tiene valor diagnóstico y pronóstico (Pérez Persona *et al.*, 2007). Según este criterio, al estudiar este cociente en los diferentes grupos de patologías (Figura 39, izquierda), se pudo observar que en MGUS una proporción considerable de CPs eran policlonales y exhibían un fenotipo normal, con valores de aCPs de $50.1\% \pm 3.8$, mientras que en el mieloma activo casi todas las CPs son monoclonales ($94.3\% \pm 1.7$, $p < 0.001$) y que en el indolente aparecía igualmente una gran proporción de aCPs ($92.2\% \pm 3.4$, $p < 0.001$). Así, encontramos que solo el 9.3% de los pacientes con MGUS presentaban aCPs > 95%, frente al 64.0% del grupo SMM ($p < 0.001$) y el 79.2% de los clasificados MM ($p < 0.001$) (Figura 39, derecha).

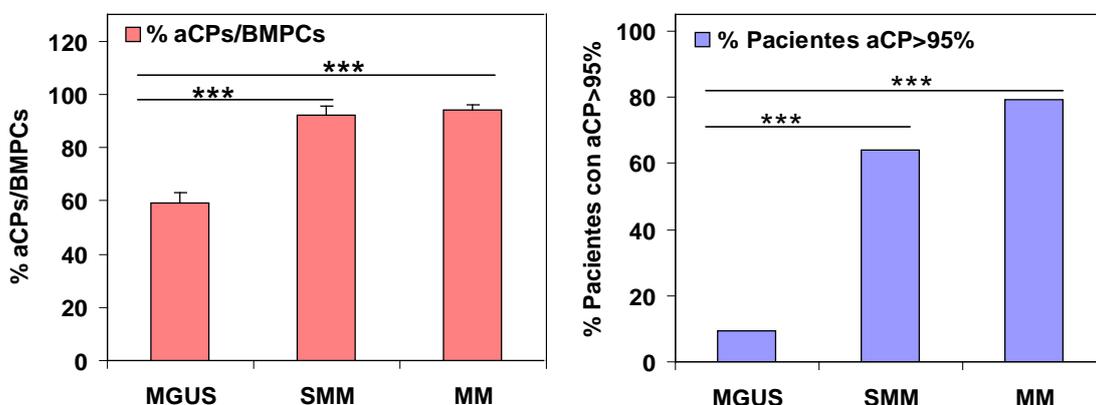


Figura 39. Células plasmáticas de fenotipo aberrante en los diferentes grupos de patología. Parte Izquierda, El cociente aCPs/BMPC (Media \pm EEM) se calculó para los diferentes grupos. Parte Derecha, Frecuencia de pacientes con aCPs > 95% para cada patología. *** $p < 0.001$ en Chi-cuadrado. ***, indica las diferencias significativas en el análisis post-hoc DMS del ANOVA.

Sin embargo, la presencia de aCP > 95% no impactó de forma significativa ni en la progresión de la enfermedad ni en la SG, aunque para esta última se observa cierta tendencia a menor SG en pacientes con aCP > 95% que con aCPs \leq 95% (59.45% vs. 81.2% y 65% vs. 85% en MM y SMM+MM, respectivamente) (Tabla 32 y Figura 40).

Tabla 32. Progresión de la enfermedad y SG en pacientes con mieloma y aCPs > 95% en MO.

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia; Si/No n (%)	
	aCP>95%	aCP≤ 95%	aCP>95%	aCP≤ 95%
SMM	4/12 (25%)	3/6 (33,3%)	13/3(81,3%)	8/1 (88,9%)
MM	28/14 (66,7%)	5/6 (45,4%)	25/17(59.5%)	2/9 (81,2%)
SMM+MM	32/26 (55,2%)	8/12 (40%)	38/20(65%)	17/3 (85%)

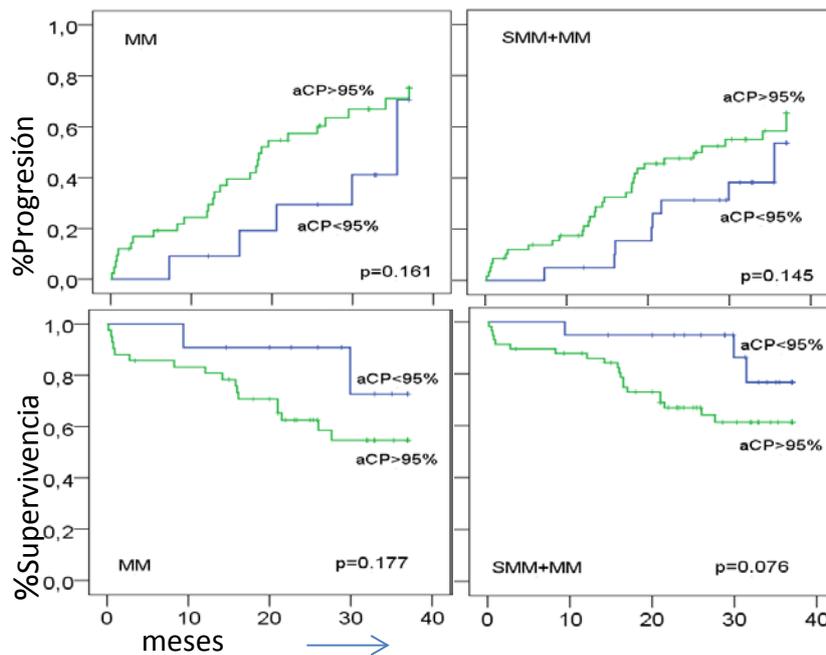


Figura 40. Impacto de la ratio aCP/BMPC en la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes diagnosticados de MM y de SMM+MM. Representa curvas Kaplan Meier para progresión y SG de pacientes estratificados por CPa> o <del 95% en MO. Los pacientes con aCP>95% (línea verde) presentan una SG a 36 meses inferior a los que están por encima de dicho punto de corte (línea azul)

2.3.2 MARCADORES FENOTÍPICOS DE VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN CÉLULAS PLASMÁTICAS

Una vez definida la aCP sobre la base de su pérdida de expresión de CD19 y/o CD27 y/o de la ganancia de CD20, CD28 y/o CD56, se analizó mediante CMF multiparamétrica la expresión de marcadores con valor pronóstico como CD28 y CD117 según se ha descrito previamente (Tabla 33):

- a) *La pérdida de expresión de CD19* se acentuó con la severidad de la patología. Así en pacientes con MM la mayoría de sus células (96.03±1.12%) perdían la expresión de esta molécula, mientras que solo lo hacían en el 89.86±4.06%, 73.11±2.27% y 33.45±3.86% en los pacientes de los grupos SMM, MGUS y

controles, respectivamente. La comparación entre grupos resultó estadísticamente significativa para el control frente a todos los grupos y también todos los grupos entre sí.

- b) *La expresión de CD20* en las aCPs no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos. La expresión positiva en CPs de CD20 suele caracterizar a pacientes con translocación t(11:14), que como se describe en el apartado de FISH estuvo muy poco representada en nuestra serie.
- c) *La pérdida de expresión de CD27* en CP fue mayor en MM (53.15±3.50%) que en SMM 61.48±4.92% o MGUS (74.63±3.08%). El análisis comparativo mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se contrastaron los datos de los individuos control con los de las distintas patologías (en todos los casos $p < 0.001$) y también cuando se comparó MGUS con SMM o MM ($p = 0.005$ y $p < 0.000$, respectivamente). Sin embargo, la comparación entre SMM y MM no reveló diferencias estadísticamente significativas.
- d) *La molécula CD56* en CPs se expresaba en el 66.95±5.72% de pacientes con MM, en el 59.22±8.20% de los SMM, en el 39.29±3.43% de MGUS y en el 17.14±3.14% de los controles. La comparación entre grupos mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos (en todos los casos $p < 0.000$) y entre MGUS y SMM o MM ($p = 0.02$ y $p < 0.000$, respectivamente). Las diferencias entre SMM y MM no fueron significativas.
- e) *La expresión de CD28 y CD117*, no mostraron diferencias entre ninguno de los grupos de estudio. Además, se realizó un análisis de curva ROC para ambas moléculas tratando de establecer puntos de corte con valor pronóstico en progresión y SG, pero en ningún caso, se obtuvieron valores de utilidad (datos no mostrados).

Tabla 33. Análisis de antígenos de diferenciación con valor pronóstico en células plasmáticas.

	Control (n=30)	MGUS (n=85)	SMM (n=25)	MM (n=53)	P*
Marcadores de utilidad para identificar CPs aberrantes					
CD19(+)^a	76.6±3,86	26.9±2,27	10.5±4,06	4.0±1,12	0.000
CD20(+)	8,62±1,20	10,12±1,91	11,92±5,15	11,14±3,23	0.000
CD27(+)^b	98,82±0,42	74,63±3,08	61,48±4,92	53,15±3,50	0.000
CD56 (+)^c	17,14±3,14	39,29±3,43	59,22±8,20	66,95±5,72	0.000
Marcadores de utilidad pronóstica					
CD28(+)	13,77±2,43	19,97±2,78	15,38±3,93	19,82±3,96	0.338
CD117(+)	39,11±5,71	29,61±3,15	34,44±6,33	30,57±4,39	0.356

Los datos porcentuales se expresan en Media ± EEM.

*Valor de p determinada por test de Kruskal Wallis. P entre grupos mediante U de Mann Whitney.

^a Control vs. todos los grupos (p<0.000); MGUS vs. SMM o MM p<0.000; SMM vs. MM p<0.000

^b Control vs. todos p<0.000; MGUS vs. SMM p=0.005; MGUS vs. MM p<0.000

^c Control vs. MGUS o MM p=0.001; Control vs. SMM p=0.005; MGUS vs. SMM p=0.023; MGUS vs. MM p<0.000

2.3.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Los estudios de la cuantificación de ADN mediante citometría de flujo poseen un gran impacto clínico en el área de las neoplasias hematológicas y tumores sólidos puesto que contribuyen de manera relevante al diagnóstico, a la valoración pronóstica y al seguimiento de los pacientes. Mediante este estudio se puede determinar la presencia de aneuploidías que orienten sobre la existencia de anomalías clonales en las células tumorales, así como la distribución de las células tumorales a lo largo de las distintas fases del ciclo celular y con ello su tasa de proliferación o “*labeling index*”.

2.3.3.1 ANEUPLOIDÍA: FRECUENCIAS E IMPACTO CLÍNICO

En este apartado se valora la frecuencia de la aneuploidía detectada mediante CMF y se comparará con la tasa de aneuploidía detectada mediante FISH en células plasmáticas purificadas. El valor pronóstico de la aneuploidía detectada mediante FISH se describe en el apartado 3.2.

Mediante CMF se detectaron aneuploidías en el 43,37% de los pacientes con MGUS, en el 68% de los SMM y en el 62,26% de los MM, porcentajes que fueron menores cuando la aneuploidía se determinó mediante FISH donde se detectaron

alteraciones en el 15,28% de MGUS, 30% de SMM y en el 47,83% de MM. La comparación entre grupos (Tabla 34) reveló que por CMF se podían demostrar diferencias significativas entre MGUS y SMM ($p=0.031$) o MM ($p=0.032$), mientras que por la técnica de FISH estas diferencias solo se observaron para la comparación entre MGUS y MM ($p<0.001$).

Tabla 34. Frecuencia de aneuploidía detectada por CMF y FISH

Aneuploidía*	MGUS	SMM	MM
CMF, Si/No, n (%) ^a	36/47(43,37%)	17/8(68%)	33/20(62.26%)
FISH, Si/No, n (%) ^b	11/61(15.28%)	6/14 (30%)	22/24 (47.83%)

* Todos los casos con aneuploidía detectada por CMF fueron por hiperdiploidía, excepto 1 paciente del grupo MM que presentó hipodiploidía.

^a MGUS vs. SMM; OR=2.77 $p=0.031$; MGUS vs. MM; OR= 2.15 $p=0.032$

^bMGUS vs. MM; OR=5.08 $p<0.001$.

De los 136 pacientes en los que se completó el estudio por ambos métodos, en 32 (23.53%) se detectaron aneuploidías por ambas técnicas y en 53 (38.97%) no se detectaron por ninguno (Tabla 35). De los 51 (37.5%) pacientes con aneuploidía restantes, la mayoría 44 (32.3%) se detectaron exclusivamente por CMF, mientras que por FISH sólo se detectó en 7 pacientes (5.1%) (OR=5.5; $p<0.001$)

El análisis de la ploidía mediante CMF no resultó útil para predecir la progresión de la enfermedad o la SG de los pacientes, ya que no se detectaban diferencias claras en estos parámetros entre los pacientes diploides y aneuploides-hiperdiploides (Tabla36). En este análisis es importante destacar que solo 1 paciente de los presentaban aneuploidía lo fue por hipodiploidía y todos los demás por hiperdiploidía, de manera que cuando se hace referencia a aneuploidía por CMF, básicamente habla de hiperdiploidía.

Tabla 35. Aneuploidía por CMF y por FISH en el total de pacientes

		Aneuploidía FISH	
		No	Sí
Aneuploidía CMF	No	53(38,9%)	7(5.1%)
	Sí	44(32,3%)	32(23,5%)

Tabla 36. Impacto de la aneuploidía determinada por CMF en la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes.

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia; Si/No n (%)	
	Aneuploide	Diploide	Aneuploide	Diploide
SMM (n=25)	4/13 (23,5%)	3/5 (37,5%)	14/3(82.4%)	7/1 (87.5%)
MM (n=53)	21/12 (63.6%)	12/8 (60.0%)	20/13 (60.6%)	14/6 (70.0%)
SMM+MM (n=78)	25/50 (50.0%)	15/13 (53.6%)	34/16 (68.0%)	21/7 (75%)

2.3.3.2 CICLO CELULAR E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN: FRECUENCIA E IMPACTO CLÍNICO

La proliferación y apoptosis de las CPs son procesos opuestos que tienen que ver con la patogénesis del MM y sirven para controlar la expansión de la célula tumoral. En este trabajo se ha medido de forma simultánea el índice de proliferación y el de apoptosis (tal y como se describe en el apartado 2.3) de las CPs en el momento del diagnóstico. Los resultados se han relacionado con la progresión de la enfermedad y con la SG del paciente.

El IP-CP de las CPs (Figura 41) se incrementaba de forma progresiva y estadísticamente significativa desde los controles sanos (0.98 ± 0.229), a MGUS (1.34 ± 0.14 , $p < 0.05$), SMM (2.30 ± 0.69 , $p < 0.01$) y MM (2.95 ± 0.40 , $p < 0.001$). Además, este índice fue significativamente más elevado en los pacientes con MM que en los MGUS ($p < 0.001$) y que el de los pacientes con SMM ($p < 0.01$).

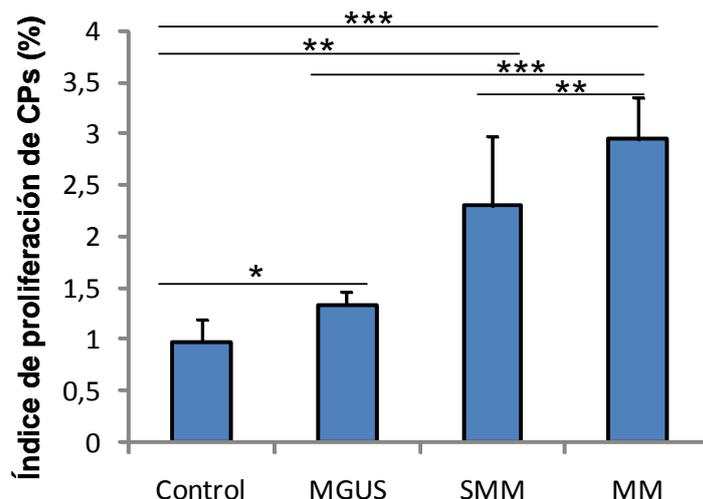


Figura 41. Índice de proliferación de CPs determinada mediante CMF. Se representan los índices para cada patología y se comparan entre sí. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ en el análisis post-hoc DMS del ANOVA.

Mediante análisis de curva ROC con área bajo la curva de 0.695 se determinó un valor de 1.1% de proliferación de las CPs en MO, a partir del cual se podía diferenciar el total de pacientes con mieloma (SMM+MM) de los que tenían MGUS, con una sensibilidad del 78.9% y una especificidad del 62.6% (Figura 42 izquierda).

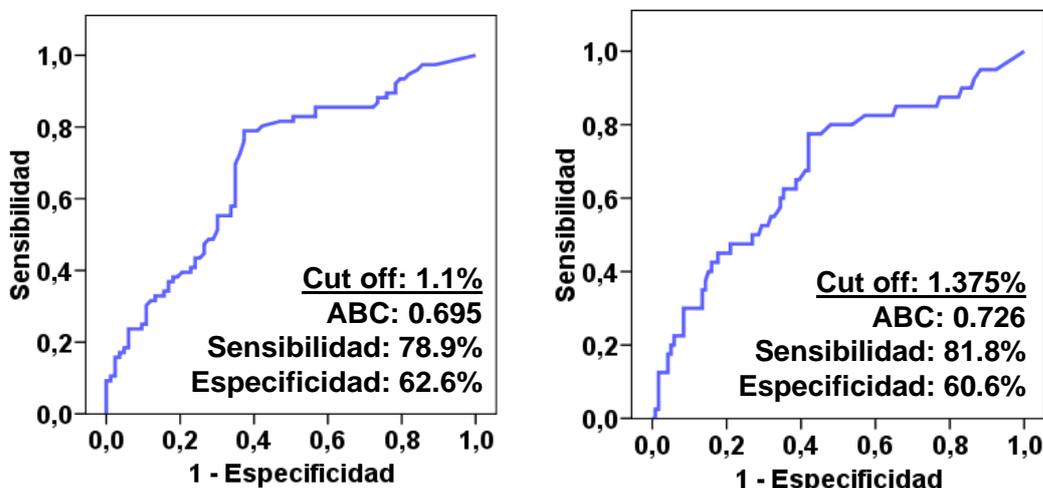


Figura 42. Curvas ROC con sus respectivos puntos de corte y sensibilidad y especificidad. Figura izquierda, establece un valor de corte (cut-off) en el IP-CP de las CPs de MO que nos permita diferenciar Mieloma (SMM+MM) de MGUS. Figura derecha, establece valor de corte para diferenciar pacientes con riesgo de progresión o muerte en los pacientes con mieloma (SMM+MM).

Igualmente se realizó un análisis con curva ROC para determinar un valor de corte de utilidad en el pronóstico de progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes, con área bajo la curva de 0.726, estableciéndose un punto de corte 1.375% de proliferación de CPs que ofrecía una sensibilidad del 81.2% y una especificidad del 60.6% (Figura 42 derecha).

Los IP-CP>1.375% conferían un valor pronóstico adverso para la **progresión** de la enfermedad en los pacientes con mieloma (Tabla 37 y Figura 43), de manera que aquellos con CP-IP>1.375% progresaron más que los que tenían tasas inferiores, tanto en el grupo de SMM (41.7% vs. 7.7%), MM (64.7% vs. 52.6%) o el SMM+MM conjuntamente (58.7% vs. 35.48%, p=0.029). Igualmente, este índice impactaba de forma negativa en la **SG** de los pacientes, de manera que los pacientes con CP-IP>1.375% comparados con los que no superaban dicho índice, tenían una supervivencia inferior tanto en SMM (66.7% vs. 100%, p=0.039), MM (55.9% vs. 78.9%) y SMM+MM conjuntamente (58.7% vs. 87.5%, p=0.005)

Tabla 37. Impacto del Índice de proliferación de CPs en la progresión de la enfermedad y SG de los pacientes en los pacientes con mieloma.

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia; Si/No n (%)	
	IP-CP>1.375%	IP-CP≤1.375%	IP-CP>1.375%	IP-CP≤1.375%
SMM	5/7 (41.7%)	1/12 (7.7%)	8/4 (66.7%) ^a	13/0 (100%)
MM	22/12 (64.7%)	10/9 (52.6%)	19/15 (55.9%)	15/4 (78,9%)
SMM+MM	27/19 (58.7%) ^b	11/21 (35.48%)	27/19 (58.7%) ^c	28/4 (87.5%)

IP-CP, Índice de proliferación de las células plasmáticas.

^aOR=1.5 ,p=0.039

^bOR=2.71, p=0.029;

^cOR=4.926,p=0.005

Con el análisis de Kaplan Meier (Figura 43) igualmente se pudo demostrar que índices de proliferación superiores a 1.375% impactaban negativamente en la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes de los grupos SMM, MM o SMM+MM analizados conjuntamente. Para la progresión de la enfermedad se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas o muy próximas a la significación en los grupos SMM (p=0.052) y SMM+MM (p=0.029), y también en la SG en los grupos SMM (p=0.028) y SMM+MM (p=0.009).

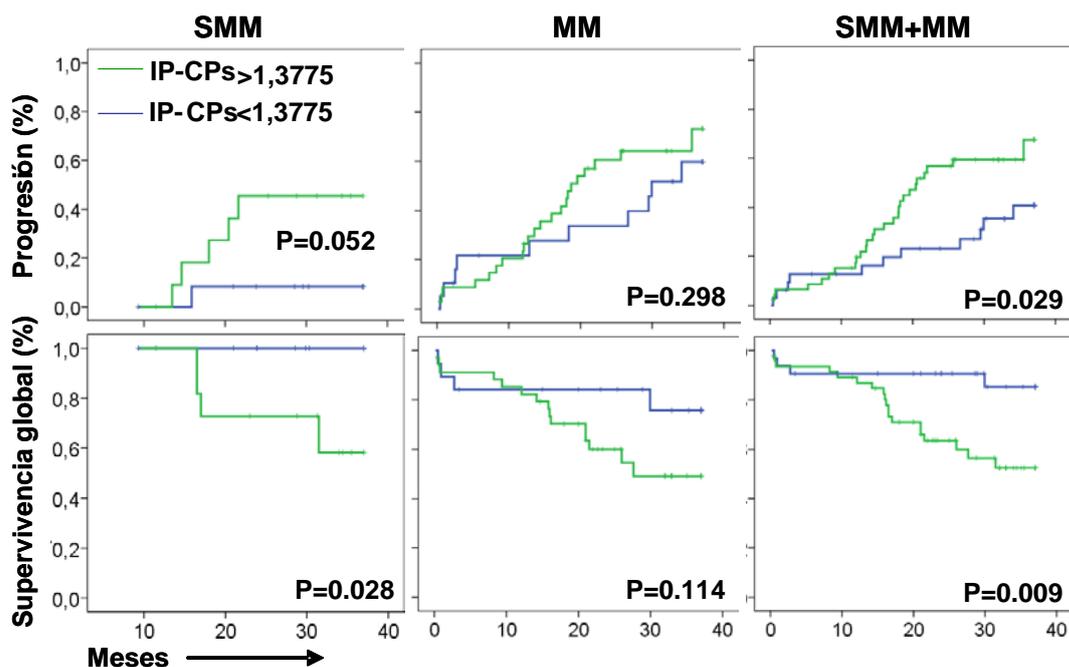


Figura 43. Impacto del índice de proliferación de las CPs sobre la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes. Análisis Kaplan-Meier en función del índice de proliferación de las CPs \leq o $>$ 1.375% en los pacientes de los grupos SMM, MM y SMM+MM conjuntamente. La significación estimada en el análisis Log-Rank se muestra en cada gráfico.

2.3.4 ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS PLASMÁTICAS DE MO

La determinación de apoptosis en CPs de MO se realizó mediante tinción con Anexina V y análisis por CMF. La tinción de Anexina-V se evaluó igualmente en linfocitos B, dato que se consideró como la apoptosis basal de las muestras de MO. Este valor se sustrajo del obtenido en CPs, de manera que el índice de apoptosis de CPs fue definido como resultado de dicha sustracción:

$$\text{Índice de apoptosis de CPs} = \% \text{ Anexina-V en CPs} - \% \text{ Anexina-V en linfocitos B}$$

Los índices de apoptosis de CPs (IA-CPs) en pacientes de nuestra serie se representan en la Figura 44. Estos valores decrecieron de forma progresiva desde el grupo control ($21.47\% \pm 2.18$) a los grupos MGUS ($9.37\% \pm 0.81$), SMM ($4.1\% \pm 1.01$) y MM ($3.39\% \pm 0.69$), de manera que las comparaciones entre el valor del control y los distintos grupos fueron estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0.001$). Igualmente, se detectaron diferencias significativas entre los grupos MGUS vs. SMM o MM ($p < 0.001$ en ambos casos), pero no entre SMM y MM.

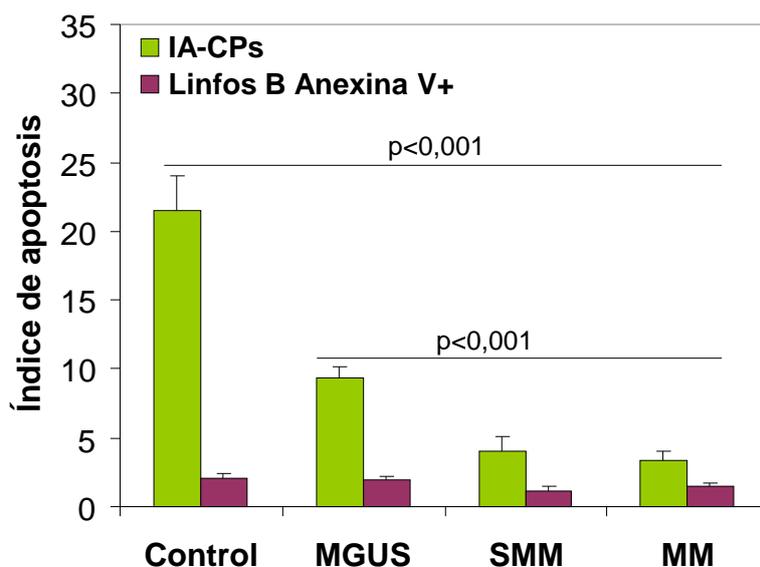


Figura 44. Índice de apoptosis de las células plasmáticas en médula ósea en los grupos control y de gammapatías. La tasa de apoptosis de CPs (columnas verdes) se estimó como el porcentaje de CPs-Anexina-V+ menos el porcentaje de Linfocitos-B-Anexina-V+. Las cifras de linfocitos B Anexina V positivos se muestran para cada grupo (columnas marrones). Los resultados se expresan como Media±EEM. p estimadas en el análisis post-hoc DMS del ANOVA.

Para estimar la utilidad del IA-CPs en la discriminación entre gammapatías benignas (MGUS) y malignas (SMM+MM), se estableció mediante curva ROC un valor de corte de 5.68% de apoptosis de CPs, con área bajo la curva de 0.776y una sensibilidad del 64.5% y especificidad del 78.14% (Figura 45 izquierda).

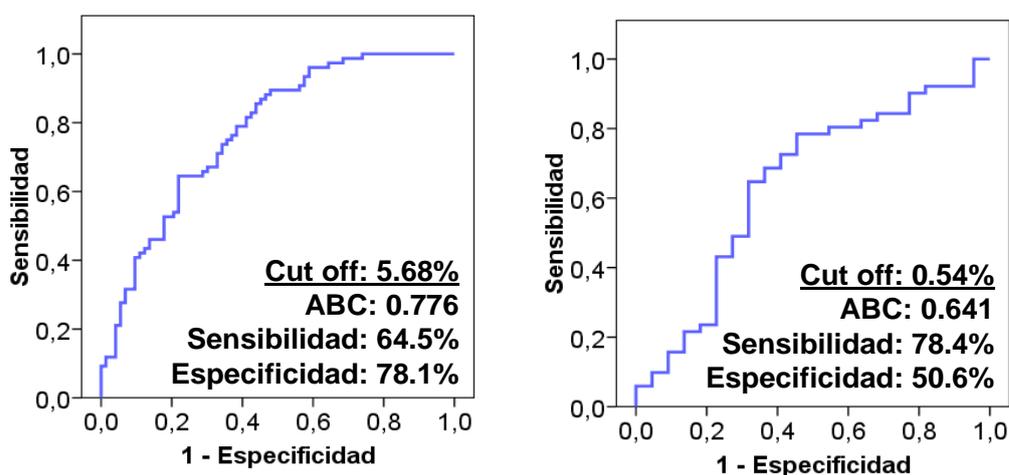


Figura 45. Curvas ROC para establecer un valor de corte en el índice de apoptosis de las CPs de MO. Figura izquierda, establece un punto de corte en el IA-CP en MO que nos permita diferenciar Mieloma (SMM+MM) de MGUS. Figura derecha, establece el punto de corte con utilidad pronóstica en progresión y SG de pacientes con mieloma (SMM+MM)

Sin embargo, dicho valor no resultó de utilidad para la predicción de progresión o SG. Por ello, se procedió a ensayar un nuevo punto de corte equivalente a 0.54% de apoptosis de CPs en una curva ROC con área bajo la curva de 0.641, que ofrecía una sensibilidad del 78.4% y especificidad del 50.6% (Figura 45 derecha).

Este nuevo punto de corte (0.54% de apoptosis de plasmáticas) tampoco demostró gran capacidad predictivas sobre la **progresión** de la enfermedad en ninguno de los grupos de mieloma (Tabla 38). Sin embargo, se pudo comprobar que IA-CP>0.54% parecían ejercer un efecto protector, ya que la **SG** en pacientes, era más elevada que los que se situaban por debajo del mismo, tanto para SMM (89.58% vs. 60%), como MM (71.9% vs. 47.1%) o SMM+MM conjuntamente (78.4% vs. 50.0%). No obstante, solo se observaron diferencias significativas al comparar los mielomas SMM+MM conjuntamente (p=0.017).

Tabla 38. Índice de apoptosis de CPs y progresión de la enfermedad y supervivencia en los distintos grupos de estudio

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia; Si/No n (%)	
	IA-CP>0.54%	IA-CP≤0.54%	IA-CP>0.54%	IA-CP ≤0.54%
SMM	4/15 (21,1%)	2/3 (40,0%)	17/2(89,5%)	3/2(60,0%)
MM	19/13 (59,4%%)	11/6 (64,7%)	23/9 (71,9%)	8/9 (47,1%)
SMM+MM	23/28 (44,23%)	13/9 (59,1%)	40/11 (78,4%)	11/11 (50,0%) ^a

IA-CP, índice de apoptosis de las CPs

^a, OR= 0,27 p=0.017

Por otro lado, el análisis de Kaplan Meier (Figura 46), reveló que todos los grupos de pacientes con mieloma e IA-CP>0.54 tenían SGs más prolongadas que los que el IA-CP<0.54. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en los grupos MM (p=0.018) y SMM+MM (p<0.004).

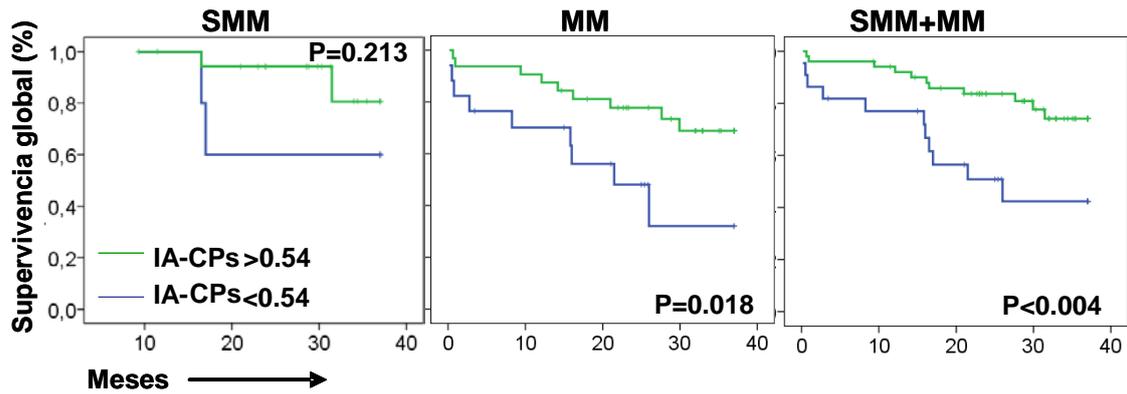


Figura 46. Índice de apoptosis de las CPs y SG de los pacientes. Se muestran curvas obtenidas mediante análisis Kaplan-Meier para IA-CPs \leq o >0.54 en pacientes de los grupos SMM, MM y SMM+MM conjuntamente. El valor de p obtenido mediante Log-Rank se incluye en cada gráfico.

2.3.5 RATIO PROLIFERACIÓN/APOPTOSIS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN MO

La tasa de crecimiento neto de los tumores esta en relación con su capacidad proliferativa y el índice de apoptosis o muerte celular. Por ese motivo, pareció interesante valorar la capacidad diagnóstica y pronóstica de dicho cociente en todos los grupos de gammopatías de presente estudio. Estos cocientes fueron comparados en cada uno de los grupos entre sí y con el obtenido en controles sanos.

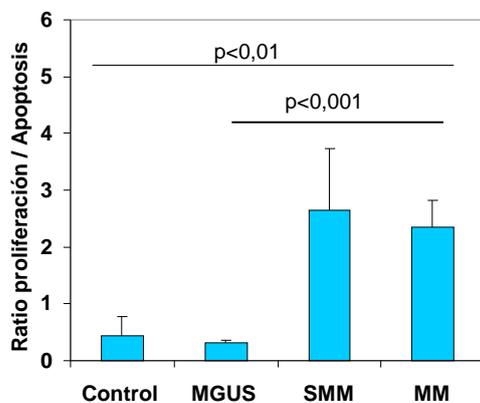


Figura 47. Ratio proliferación/apoptosis de CPs en MO en controles sanos y pacientes. Se representa el cociente IP-CP/IA-CP obtenidos en controles sanos y en cada grupo de gammopatías. Los resultados se expresan como Media \pm EEM. *p* estimadas en el análisis post-hoc DMS del ANOVA.

Como se puede observar en la Figura 47, los controles y los pacientes con MGUS tenían ratios de proliferación/apoptosis (P/A) similares (0.43 ± 0.34 y 0.30 ± 0.04), y muy inferiores a los de pacientes con mieloma, SMM (2.65 ± 1.08) y MM (2.34 ± 0.47). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para los dos grupos de mielomas (SMM y MM) tanto si se comparaban a los controles sanos ($p<0.01$, en ambos casos)

como si la comparación se hacía frente a los pacientes con MGUS ($p < 0.001$, en ambos casos).

Con posterioridad, mediante una curva ROC se estableció un punto de corte equivalente a un valor de la ratio de 0.37, que permitiera discriminar MGUS de mieloma (SMM+MM) (Figura 48 izquierda). El área bajo la curva tuvo un valor de 0.81 y la sensibilidad alcanzó un valor de 73.2% mientras que la especificidad fue del 79.1%.

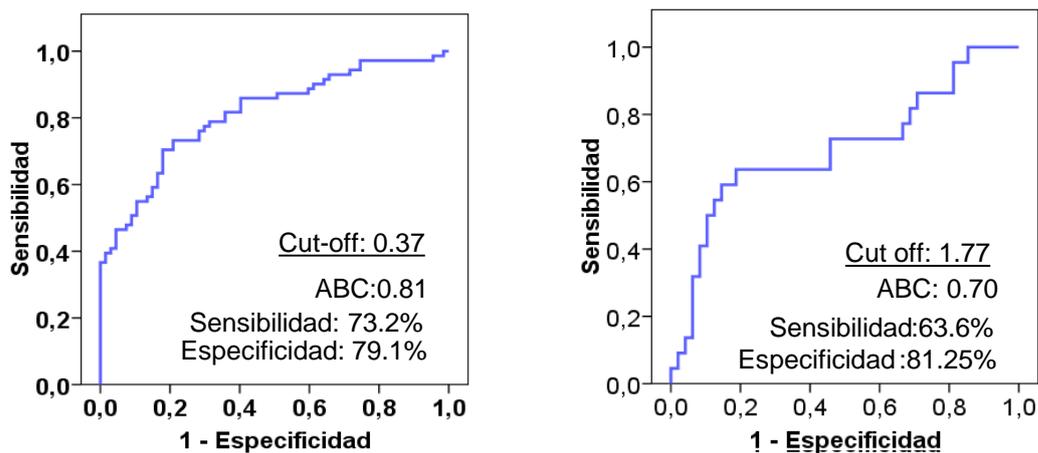


Figura 48. Curva ROC para establecer un valor de corte en la ratio proliferación/apoptosis de las CPs de MO. Figura izquierda, punto de corte que nos permita diferenciar Mieloma (SMM+MM) de MGUS. Figura derecha, punto de corte con valor pronóstico en la progresión y la supervivencia de los pacientes Mieloma (SMM+MM).

Igualmente y mediante el análisis de curvas ROC se estimó un valor de corte ratio P/A de 1.77 (Figura 48 derecha) que permitiera predecir la progresión de la enfermedad y la SG, cuya área bajo la curva fue de 0.70 y que mostró una sensibilidad de 63.6% y una especificidad del 81.25%.

Con este nuevo punto de corte de 1.77, no se pudo demostrar la existencia de diferencias estadísticamente significativas relativas a **progresión** de la enfermedad en ningún grupo de mieloma.

Además, valores del cociente $P/A > 1.77$ (Tabla 39), también se asociaron a una **SG** significativamente menor que los que tenían $P/A \leq 1.77$, tanto en MM (38.8% vs. 79.3%; $p < 0.01$) como en SMM+MM conjuntamente (39.1% vs. 80.5%, $p < 0.001$).

Tabla 39. Impacto de la ratio proliferación/apoptosis en la progresión de la enfermedad y supervivencia de los pacientes con mieloma.

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia; Si/No n (%)	
	RatioP/A*>1.77	RatioP/A≤1.77	Ratio P/A>1.77	RatioP/A≤1.77
SMM	2/2 (50,0%)	3/15 (16,7%)	2/2 (50,0%)	16/2(88,9%)
MM	13/6 (68,4%)	17/12 (58,6%)	7/12 (38,8%) ^a	23/6 (79.3%)
SMM+MM	15/12 (55,5%)	20/27 (42,5%)	9/14 (39,1%) ^b	39/8 (80,5%)

*Ratio P/A: ratio proliferación/apoptosis de CPs en MO.

^a OR= 6.57; p<0.01

^b OR=7.5; p<0.001

La aplicación del análisis de Kaplan Meier (Figura 49), igualmente demostró que ratios de P/A > 1.77 impactaban negativamente en la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes de los grupos SMM, MM y SMM+MM analizados conjuntamente. Al considerar la progresión de la enfermedad se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los grupos SMM (p=0.035) y SMM+MM (p=0.013), así como al hacerlo con la SG en los grupos SMM (p=0.026), MM (p<0.002) y SMM+MM (p<0.001).

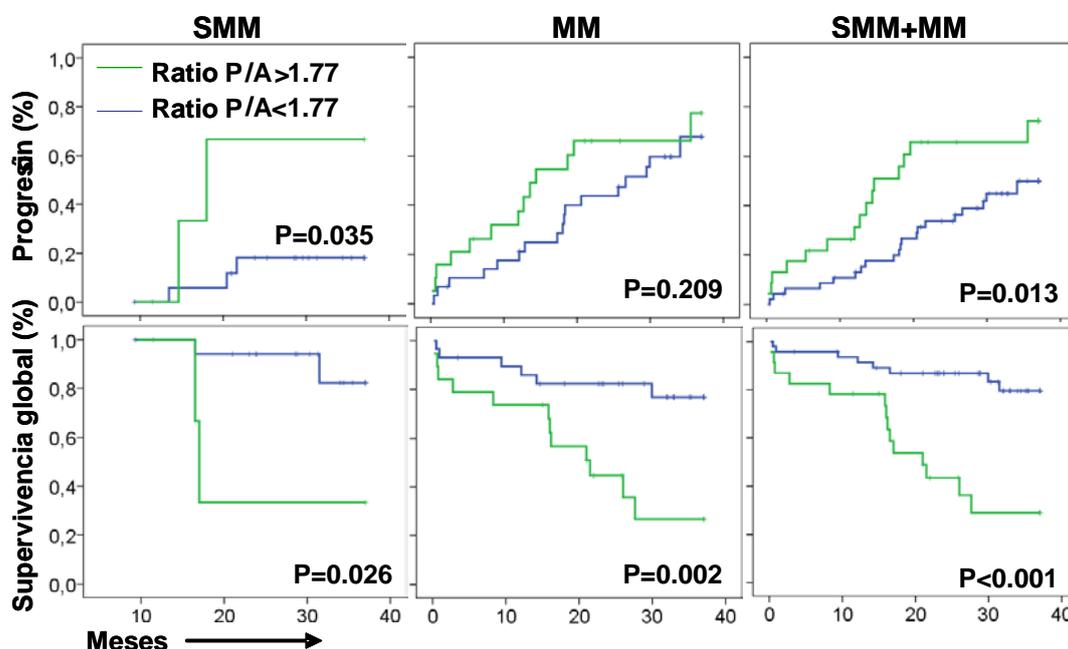


Figura 49. Ratio proliferación/apoptosis de las CPs y progresión de la enfermedad o SG de los pacientes. Se muestran las curvas obtenidas con Kaplan-Meier para la comparación ratio proliferación/apoptosis (Ratio P/A) de CPs ≤ o > 1.77 en los pacientes de los grupos SMM, MM o MM+MM conjuntamente. La significación fue estimada por Log-Rank y el valor de p se muestra en cada gráfico.

En resumen, de los tres parámetros analizados en este apartado, proliferación, apoptosis y ratio proliferación/apoptosis de las CPs en MO, este último fue el que alcanzó mayor sensibilidad (73.2%) y especificidad (79.1%) y por tanto resultó más eficaz para orientar el diagnóstico de MGUS frente al de mieloma (Tabla 40 arriba). Igualmente, de estos tres parámetros es nuevamente la ratio proliferación/apoptosis de las CPs, la que ofrece mayor valor predictivo respecto a la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes (Tabla 40 debajo).

Tabla 40. Proliferación, apoptosis y ratio P/A de células plasmáticas

Su utilidad diagnóstica para diferenciar MGUS de mielomas							
	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	Suma S+E			
Proliferación de CPs	1.1%	78.9%	62.6%	141.5%			
Apoptosis de CPs	5.68%	64.5%	78.1%	142.6%			
Ratio P/A de CPs	0.37%	73.2%	79.1%	152.3%			
Su utilidad pronóstica en progresión de la enfermedad y SG							
	Punto de corte	Progresión enfermedad*			Supervivencia global*		
		SMM	MM	ambos	SMM	MM	ambos
Proliferación de CPs	1.375%	0.052	ns	0.029	0.028	ns	0.009
Apoptosis de CPs	0.54%	ns	ns	ns	ns	0.018	0.004
Ratio P/A de CPs	1.77	0.035	ns	0.013	0.026	0.002	0.000

S, sensibilidad; E especificidad; ns, no significativo (p>0.05)

* Recoge valores de *p* estimados en los test de Kaplan Meier para cada grupo y parámetro.

2.4 ESTUDIO COMBINADO DE PARÁMETROS DE MO ESTIMADOS POR CMF CON MAYOR UTILIDAD EN DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

En este apartado se explora la utilidad de la combinación de parámetros evaluados en MO por CMF que individualmente mostraron capacidad para diferenciar las gammopatías benignas (MGUS) de las malignas (Mieloma y SMM) y que tuvieron capacidad predictiva sobre la progresión de la enfermedad y la SG. Para ello, se realizó un análisis de regresión logística binaria multivariable con el que se evaluó la capacidad diagnóstica combinada de la “frecuencia de CPs” y de la “ratio P/A de las CPs” (Tabla 41).

Este análisis permitió estimar por una parte, la probabilidad de que la combinación de dichas variables pudiera resultar de valor pronóstico en la

diferenciación de MGUS y mieloma (SMM+MM). Para ello, se construyó una curva ROC (área bajo la curva de 0.885) capaz de estimar la sensibilidad y la especificidad (Figura 50). El resultado obtenido mostró que la combinación de estos dos parámetros de evaluación rápida y económica en MO mediante CMF, ofrecía con una elevada sensibilidad (82.8%) y especificidad (83.5%) para diferenciar MGUS de Mieloma (SMM+MM).

Tabla 41. Regresión logística binaria multivariable para calcular la probabilidad pronóstica de la combinación de variables de la citometría de MO útiles para diferenciar MGUS de Mieloma.

Variable dependiente	Co-variables	OR	95%CI	p
Grupo de patología (Mieloma vs. MGUS)	% CPs en Médula ósea	2,169	1,414-3.328	0,000
	Ratio proliferación/apoptosis de CPs	3,922	1,493-10.298	0,006
	Constante	0,094	-	0,000

OR, odd ratio; 95%CI, 95% de intervalo de confianza.

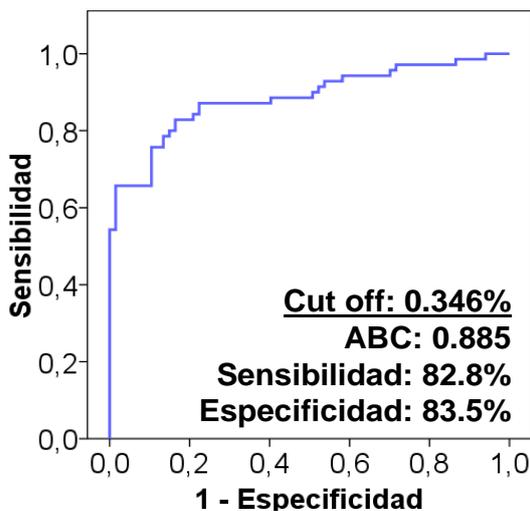


Figura 50. Curva ROC para establecer la sensibilidad y la especificidad para diferenciar MGUS de Mieloma (SMM+MM). Se usa la combinación de los valores de CPs en MO y de la ratio proliferación/apoptosis de CPs.

Además, la combinación de estos dos parámetros sirvió para establecer un **modelo de estimación de riesgo** tanto, para la progresión de la enfermedad como para la SG de los pacientes con gammapatías en general y de los mielomas en particular (Figura 51).

Al comparar nuestro modelo con la estimación de riesgo establecida por el IMWG en 2014 y que diferencia tres grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) en función de la edad, el ISS y la citogenética, se observó que el modelo aquí propuesto

puede identificar igualmente 3 grupos de riesgo: bajo (CPs en MO<1.78%), intermedio (CPs en MO>1.78% y Ratio P/A<1.77) y alto (CPs en MO>1.78% y Ratio P/A>1.77).

Las diferencias observadas en el análisis de Kaplan-Meier y la estimación Log-Rank, fueron aún mucho más significativas en este modelo que en el propuesto por el IMWG en 2014. Así para todas las gammapatías ($p=2 \times 10^{-12}$ vs. $P=7 \times 10^{-10}$ en progresión y $p=7 \times 10^{-16}$ vs. $P=7 \times 10^{-4}$ en SG), mielomas SMM+MM ($p=0.002$ vs. $P=0.002$ en progresión y $p=5 \times 10^{-4}$ vs. $P=0.021$ en SG) y MM ($p=0.22$ vs. $P=0.05$ en progresión y $p=0.003$ vs. $P=0.157$ en SG).

Tabla 42. Estimación del riesgo de progresión y SG según el modelo propuesto basado en parámetros de MO evaluados por citometría de flujo y el propuesto por el IMWG.

Riesgo	Progresión de la enfermedad (%)				Supervivencia global (%)			
	Modelo propuesto		IMWG-2014		Modelo propuesto		IMWG-2014	
<u>Total pacientes</u>	n	%	n	%	n	%	n	%
Bajo	n=77	6.6%	n=28	10.7%	n=77	98.7%	n=28	100%
Intermedio	n=40	42.5%	n=130	25.8%	n=40	82.5%	n=130	85.2%
Alto	n=21	66.7%	n=3	62.5%	n=21	33.3%	n=3	50.0%
Pearson (χ^2)	$p=4.7 \times 10^{-9}$		$p=0.011$		$p=4.6 \times 10^{-12}$		$p=0.002$	
<u>SMM+MM</u>	Modelo propuesto		IMWG-2014		Modelo propuesto		IMWG-2014	
Bajo	n=17	23.5%	n=10	30.0%	n=17	94.1%	n=10	100%
Intermedio	n=32	53.1%	n=61	49.2%	n=32	78.1%	n=61	68.9%
Alto	n=21	66.7%	n=7	71.4%	n=21	33.3%	n=7	42.9%
Pearson (χ^2)	$p=0.027$		$p=0.24$		$p=9.1 \times 10^{-5}$		$p=0.033$	
<u>MM</u>	Modelo propuesto		IMWG-2014		Modelo propuesto		IMWG-2014	
Bajo	n=7	42.9%	n=4	50.0%	n=7	85.7%	n=4	100%
Intermedio	n=23	65.2%	n=45	60.0%	n=23	78.3%	n=45	62.6%
Alto	n=18	66.7%	n=4	75.0%	n=18	33.3%	n=4	50.0%
Pearson (χ^2)	$p=0.507$		$p=0.76$		$p=0.005$		$p=0.265$	

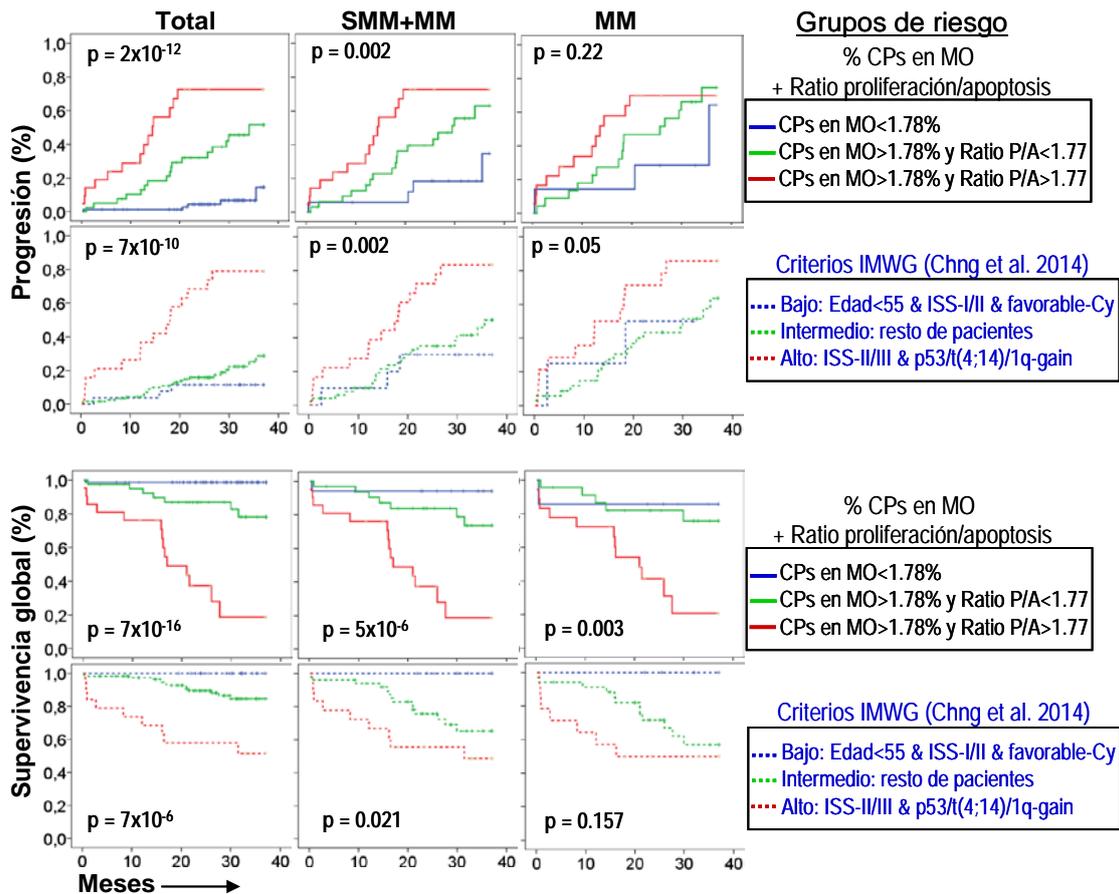


Figura 51. Comparación del modelo propuesto de estimación del riesgo con parámetros de MO evaluados mediante citometría de flujo y el modelo propuesto por el IMWG en 2014. Análisis de Kaplan Meier de progresión de la enfermedad (arriba) y SG (debajo) para nuestro modelo de estimación del riesgo, bajo (CPs en MO>1.78%, línea azul continua), intermedio (CPs en MO>1.78% y Ratio proliferación/apoptosis=1.77, línea verde continua) y alto (CPs en MO>1.78% y Ratio proliferación/apoptosis>1.77, línea roja continua), comparado con el modelo del IMWG 2014, bajo (Edad=55 & ISS-I/II & citogenética favorable, línea azul discontinua), alto (ISS-II/III & p53/t(4;14)/1q-gain, línea roja discontinua) e intermedio (resto de pacientes, línea verde discontinua). La significación estadística (Log Rank) se refleja en cada gráfica (Chng et al., *Leukemia* 2014, 28 pg.273).

La Tabla 42 resume las tasas de progresión de la enfermedad y de SG a tres años del total de gammapatías, de los pacientes con mieloma (SMM+MM) y de los MM exclusivamente, tanto para modelo de estimación del riesgo aquí propuesto basado en parámetros de MO evaluados por citometría, como para el modelo propuesto por el IMWG en 2014. En la misma tabla se puede observar que ambos modelos fueron capaces de discriminar pacientes de riesgo bajo, intermedio y alto. No obstante, parece de interés destacar que modelo aquí propuesto, permite obtener resultados de predicción en un plazo no mayor a 2 horas y un coste mucho más reducido, y que las diferencias observadas son mucho más significativas cuando se comparan los grupos de riesgo. Además es igualmente destacable que comparado con el de IMWG, el

modelo de citometría que aquí se propone es capaz de identificar pacientes con tasas de supervivencia a tres años muy reducidas (33.3% vs. 50.0% en total de pacientes, 33.3% vs. 42.9% en SMM+MM y 33.3% vs. 50.0% en MM), en los que independientemente de la edad, se deberían concentrar los mayores esfuerzos terapéuticos tras el diagnóstico. Estos pacientes serían los que presentan cifras de CPs evaluadas por citometría de flujo mayores de 1.78% y un ratio proliferación apoptosis mayor de 1.77 (ver Figura 51).

Igualmente se investigó si el modelo propuesto de estimación del riesgo basado en parámetros de MO evaluados por citometría, en comparación con el modelo propuesto por el IMWG en 2014 basado en citogenética de alto riesgo, tenía valor pronóstico con independencia del tipo de tratamiento al que fueron sometidos los pacientes, y en particular si con las nuevas terapias basadas en Bortezomib la progresión y la SG eran igualmente predecibles. En la Figura 52 se puede observar que incluso con la aplicación de nuevas terapias, la SG de los pacientes con MM de alto riesgo según el modelo de citometría de MO fue significativamente mucho menor (35.7%, $p < 0.008$) con respecto a la de los grupo de medio (87.0%) y riesgo bajo (85.7%). Igualmente el modelo basado en citogenética fue capaz de diferenciar pacientes de alto (58.3%), medio (69.0%) y bajo (100%) riesgo, aunque en este caso las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p < 0.245$).

De manera similar, el modelo propuesto tuvo una gran capacidad predictiva tanto si los pacientes recibieron TASPE como parte del tratamiento (SG de 42.9%, 100% y 100%, respectivamente para alto, medio y bajo riesgo, $p < 0.044$) o no (SG de 20.0%, 61.5% y 80.0%, respectivamente para alto, medio y bajo riesgo, $p < 0.012$). El modelo basado en la citogenética, aunque era igualmente capaz de discriminar entre grupos de alto, intermedio y bajo riesgo, no alcanzó significación estadística ni en los pacientes que recibieron TASPE (SG de 57.1%, 90.0% y 100%, respectivamente, $p < 0.153$) ni en los que no recibieron dicho tratamiento (SG de 42.9%, 52.2% y 100%, respectivamente, $p < 0.522$). Sin embargo, al tener en cuenta la edad este modelo era capaz de discriminar pacientes jóvenes que a tres años tenían supervivencias del 100% y por tanto con muy bajo riesgo.

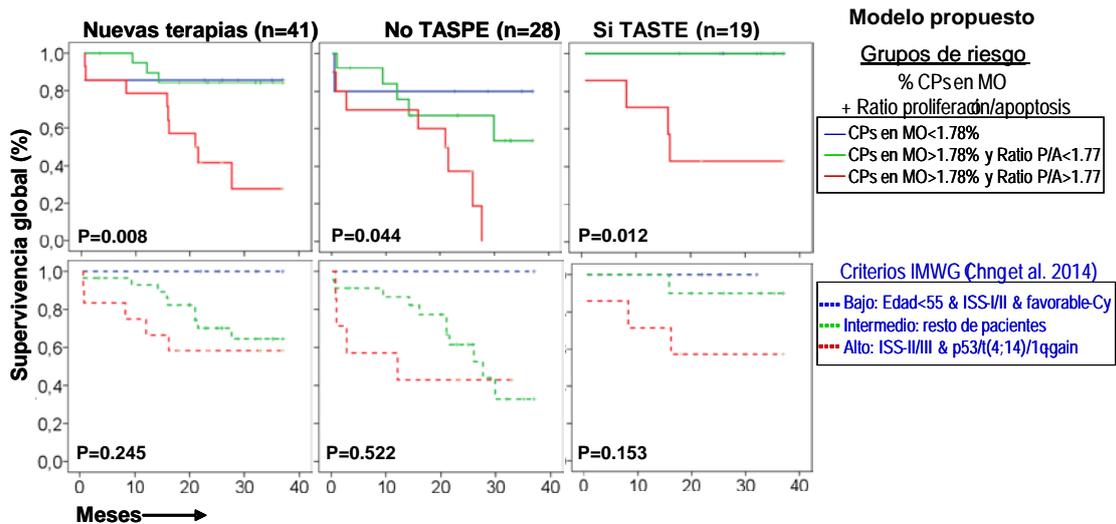


Figura 52. Comparación del modelo propuesto de estimación del riesgo con parámetros de MO evaluados mediante citometría de flujo y el modelo propuesto por el IMWG en 2014 considerando el tipo de tratamiento aplicado a los pacientes con MM. Los datos del análisis de Kaplan Meier de SG para el modelo propuesto de estimación del riesgo (arriba), bajo (CPs en MO>1.78%, línea azul continua), intermedio (CPs en MO>1.78% y Ratio P/A≤1.77, línea verde continua) y alto (CPs en MO>1.78% y Ratio P/A>1.77, línea roja continua). Modelo del IMWG-2014 (debajo), bajo (Edad=55 & ISS-I/II & citogenética favorable, línea azul discontinua), alto (ISS-II/III & p53/t(4;14)/ganancia1q, línea roja discontinua) e intermedio (resto de pacientes, línea verde discontinua). La significación estadística (Log Rank) se refleja en cada gráfica. (Chng et al., Leukemia 2014, 28 pg. 273)

3 UTILIDAD DE LOS ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN GAMMPATIÁS

Las alteraciones citogenéticas son muy frecuentes en el mieloma y claves en el pronóstico, por lo que se considera un estudio obligado en pacientes con discrasias de células plasmáticas. El principal obstáculo de la citogenética convencional (CC) es el bajo índice proliferativo de la célula plasmática y la baja infiltración de las células tumorales en médula ósea. El estudio por técnicas de FISH solventa en buena medida estos problemas, aunque presenta la limitación de que estudia únicamente las alteraciones que corresponden a la sonda aplicada, o sea, no permiten conocer todo el contexto de alteraciones genéticas. Por ello, la CC y la técnica de FISH se consideran técnicas complementarias.

3.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL (CARIOTIPO)

El estudio de citogenética convencional se pudo realizar en 91 de los 164 pacientes (55,5%). De ellos, el cariotipo fue normal en el 85,7% de pacientes, patológico en el 9,9% y en un 4,4% no se obtuvieron metafases. El tipo de alteraciones queda recogido en la Tabla 43. En cuanto a la distribución por patologías, tal como muestra en la Figura 54, en los tres grupos se pudieron detectar alteraciones en torno al 10% de los pacientes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sobre la incidencia de alteración del cariotipo.

Tabla 43. Alteraciones detectas por citogenética convencional por grupos			
	MGUS	SMM	MM
Alteraciones estructurales	der 14(1;14) der (13;14)	del Y del13q	del Y, inv 12, del13q
Alteraciones numéricas	+5	+8	+3,+6,add(6),+7,+9,+15,+19

der: cromosoma derivado, del: delección, inv: inversión, +: ganancia de cromosoma completo, add: material adicional de origen desconocido

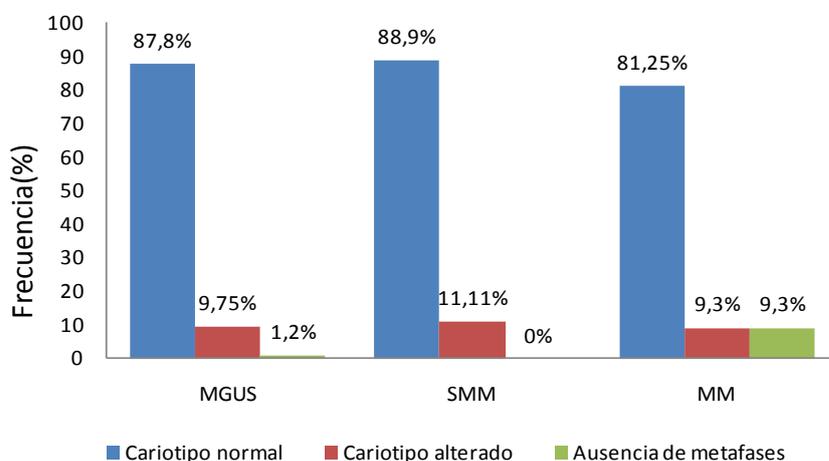


Figura 54. Alteraciones descritas por citogenética convencional (cariotipo). Las barras azules corresponden a pacientes sin alteración, las rojas a pacientes que mostraron algún tipo de alteración y las verdes a pacientes en los que no se pudo determinar el cariotipo por ausencia de metafases.

Debido al reducido número de pacientes en los que se describieron alteraciones citogenéticas en el cariotipo, no se ha realizado un estudio de su incidencia en la progresión y supervivencia.

3.2 FISH EN CELULA PLASMÁTICA PURIFICADA

Para completar este análisis se obtuvieron suficientes células plasmáticas purificadas en 145 de los 164 pacientes (88.41%) y los resultados obtenidos para cada uno de los grupos de estudio se resumen en la Tabla 44. Es importante precisar que la ganancia de 1q se analizó de forma retrospectiva, ya que cuando se inició este estudio no se disponía de dicha determinación y que su estudio se llevó a cabo solamente en pacientes con MM y SMM en los que se disponía de material suficiente.

Mediante esta técnica, se pudo detectar al menos una de las alteraciones cromosómicas analizadas por FISH en el 43.1% de los pacientes, siendo más frecuentes en los pacientes con MM (71,4%) que en los de SMM (61,9%) y los de MGUS (19,7%). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas cuando se compararon MGUS y SMM así como MGUS y MM ($p < 0.001$, en todos los casos).

Tabla 44. Frecuencia y tipos de anomalías citogenéticas detectadas por FISH

Alteración	Total n (%)	MGUS n (%)	SMM n (%)	MM n (%)
Cualquier alteración ^a	63/146 (43,1%)	15/76(19,7%)	13/21(61,9%)	35/49(71,4%)
Ganancia 1q ^b	14/47 (29,8%)	nd	1/15(6,7%)	13/32(40,6%)
Aneuploidía 5, 9, 13, 15, 14 o 17 ^c	39/138(28,3%)	11/72(15,3%)	6/20(30%)	22/46(47,8%)
Deleción 13q ^d	17/144(11,8%)	3/73(4,1%)	2/22(9,1%)	12/49(24,5%)
Rotura IGH ^{e*}	15/145(10,3%)	2/76(2,6%)	4/22(18,2%)	9/47(19,1%)
Deleción p53	7/148(4,7%)	1/76(1,3%)	2/22(9,1%)	4/50(8%)

Aneuploidía, se definió como alteraciones en el número de cromosomas por pérdida o ganancia de los cromosomas 5, 9, 13, 15, 14 o 17.

nd, no datos

^a, MGUS vs SMM; OR=6.6 $p < 0.001$; MGUS vs MM; OR=9.9 $p < 0.001$.

^b, SMM vs MM; OR=9.57 $p = 0.018$

^c, MGUS vs MM; OR=5.0 $p < 0.001$.

^d, MGUS vs MM; OR=7.5 $p = 0.001$.

^e, MGUS vs MM; OR= 8.7 $p = 0.003$, MGUS vs SMM; OR=8.22 $p = 0.022$.

* Rotura de IGH: 3 casos t(11;14); 2 casos t(14;16); 3 casos t(4;14) y 7 casos con rotura sin definir.

Tal y como puede verificarse en la Tabla 48, entre estas alteraciones, y teniendo en cuenta el total de las determinaciones realizadas, la ganancia de 1q fue la más frecuente (29,8%), aunque hay que advertir que su análisis solo se realizó en los grupos de SMM y MM. La aneuploidía fue la segunda alteración en frecuencia (28,3%),

seguida por la delección de 13q (11,8%) y la rotura de IGH (10,3%). La delección de p53 fue la que presentó menor frecuencia (4,7%).

Por grupos de patología, la aneuploidía fue la alteración más frecuente en MGUS y SMM (15.3% y 30%, respectivamente), mientras que en MM, las alteraciones más frecuentes fueron la aneuploidía (47.8%) y la ganancia de 1q (40.6%).

De modo general, al analizar la frecuencia de las diferentes anomalías cromosómicas respecto al tipo de gammapatía monoclonal, se encontró que la aneuploidía, la delección de 13q, la rotura de IGH y la delección de p53 fueron significativamente menos frecuentes en MGUS (15.3%, 4.1%, 2.6%, 1.3%, respectivamente) que en SMM (30%, 9.1%, 18.2%, 9.1%, respectivamente) y en MM (47.8%, 24.5%, 19.1% y 8%, respectivamente). Estas alteraciones tenían frecuencias similares en SMM y MM, a excepción de del(13q) que estaba más representada en MM que en SMM (24,5% vs. 9,1%, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística). La frecuencia de las ganancias de 1q fue significativamente menor en SMM (6.7%) que en MM (40.6%) En la Tabla 49 se exponen con detalle las diferencias significativas encontradas en la distribución de las alteraciones citogenéticas entre los diferentes grupos de estudio.

3.2.1 IMPACTO DE LAS ALTERACIONES DETECTADAS POR FISH EN LA MASA TUMORAL Y LOS ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS.

En este apartado se explora la relación existente entre las alteraciones citogenéticas detectadas por FISH y la masa tumoral, así como con los índices de proliferación y apoptosis del tumor.

Los pacientes sin alteraciones citogenéticas detectadas por FISH presentaron las cifras más reducidas de **CPs en MO por histología** (8.89%) (Figura 53 A), ya que principalmente correspondían al grupo MGUS (72%). Los pacientes con aneuploidías, presentaban cifras de CPs ligeramente más elevadas aunque significativamente superiores que los que no tenían (16.36%, $p < 0.01$). Aquellos con rotura IGH (33.8%), delección 13q (31.1%), ganancia de 1q (30.58%) y delección p53 (29.57%) presentaron cifras de CPs mucho más elevadas que los que no presentaban alteración, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0.001$).

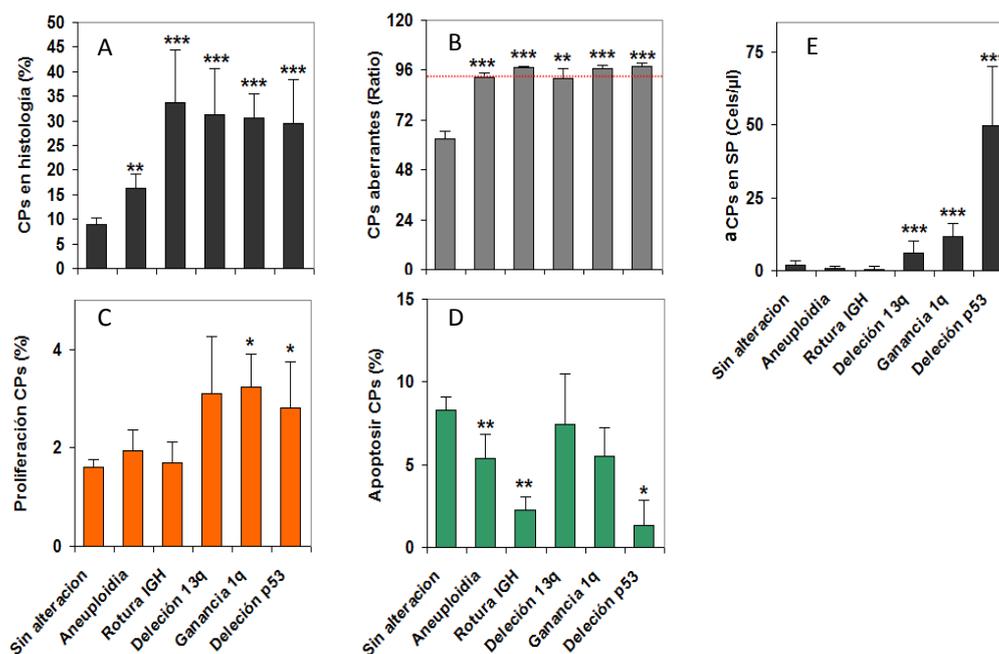


Figura 53. Relación entre las alteraciones citogenéticas con la masa tumoral y los índices de proliferación y apoptosis del tumor. Los datos representan media±SEM para el porcentaje de CPs en MO (A), la ratio aCP/BMPC (B), índices de proliferación (C) y apoptosis (D) y cifras absolutas de aCPs en SP (E) de los pacientes clasificados teniendo en cuenta la anomalía citogenética de mayor impacto según el siguiente esquema de clasificación p53 > 1q > 13q > IGH > Aneuploidía > Sin alteración. *, p<0.05, **, p<0.01 y ***, p<0.001, en el análisis post-hoc DMS del ANOVA.

La **relación de aCPs/BMPC** menos elevada la presentaban los pacientes sin alteraciones citogenéticas (62.9%), mientras los valores en el resto de grupos oscilaron entre el 92.01% de pacientes con delección de 13q y el 97.95% de los pacientes con delección de p53 (Figura 53 B). En cualquier caso, todas las alteraciones citogenéticas inducían a ratios de aCP significativamente más elevadas (p<0.001, en todos los casos).

El **índice de proliferación de las CPs**(Figura 53 C) también se mantuvo en niveles reducidos en los pacientes sin alteraciones citogenéticas (1.6%), con aneuploidía (1.93%) o con rotura de IGH (1.68%). Sin embargo, en los pacientes con delección 13q (3.09%), ganancia de 1q (3.24%) y delección de p53 (2.81%) el IP-CP estaba significativamente más elevado que en aquellos que no presentaban alteración citogenética (p<0.05), excepto en pacientes con delección 13q, donde quizás la menor frecuencia de esta anomalía limitó la significación estadística.

Al analizar el **índice de apoptosis de las CPs**(Figura 53D) se encontró que en comparación con el grupo sin alteraciones (8.29%), pacientes con aneuploidías (5.4%, p<0.01), rotura de IgH (2.23%, p<0.01) y delección de p53 (1.29%, p<0.05) presentaban tasas de apoptosis mucho más reducidas.

Por último, las **cifras de CPs en SP** (Figura 53 E) se mantuvieron en niveles reducidos en los pacientes sin alteraciones (2.0 ± 1.29), con aneuploidía (0.89 ± 0.45) y con rotura de IGH (0.27 ± 0.1). Sin embargo, los pacientes con delección 13q (6.04 ± 4.1), ganancia de 1q (11.64 ± 4.70) y delección de p53 (49.77 ± 32.2) mostraron cifras significativamente más elevadas que los que no presentaban alteración ($p < 0.001$, en todos los casos).

De su **análisis conjunto**, cabe destacar que todas las alteraciones excepto la aneuploidía, se presentan con cifras de infiltración de CPs en MO elevadas, pero mientras en los pacientes con rotura de IGH aparentemente se debía a la baja tasa de apoptosis de las células tumorales, en el resto de las alteraciones parecía deberse a tasas proliferativas elevadas. Llama la atención que los pacientes con delección de p53, con las peores tasas de progresión y supervivencia, muestran una elevada proliferación asociada a tasas súper-reducidas de apoptosis tumoral.

Mediante análisis de regresión de Cox se exploró la relación de la masa tumoral en el momento del diagnóstico (% de CPs en la histología), la tasa de crecimiento neto del tumor (ratio proliferación/apoptosis) y las alteraciones citogenéticas principales en cada paciente, con la progresión de la enfermedad y la SG del total de pacientes (Tabla 45). Las tres variables parecían impactar de forma negativa e independiente en la progresión de la enfermedad, aunque la ratio proliferación/apoptosis se quedó muy próximo a la significación estadística ($p = 0.053$). Sin embargo, la masa tumoral al diagnóstico no parecía impactar en la supervivencia de los pacientes ($p = 0.663$), pero sí lo hicieron de forma independiente, la ratio P/A y las alteraciones citogenéticas principales. Por tanto, todo parece indicar que las alteraciones citogenéticas son lo que en último término estarían gobernando el crecimiento neto del tumor, incidiendo en la modulación de una tasa proliferativa y apoptótica característica para cada tipo de alteración citogenética, y con ello la progresión y sobretodo la SG de los pacientes.

Tabla 45. Regresión de Cox para progresión y supervivencia del total de pacientes y relación el masa tumoral al diagnóstico, la ratio P/A y las alteraciones citogenéticas principales en cada paciente al diagnóstico.

Variable dependiente	Co-variables	OR	95%CI	p
Progresión	% PCs en histología	1,018	1,002-1.035	0,031
	Ratio Prolif/Apop de CPs	1,075	0,999-1.157	0,053
	Tipo de alteración FISH	1,480	1,197-1.829	0,000
	Co-variables			
Supervivencia global	% PCs en histología	1,006	0,981-1.063	0,663
	Ratio Prolif/Apop de CPs	1,142	1,052-1.241	0,002
	Tipo de alteración FISH	1,457	1,114-1.906	0,006

OR, odd ratio; 95%CI, 95% intervalo de confianza.

3.2.2 IMPACTO DE LAS ALTERACIONES DETECTADAS POR FISH EN CÉLULA PLASMÁTICA PURIFICADA EN LA PROGRESIÓN Y EN LA SUPERVIVENCIA.

Para evaluar la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes en relación con las distintas anomalías detectadas por FISH, se aplicó en primer lugar un análisis comparativo mediante Tablas 2x2 en los distintos grupos de pacientes. Debido a la baja frecuencia observada para la rotura de IGH, esta anomalía no se incluyó en la evaluación de su impacto sobre progresión y supervivencia, pues no se podían separar las roturas consideradas de buen pronóstico (BCL-1) de las de peor pronóstico (MAF y FGFR3). Tampoco se pudo analizar la supervivencia en el grupo de pacientes diagnosticados de MGUS dado que durante el periodo de seguimiento no falleció ningún paciente de este grupo.

3.2.2.1 PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

Según los datos recogidos en la Tabla 46, de forma genérica, se observó que los pacientes en los que se detectó **alguna alteración** mediante FISH experimentaban mayor progresión de la enfermedad que los que no tenían alteraciones citogenéticas (44,4% vs. 10,8%, OR=6.57, p<0,001). Al analizar cada uno de los grupos de pacientes, se verificó que en MGUS ninguno de los 15 pacientes con anomalías experimentó progresión de la enfermedad, aunque en contra de lo esperado si lo hicieron 3 de los 61 pacientes que no tuvieron alteraciones (0% vs. 4,9%, p>0.05). Por el contrario, en el grupo SMM, los pacientes con alguna alteración detectada mediante FISH

experimentaban una progresión de la enfermedad superior que los que no tenían dichas alteraciones citogenéticas (30.8% vs. 12.5%), aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Sin embargo al comparar presencia frente ausencia de alteraciones citogenéticas, la progresión de la enfermedad fue significativamente superior en los grupos MM (68.6% vs. 35.7%, OR= 3.92 p=0.035) y en el SMM+MM (58.3% vs. 27.3%, OR= 3.73, p=0.016).

Tabla 46. Impacto de las alteraciones detectadas por FISH en la progresión de la enfermedad

Grupo		Total pacientes	MGUS		SMM		MM		SMM+MM		
Alteración FISH (Si/No)											
Progresión:n (%)		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Cualquier alteración ^a	N	63	83	15	61	13	8	35	14	48	22
	n	28	9	0	3	4	1	24	5	28	6
	(%)	(44,4%)	(10,8%)	(0%)	(4,9%)	(30,8%)	(12,5%)	(68,6%)	(35,7%)	(58,3%)	(27,3%)
Aneuploidía ^b	N	39	99	11	61	6	14	22	24	28	38
	n	19	15	0	3	2	3	17	9	19	12
	(%)	(48,7%)	(15,1%)	(0%)	(4,9%)	(33,3%)	(21,4%)	(77,2%)	(37,5%)	(67,8%)	(31,5%)
Delección 13q ^c	N	17	127	3	70	2	20	12	37	14	57
	n	9	27	0	3	0	5	9	19	9	24
	(%)	(52,9%)	(21,2%)	(0%)	(4,3%)	(0%)	(25%)	(75%)	(51,3%)	(64,3%)	(42,1%)
Ganancia 1q ^d	N	----	----	----	----	1	14	13	19	14	33
	n	----	----	----	----	1	5	11	9	12	14
	(%)	----	----	----	----	(100%)	(35,7%)	(84,6%)	(47,4%)	(85,7%)	(42,4%)
Delección p53 ^e	N	7	141	1	75	2	20	4	46	6	66
	n	4	33	0	3	1	4	3	26	4	30
	(%)	(57,1%)	(23,4%)	(0%)	(4%)	(50%)	(20%)	(75%)	(56,5%)	(66,7%)	(45,4%)

N, total pacientes de cada grupo; n, número de pacientes con/sin alteración; %, de pacientes referidos a N

^aCon vs sin cualquier alteración: Total pacientes, OR=6.57, p<0.001; MM, OR=3,92, p=0.035; SMM+MM, OR=3.73, p=0.016

^bAneuploidía vs no aneuploidía: Total pacientes, OR=5.32, p<0.001; MM,OR=5.66, p=0.007; SMM+MM, OR=4.57, p=0.004

^cDelección vs no delección de 13q: Total pacientes, OR=4.16, p=0.005

^dGanancia vs no ganancia de 1q: MM, OR=6.11, p=0.033; SMM+MM, OR=8.14, p=0.006

^eDelección vs no delección p53: Totalpacientes,OR=4.36, p=0.044

El análisis de la **aneuploidía** en el total de pacientes, sugería que esta alteración tenía un impacto sobre la progresión de la enfermedad, de manera que la dicha progresión fue significativamente superior en los pacientes con aneuploidía que en los que no se detectaron alteraciones numéricas en los cromosomas 5, 9, 13, 15, 14 o 17 (44.4% vs. 10.8%, OR=5.32, p<0.001). Sin embargo, la consideración independiente de cada patología, mostró que en los grupos MGUS y SMM la presencia de aneuploidía no afectaba a la progresión de la enfermedad, pero sí a los pacientes

con MM en los que la presencia de esta conllevaba una progresión significativamente más elevada (77,2% vs. 37,5%, OR=5.66 p=0.007) e, igualmente, ocurría en el grupo de SMM+MM (67,8% vs. 31,5%, OR=4.57 p=0.004).

La **ganancia del 1q** incidió en la progresión de la enfermedad tanto en pacientes con SMM (100% vs. 35,7%, no significativo) como con MM (84.6% vs. 47.4%, OR=6.1 p=0.033) o conjuntamente SMM+MM (85.7% vs. 42.4%, OR=8.14 p=0.006), ya que cuando dicha alteración estuvo presente en la progresión fue significativamente mayor (Tabla 46).

Por último, tanto la **delección 13q** como la **delección p53**, se asociaron una tasa de progresión superior solamente al analizar el total de pacientes (52.9% vs. 21.3%, OR=4.16, p=0.005 y 57.1% vs. 23.4%, OR=4.36, p=0.044, respectivamente). Cuando los grupos de pacientes se analizaron por separado, el impacto de dichas alteraciones sobre la progresión de la enfermedad se mantenía en la mayoría de los casos, sin embargo, dada la menor frecuencia de estas alteraciones, y en particular la de p53, las diferencias no alcanzaron significación estadística en ningún caso (Tabla 46).

Los estudios de las tasas de progresión se complementaron mediante la aplicación de un análisis de Kaplan Meier. Este segundo análisis, permitió elaborar curvas de progresión hasta los 36 meses de seguimiento y comparar dichas curvas en pacientes presencia o ausencia de cada uno de los tipos de alteraciones estudiadas por FISH (Figura 55):

- a. **Aneuploidía:** al considerar el total de pacientes, el análisis de Kaplan Meier igualmente ofreció curvas de progresión significativamente más elevadas a tres años en los pacientes con aneuploidía que en los pacientes sin esta alteración numérica en el FISH (53% vs. 18%, p<0.001 a 36 meses), asociación que se reprodujo tanto en los pacientes con MM (81% vs 42%, p=0.006) como en el conjunto de SMM+MM (72% vs 35%, p=0.001).
- b. **Ganancia de 1q:** igualmente la tasa de progresión fue superior en los pacientes de MM (86% vs 52%, p=0.016) y SMM+MM (87% vs 45%, p= 0.002) que eran portadores de este tipo de alteración.
- c. **Delecciones de 13q y p53:** para ambas alteraciones al considerar el total de pacientes, se observó según los resultados del análisis de Kaplan Meier, un impacto negativo en la progresión, de manera que progresaron

significativamente más los pacientes con del 13q y p53 que los que no las presentaban (55% vs. 25%, $p=0.007$ y 57% vs. 28%, $p=0.037$ respectivamente). Sin embargo, en el estudio por separado de cada uno de los grupos de pacientes, estas no alcanzaron significación estadística.

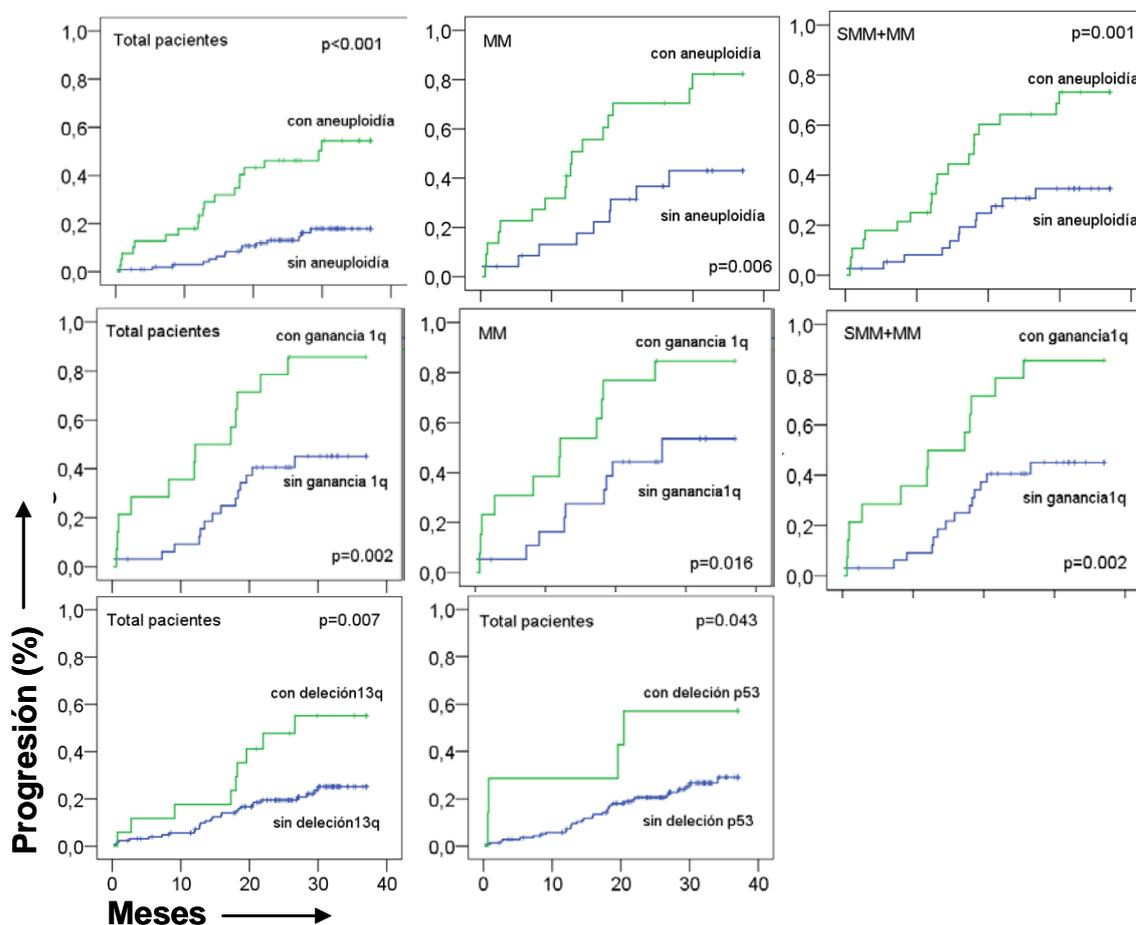


Figura 55. Impacto de las alteraciones citogenéticas en la progresión de la enfermedad de los distintos grupos de pacientes. Las siguientes figuras describen la progresión mediante el método de Kaplan Meier de la enfermedad a 36 meses en pacientes con cada alteración (líneas verdes) y en pacientes sin alteración (líneas azules). Se muestran curvas para el análisis relativo a aneuploidía, ganancia 1q, delección de 13q y delección p53. Se muestran las gráficas en las que las diferencias alcanzaron valores estadísticamente significativos.

3.2.2.2 SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES

La supervivencia de los pacientes con MGUS a los 3 años fue del 100% con independencia de las alteraciones citogenéticas que presentaron.

La presencia de **algún tipo de alteración** en el FISH (Tabla 47 y Figura 56) redujo la SG del total de pacientes del 96.4% al 71,5% ($OR=10.66$ $p < 0.001$), mientras en los grupos de pacientes con SMM, MM o SMM+MM la presencia de alteraciones

citogenéticas reducía la supervivencia, aunque no se llegó a alcanzar significación estadística en ningún caso.

La presencia de **aneuploidía** en el total de pacientes se asoció con tasas de supervivencia del 66.7% frente al 92.9% en ausencia de la misma (OR=6,57 p<0.001). Esta diferencia venía principalmente influida por el efecto de los pacientes con MM donde la supervivencia observada fue menor (45,5% vs 79,2%, OR=4.56 p=0.018). En los pacientes con SMM la supervivencia en presencia o ausencia de alteraciones citogenéticas no varió sensiblemente (83.3% vs. 85.7%).

Tanto la **delección de 13q** en el total de pacientes (70.6% vs. 87.4%), como la **ganancia de 1q** en los pacientes con mieloma SMM+MM (50% vs. 69.7%), llevaron a supervivencia más reducida. Sin embargo, en ningún caso y para ningún grupo de pacientes las diferencias observadas alcanzaron significación estadística.

Tabla 47. Impacto de las alteraciones detectadas por FISH en la supervivencia

Grupo		Total pacientes	MGUS		SMM		MM		SMM+MM		
Alteración FISH (Si/No)											
SG: n (%)		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Cualquier alteración ^a	N	63	83	15	61	13	8	35	14	48	22
	n (%)	45 (71,5%)	80 (96,4%)	15 (100%)	61 (100%)	10 (76,9%)	8 (100%)	20 (57,1%)	11 (78,6%)	30 (62,5%)	19 (86,4%)
Aneuploidía ^b	T	39	99	11	61	6	14	22	24	28	38
	n (%)	26 (66,7%)	92 (92,9%)	11 (100%)	61 (100%)	5 (83,3%)	12 (85,7%)	10 (45,5%)	19 (79,2%)	15 (53,7%)	31 (81,5%)
Delección 13q	N	17	127	3	70	2	20	12	37	14	57
	n (%)	12 (70,6%)	111 (87,4%)	3 (100%)	70 (100%)	2 (100%)	17 (85%)	7 (58,3%)	24 (64,9%)	9 (64,3%)	41 (71,9%)
Ganancia 1q	N	-----	-----	-----	-----	1	14	13	19	14	33
	n (%)	-----	-----	-----	-----	1 (100%)	10 (71,4%)	6 (46,1%)	13 (68,4%)	7 (50%)	23 (69,7%)
Delección p53 ^c	N	7	141	1	75	2	20	4	46	6	66
	n (%)	3 (42,8%)	124 (87,9%)	1 (100%)	75 (100%)	1 (50%)	18 (90%)	1 (25%)	31 (67,3%)	2 (33,3%)	49 (74,2%)

N, total pacientes de cada grupo; n, número de pacientes vivos con/sin alteración; %, de pacientes referidos a N

^a Con vs sin cualquier alteración: Total pacientes, OR=10.66, p<0.001; SMM+MM, OR=3.80, p=0.043

^b Aneuploidía vs no aneuploidía: Total pacientes, OR=6,57, p<0.001; MM, OR=4.56, p=0.018; SMM+MM, OR=3.83, p=0.014

^c Delección vs no delección p53: Total pacientes, OR=9.72, p=0.001; SMM+MM, OR=5.76, p=0.035

La **delección de p53** produjo un fuerte impacto negativo en la SG tanto en el total de pacientes que la portaban (42,8% vs. 87,9%, OR=9.72 p=0.001), como en cada uno de los grupos de estudio. No obstante, los grupos SMM (50% vs. 90%) y MM

(25.0% vs. 67.3%) analizados por separado, la diferencia entre portadores y no portadores de la delección p53 no alcanzó significación estadística, quizás por la baja frecuencia detectada para dicha alteración. Sin embargo, al considerar conjuntamente los pacientes SMM+MM, la delección de p53 redujo la supervivencia al 33.3%, mientras alcanzó el 74,4% en ausencia de esta alteración (OR=5.76, p=0.035). Por tanto, el estudio de la delección de p53 sí resultó útil para predecir la supervivencia, ya que su presencia redujo profundamente la sobrevida del paciente (Tabla 47)

La SG también se evaluó mediante el test de Kaplan Meier y Log Rank. Esto permitió comparar las curvas de SG a 36 meses para las alteraciones citogenética que indujeron las diferencias más importantes (Figura 56). Así, la presencia de **aneuploidía** reducía la supervivencia tanto en el total de pacientes (p<0.001), como en los pacientes con MM (p<0.014) o los agrupados como SMM+MM (p<0.006). La **ganancia de 1q** conducía igualmente a supervivencias más reducidas, pero para esta alteración, las diferencias en ningún caso alcanzaron significación estadística. A pesar de la baja frecuencia de la **delección de p53**, cuando estaba presente, conducía a supervivencias muy reducidas y mostró diferencias significativas, tanto en el total de pacientes (p<0.001) como en los mielomas considerados conjuntamente SMM+MM (p<0.037), pero quedaron solo próximas a la significación en el grupo de pacientes con MM (p=0.053).

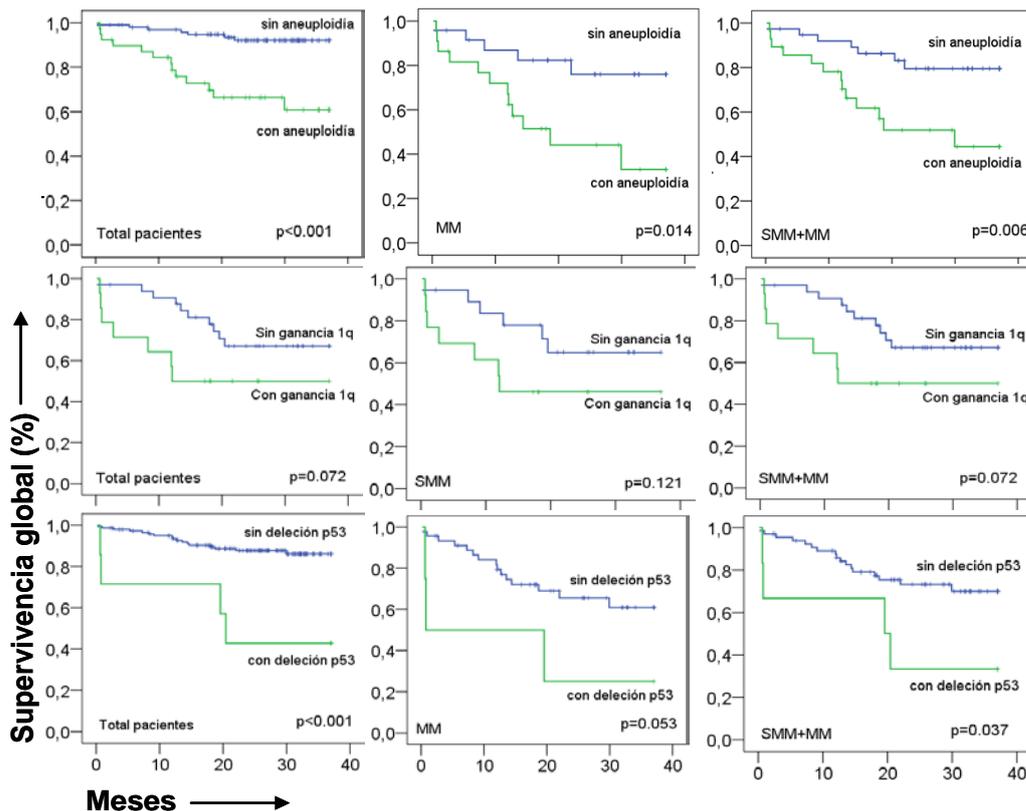


Figura 56. Impacto de las alteraciones citogenéticas en la supervivencia global en los distintos grupos de pacientes. Se representan curvas obtenidas mediante análisis de Kaplan Meier para los distintos grupos de enfermedad según presencia (líneas verdes) o ausencia (líneas azules) de cada alteración, aneuploidía, ganancia 1q y delección p53. Se muestran solo las gráficas en las que las diferencias alcanzaron valores estadísticamente significativos, o muy próximos a ellos.

3.2.2.3 ANÁLISIS MULTIVARIABLE DEL IMPACTO DE LAS ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LOS PACIENTES.

El análisis de regresión logística multivariable (Tabla 48) del total de pacientes, puso de manifiesto que tanto la aneuploidía (OR= 4.104, $p<0.000$), como la ganancia de 1q (OR= 0.847, $p<0.000$) o la delección de p53 (OR= 4.574, $p<0.017$) tenían valor pronóstico independiente sobre la **progresión** de la enfermedad, pero no ocurría así con la delección 13q.

Igualmente esta análisis mostró que tanto la aneuploidía (OR= 5.730, $p<0.001$), como la ganancia de 1q (OR= 0.8433 $p<0.002$) o la delección de p53 (OR= 7.630, $p<0.003$) tenían valor pronóstico independiente sobre la **SG**, pero tampoco en este caso influía la delección 13q.

Así pues, la aneuploidía y la delección de p53 aparentemente exponen a un riesgo incrementado de progresión de la enfermedad y de una menor supervivencia (ORs>1), mientras que paradójicamente la ganancia 1q parece proporcionar una evolución clínica más favorable protegiendo a los pacientes (ORs<1).

Tabla 48. Regresión de Cox para progresión y supervivencia del total de pacientes para las alteraciones citogenéticas estudiadas.

Variable dependiente	Co-variables	OR	95%CI	p
Progresión	Aneuploidía	4,104	2,012 – 8.37	0,000
	Ganancia 1q	0,847	0,779 – 0.92	0,000
	Delección 13q	2,156	0,958 – 4.85	0,063
	Delección p53	4,574	1,313 – 15.9	0,017
	Co-variables	OR	95%CI	p
Supervivencia global	Aneuploidía	5,730	2,100 – 15.6	0,001
	Ganancia 1q	0,833	0,741 – 0.93	0,002
	Delección 13q	1,491	0,483 – 4.60	0,487
	Delección p53	7,630	1,963 – 29.7	0,003

OR, odd ratio; 95%CI, 95% intervalo de confianza.

Esta paradoja podría ser debida a que dichas alteraciones no aparecen de forma aislada en cada paciente, si no en diversas combinaciones de cada una de ellas. En un intento de evaluar el riesgo real de cada una de estas alteraciones, los pacientes se clasificaron teniendo en cuenta la anomalía citogenética principal (de mayor impacto) según el siguiente esquema de clasificación p53 > 1q > 13q > IGH > Aneuploidía > Sin alteración (Kalyan N *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2015). Los resultados de esta clasificación para cada uno de los grupos de estudio se pueden ver en la Tabla 49. Entre ellos cabe destacar que en el grupo conjunto de mielomas (SMM+MM), la frecuencia ordenada de mayor a menor fue como sigue: Aneuploidía (71.7%), sin alteración (32.4%), Ganancia 1q (16.9%), Rotura IGH (12.7%), Delección p53 (8.5%) y Delección 13q (5.6%). La distribución en el resto de grupos clínicos se puede ver en la Tabla 49.

Tabla 49. Frecuencia de la anomalía citogenética principal detectadas por FISH

FISH	Total n (%)	MGUS n (%)	SMM n (%)	MM n (%)	SMM+MM n (%)
Aneuploidía	39 (28.3%)	11 (15.32%)	6 (30.0%)	22 (47.85%)	28 (71.79%)
Sin alteración	83 (56.5%)	60 (78.9%)	9 (40.9%)	14 (28.6%)	23 (32.4%)
Delección 13q	7 (4.80%)	3 (3.90%)	1 (4.50%)	3 (6.10%)	4 (5.6%)
Rotura IGH	11 (7.50%)	2 (2.60%)	4 (18.2%)	5 (10.2%)	9 (12.7%)
Ganancia 1q	---	---	1 (4.50%)	11 (22.4%)	12 (16.9%)
Delección p53	7 (4.80%)	1 (1.30%)	2 (9.10%)	4 (8.20%)	6 (8.5%)

Al comparar mediante análisis Kaplan Meier y Log Rank en el total de pacientes, las tasas de la progresión y SG observadas para las diferentes alteraciones citogenéticas con la observada en los pacientes sin alteración, se ponía en evidencia que todas las alteraciones citogenéticas impactaban de forma negativa y significativa tanto en la tasa de progresión como en la SG, excepto la rotura de IGH que no alcanzó significación estadística. Esto posiblemente venía influido por lo reducido de la muestra y a la heterogeneidad de los pacientes, ya que el grupo comprendían 3 tipos de roturas distintas t(11;14), t(4;14) y t(14;16) con pronóstico muy diferentes. No obstante, queremos destacar que de los 3 pacientes en que se encontró rotura de IGH y que progresaron, 2 presentan la translocación de mal pronóstico t(4;14) y de ellos, uno fue el único que murió. Para mayor detalle, en la Tabla 50 y Figura 57A se representan los datos de progresión y SG en curvas de Kaplan-Meier, así como el nivel de significación estadística en cada caso.

Este análisis se reprodujo para el conjunto de pacientes con Mieloma (SMM+MM) donde se pudo observar, que solo la **delección p53** tenía un impacto negativo claro y significativo en la progresión (21.7% vs. 66.7%, p=0.046) y en la SG (87.0% vs. 33.3%, p=0.018) comparado a los pacientes con mieloma sin alteraciones citogenéticas.

La **ganancia de 1q** comparada con los MM sin alteraciones citogenéticas, se asociaba a tasas de SG significativamente inferiores (87.0% vs. 58.3%, p=0.050) y a mayores tasas de progresión (21.7% vs. 83.3%) aunque en este caso no alcanzó significación estadística.

La **Aneuploidía**, la **deleción de 13q** y la **rotura de IGH** no tuvieron impacto significativo sobre la progresión ni sobre la SG en los pacientes con mieloma.

Además, para esclarecer el papel de la hiperdiploidía entre los cromosomas 5, 9, 13, 15, 14 o 17, se pudo verificar que de los 39 pacientes con aneuploidía, 20 presentaban hiperdiploidía como única alteración, 7 tenían monosomía, 6 compartían deleción 13q, 3 amplificación 1q, 2 deleción P53, y 1 rotura IGH. Según análisis de Kaplan-Meier (Figura 57B) para progresión y SG en pacientes con mieloma (SMM+MM) se constató que la hiperdiploidía (n=16) no parecía conferir ni riesgo ni protección en comparación con el resto pacientes (n=52).

Tabla 50. Progresión y SG en función de la anomalía citogenética principal

Alteración FISH* ¹	Total de pacientes		Mieloma (SMM+MM)	
	Progresión	SG	Progresión	SG
	Si / No (%)	Vivo/Muerto (%)	Si / No (%)	Vivo / Muerto (%)
Sin alteración* ²	8 / 75 (9.6%)	80 / 3 (96.4%)	5 / 18 (21.7%)	30 / 3 (87.0%)
Aneuploidía ^a	20/19 (51.3%)	26 / 13 (66.7%)	20 / 8 (71.4%)	15 / 13 (53.6%)
Deleción 13q ^b	2 / 5 (28.6%)	5 / 2 (71.4%)	2 / 2 (50.0%)	2 / 2 (50.0%)
Rotura IGH ^c	3 / 8 (27.3%)* ³	10 / 1 (90.9%)* ⁴	3 / 6 (33.3%)	8 / 1 (88.9%)
Ganancia 1q ^d	---	---	10 / 2 (83.3%)	7 / 5 (58.3%)
Deleción p53 ^e	4 / 3 (57.1%)	3 / 4 (42.9%)	4 / 2 (66.7%)	2 / 4 (33.3%)

*¹ Clasificación de pacientes teniendo en cuenta la anomalía citogenética principal (de mayor impacto) según el siguiente esquema de clasificación p53 > 1q > 13q > IGH > Aneuploidía > Sin alteración.

*² Se compara mediante análisis Kaplan Meier y Log Rank (Mantel-Cox) cada tipo de alteración respecto a la ausencia de alteraciones citogenéticas.

*³ Progresa 1 paciente con t(11;14) y 2 pacientes con t(4;14).

*⁴ Muere un paciente con t(4;14).

Total pacientes:

^a, Progresión, p=0.002; Supervivencia global, p=0.002

^b, Progresión, p=0.002; Supervivencia global, p=0.009

^c, Progresión, p=0.078; Supervivencia global, p=0.375

^e, Progresión, p=0.000; Supervivencia global, p=0.000

Mieloma (SMM+MM):

^a, Progresión, p=0.058; Supervivencia global, p=0.144

^b, Progresión, p=0.334; Supervivencia global, p=0.104

^c, Progresión, p=0.661; Supervivencia global, p=0.869

^d, Progresión, p=0.069; Supervivencia global, p=0.050

^e, Progresión, p=0.046; Supervivencia global, p=0.018

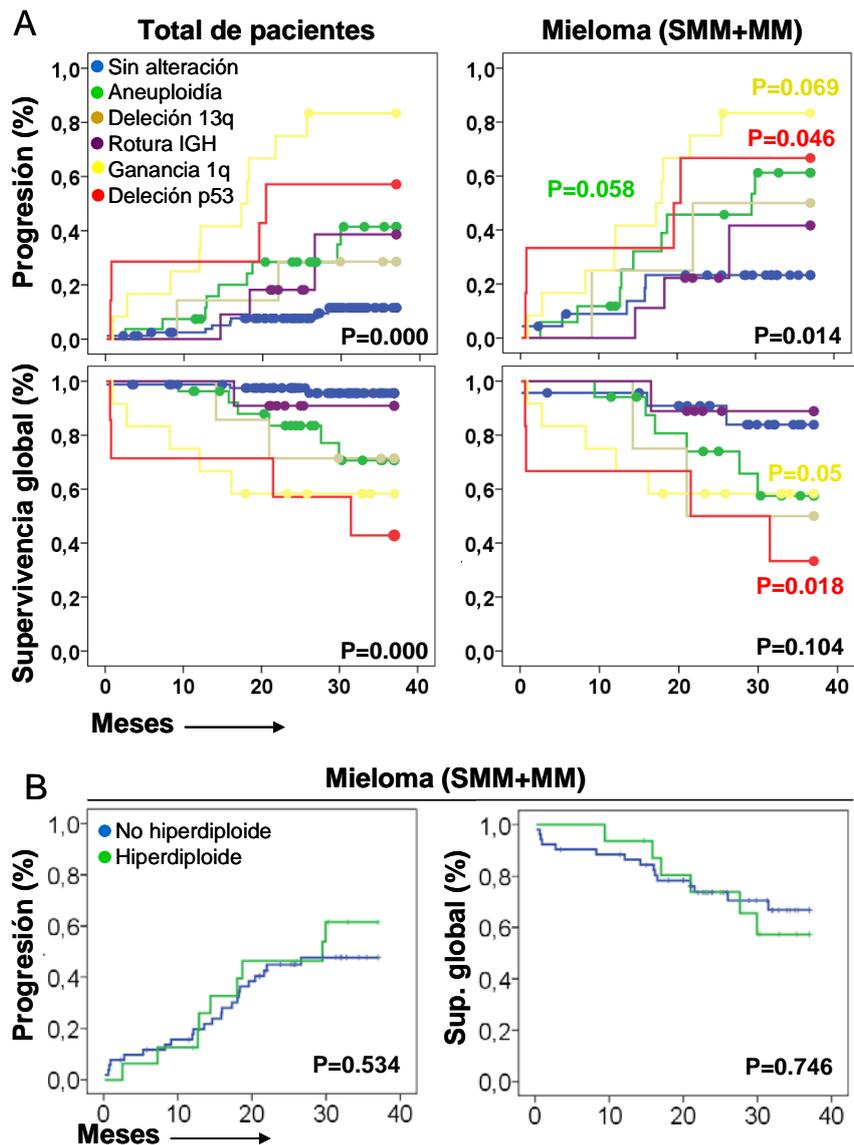


Figura 57. Impacto de las alteraciones citogenética en la progresión de la enfermedad y la supervivencia global en función de la alteración principal. A) Análisis de Kaplan Meier sobre progresión de la enfermedad (arriba) y SG (debajo), en el total de pacientes (izquierda) y en pacientes con mieloma (SMM+MM, derecha) clasificados teniendo en cuenta la anomalía citogenética principal (de mayor impacto) según el siguiente esquema de clasificación p53 > 1q > 13q > IGH > Aneuploidía > Sin alteración. En cada gráfico se indica el nivel de significación obtenido en el análisis Log Rank (Mantel-Cox) para el conjunto de todas las anomalías citogenéticas (en negro). La tasa de progresión y la SG a tres años de los pacientes de cada subgrupo, así como el resultado del análisis Log Rank (Mantel-Cox) para cada tipo de alteración respecto a la ausencia de alteraciones se puede ver en la Tabla 50. En el gráfico se exponen solo los resultados del grupo de mieloma y la significación estadística de las comparaciones que alcanzaron o estuvieron próximos a alcanzar valores menores o próximos a 0.05. El color corresponde a cada alteración citogenética. B) Análisis de Kaplan Meier de progresión de la enfermedad (izquierda) y SG (derecha) en pacientes con mieloma (SMM+MM) que presentaban hiperdiploidía como única alteración respecto al resto de pacientes (no hiperdiploides). En los gráficos se recogen también los valores de p del análisis Log-Rank.

4 ANÁLISIS CELULAR EN SANGRE PERIFERICA POR CITOMETRIA DE FLUJO

En este apartado se estudiaron las principales líneas leucocitarias y linfocitarias en sangre periférica, la presencia de células plasmáticas aberrantes circulantes y marcadores de activación y expresión de receptores KIR2D en células NK y linfocitos T.

4.1 LÍNEAS CELULARES Y SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS PRINCIPALES

Las cifras de las principales líneas celulares (Leucocitos, Monocitos, Neutrófilos y Eosinófilos) y subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T CD3+, CD3+CD4+ y CD3+CD8+; linfocitos B CD19+ y células NK CD3-CD56+), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los distintos grupos de pacientes, ni entre los distintos grupos de pacientes entre sí (Tabla 51).

Tabla 51. Líneas celulares y subpoblaciones linfocitarias principales en sangre periférica

Variable	Control	MGUS	SMM	MM
Leucocitos totales ($\times 10^9/L$)	6.63 \pm 0.52	6.52 \pm 0.19	6.17 \pm 0.41	6.15 \pm 0.38
Linfocitos	26.42 \pm 1.78	25.56 \pm 0.97	28.77 \pm 1.83	25.17 \pm 1.67
Linfocitos B CD19+	2.11 \pm 0.23	2.22 \pm 0.16	2.38 \pm 0.27	1.79 \pm 0.22
Linfocitos T CD3+	18.26 \pm 1.47	18.36 \pm 10.81	21.90 \pm 1.47	18.46 \pm 1.33
Linfocitos T CD3+CD4+	10.05 \pm 0.83	10.83 \pm 0.48	12.07 \pm 0.72	9.75 \pm 0.74
Linfocitos T CD3+CD8+	7.09 \pm 0.87	6.34 \pm 0.42	8.40 \pm 1.07	7.47 \pm 0.70
Células NK CD3-CD56+	16.35 \pm 2.0	15.60 \pm 1.1	11.89 \pm 1.7	14.14 \pm 1.9
Monocitos	7.95 \pm 0.50	8.73 \pm 0.39	8.46 \pm 0.46	8.94 \pm 0.56
Neutrófilos	60.36 \pm 2.01	59.93 \pm 1.16	57.98 \pm 1.74	60.49 \pm 1.98
Eosinófilos	2.65 \pm 0.47	2.43 \pm 0.17	2.06 \pm 0.22	1.84 \pm 0.26

Valores expresados en porcentaje \pm error estándar de la media (EEM)

4.2 VALOR PREDICTIVO DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SANGRE PERIFÉRICA

Nuestro estudio también analizó el valor predictivo de la presencia de aCPs circulantes en SP, sobre la progresión y la SG de los pacientes. Para ello, se estudió mediante CMF multiparamétrica (ver Materiales y métodos) la presencia y el fenotipo de CPs tanto en SP como en MO. Aunque establecer el fenotipo aberrante de las CPs circulantes en SP con los métodos actuales de citometría es relativamente sencillo, siempre se comprobó que el fenotipo aberrante de las CPs en SP era concordante con el descrito en la MO, tal y como se muestra en la Figura 58A. Básicamente las aCPs se definieron como células que perdían la expresión de CD19 y/o CD45 y/o CD27 y/o ganaban la de CD20 y/o CD56. En la figura se muestra en los gráficos superiores los gráficos de puntos (*dotplots*) utilizados para seleccionar las CPs tanto en SP como en MO, basados en la consideración de tamaño (FSC) y granulación (SSC) intermedio/elevado (ventana de análisis a) y, en la expresión positiva y elevada de CD38 y CD138 (ventana de análisis b). En los *dotplots* inferiores se muestran las CPs de médula ósea de un control sano que contenía un 0.77% de CPs de fenotipo normal CD19+/- CD20-/+ CD27++ CD38+++ CD45++ CD56-/+ CD138+ y, seguido de un paciente representativo con aCPs tanto en MO (24.1%) como en SP (2.7%) de fenotipo CD19- CD20- CD27-/+débil CD38++ CD45-/+débil CD56+ CD138+; y por último, de un paciente representativo de aquellos que tenían aCPs en MO (18.1%), de fenotipo CD19- CD20++ CD27+/- CD38++ CD45++ CD56- CD138+, pero no en SP (0.00%).

Con la sensibilidad que ofrecía nuestro método, el porcentaje de pacientes en los que fue posible detectar la presencia de aCPs en SP se incrementó de forma notable según aumentaba el grado de la patología, (Figura 58B) siendo poco frecuentes en MGUS (11.6%) y más frecuentes en SMM (40.0%) y MM (71.2%). La frecuencia de aCPs en SP fue significativamente mayor en SMM y MM que en MGUS (OR=6.27, $p<0.01$ y OR=23.86, $p<0.001$ respectivamente). Igualmente, dicha frecuencia se incrementaba al considerar el grado de riesgo de los pacientes con MM (siguiendo los criterios de riesgo descrito por el grupo internacional de mieloma por Chng et al., 2014), representando un 30% en los MM con bajo riesgo, 57.4% en los de riesgo estándar y 57.1% en los de alto riesgo. No obstante, las diferencias encontradas en la

frecuencia de aCPs en SP según dichos grupos de riesgo no alcanzaron la significación estadística.

En la Figura 58C se describe el porcentaje de infiltración de CPs tanto en MO como en SP. Como cabía esperar, y tal y como se ha descrito en apartados anteriores, la frecuencia de CPs descritas por histología en MO (barras negras) se incrementaba de forma significativa con la gravedad de la discrasia, así mismo lo hizo la ratio de aCPs /BMPC (barras grises). Sin embargo, dichos parámetros no alcanzaron diferencias significativas cuando se compararon en los tres grupos de riesgos establecidos según los criterios del IMWG2014 (Figura 58 C, arriba). Por el contrario, cuando se analizó el grado de infiltración de aCPs en SP (Figura 58 C, abajo) se observó que las cifras de estas se incrementaban significativamente de MGUS ($0,003\% \pm 0,001$), a SMM ($0,026\% \pm 0,002$) ($p < 0.05$) y a MM ($0,38\% \pm 0,15$) ($p < 0.001$ comparado a MGUS). Así mismo lo hicieron conforme se incrementaba el riesgo de mieloma, pasando de $0,056\% \pm 0,05$ y $0,18\% \pm 0,07$ a $0,32\% \pm 0,14$, para riesgos bajo, estándar y alto, respectivamente (MM de alto riesgo vs MGUS $p < 0.05$).

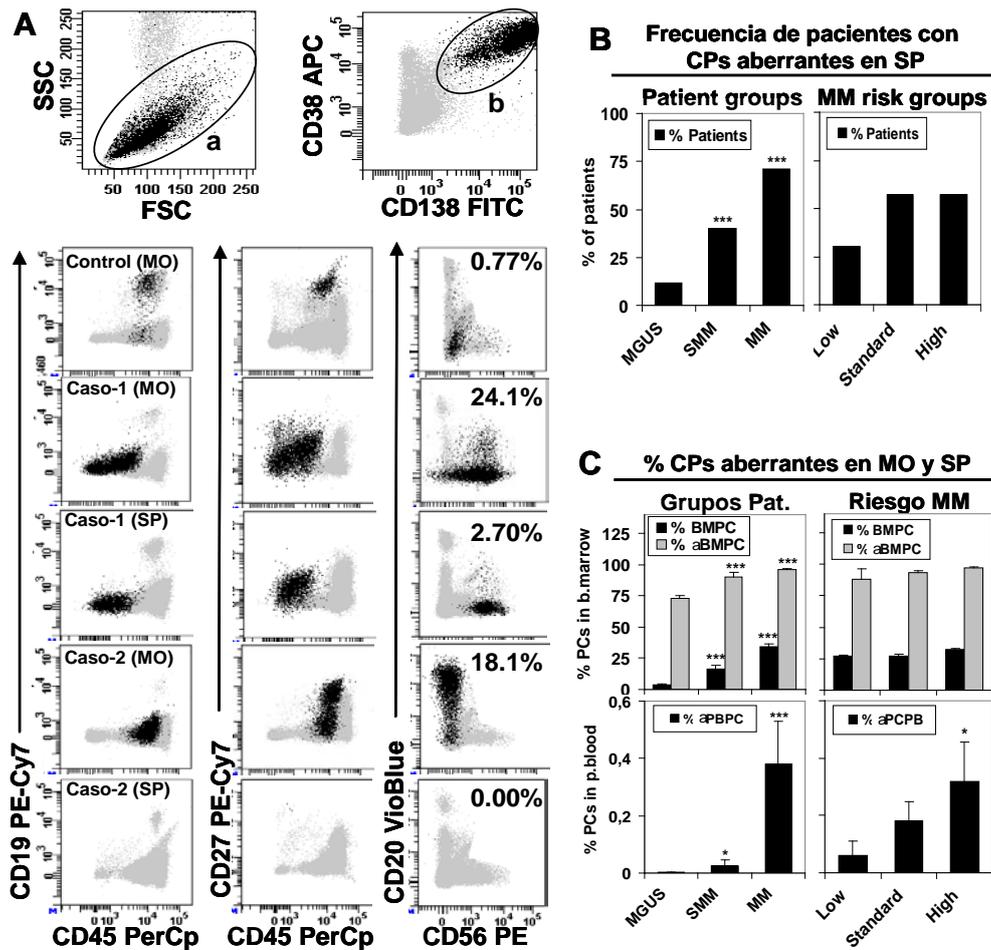


Figura 58. Detección de células plasmáticas (CPs) normales y aberrantes (aCPs) en médula ósea (MO) y sangre periférica (SP).A) Gráficos de puntos superiores: selección de CPs mediante ventana en FSC/SSC (a) y CD38⁺⁺/CD138⁺ (b). Las CPs se representan en negro y las células restantes en gris. En la siguiente línea y sucesivas, se muestra una MO de un Control sano con CPs normales (CD19^{+/-} CD45⁺⁺ CD27⁺⁺ CD20⁻ CD56^{-/+}); de un paciente representativo de MM (Caso-1) con presencia de aCPs (CD19⁻ CD45^{-/+}dim CD27^{-/+}dim CD20⁻ CD56⁺) tanto en SP como en MO; y de un paciente representativo de MM (Caso-2) con presencia de aCPs (CD19⁻ CD45^{-/+}dim CD27^{-/+}dim CD20⁻ CD56⁺) en MO pero no en SP. **B)** Representa la frecuencia de pacientes con aCPs en SP (aPCPB) en los diferentes tipos de discrasias de células plasmáticas (izquierda) o pacientes diagnosticados de MM con diferentes puntuaciones de riesgo (derecha). La puntuación de riesgo fue asignada a cada paciente como sugiere Chng., 2014 ***, p<0.001, el test de Chi cuadrado comparando entre MGUS o bajo riesgo con los otros grupos. **C)** Número de CP por histología (gris) y aCPs (negro) en MO (arriba) y SP (abajo) entre las diferentes tipos de discrasias (izquierda) o pacientes con MM con diferentes puntuaciones de riesgo (derecha). *, p<0.05; ***, p<0.001, en test de Mann Whitney comparando entre MGUS o bajo riesgo con los otros grupos.

4.2.1 RELACIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SP CON OTROS PARÁMETROS

La presencia de aCPs en SP se relacionó con un gran número de parámetros analizados en nuestra serie (no se muestran todos los datos), ya que en definitiva estas se asociaban a la mayor malignidad de la patología. Sin embargo, algunos de los

parámetros de la enfermedad se relacionaron muy significativamente con la aparición de aCPs en SP (Tabla 52). En la parte superior de la Tabla se muestra la frecuencia de aCPs en función de algunos de los parámetros de valor pronóstico mejor establecidos en gammapatías. En los análisis univariantes la presencia de aCPs no se asociaba a la edad, pero sí al número de CPs totales determinado en la histología ($p < 0.0001$), al índice de proliferación de las CPs ($p < 0.001$), a la citogenética de alto riesgo (deleción p53 y/o t (4; 14) y/o ganancia de 1q, $p < 0.0001$), a la deleción de 13q ($p < 0.0001$) y a la hiperdiploidía ($p < 0.01$). El análisis multivariante demostraba que la aparición de aCPs en SP se relacionaba de forma independiente al número de CPs totales determinado por histología ($p < 0.0001$), al índice de proliferación de las CPs ($p < 0.029$), a la citogenética de alto riesgo ($p < 0.027$) y a la deleción de 13q ($p < 0.038$), pero no a la hiperdiploidía.

Tabla 52. Parámetros asociados con la presencia de aCPs circulantes en la SP

Variables	Análisis univariante		
	No aCPs	Si aCPs	OR; p<*
Edad (años)	66,4±6,2	69,8±6,3	ns
CPs por histología (%)	9,0±7,1	31,7±8,7	0,0001
Índice de proliferación CPs (%)	1,5±0,7	3,37±1,8	0,001
Citogenética alto riesgo, Si/No, n (%)	6/121 (4,7%)	16/32 (33,3%)	OR=10.1; 0.0001
Deleción 13q, Si/No, n (%)	3/98 (2,97%)	14/29 (32,5%)	OR=15.8; 0.0001
Hiperdiploidía, Si/No, n (%)	21/78 (21,1%)	18/22 (45,0%)	OR=3.0; 0.01
	Regresión logística multivariante		
	OR	95%CI	p
Edad (años)	1.039	0,995-1,086	0.083
CPs por histología (%)	1.054	1,024 - 1,085	0.000
Índice de proliferación CPs (%)	1.313	1,028 - 1,678	0.029
Citogenética alto riesgo, Si/No, n (%)	4.474	1,183- 16,922	0.027
Deleción 13q, Si/No, n (%)	6.250	1,108- 35,248	0.038
Hiperdiploidía, Si/No, n (%)	1.367	0,462- 4,042	0.572

* p: Significación estadística con χ^2 para cualitativa y Mann Whitney para parámetros cuantitativos.
 OR, Odds ratio.
 ns, no significativo

El parámetro que presentaba la asociación más fuerte con la presencia de aCPs fue el número de CPs totales en la histología ($p < 0.0001$), pero el riesgo que este parámetro aporta es relativamente pequeño ($OR = 1.054$), comparado con el que aporta la citogenética de alto riesgo ($OR = 4.47$) o la delección de 13q ($OR = 6.25$).

4.2.2 UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SP

Mediante estudio de curva ROC se evaluó la utilidad de la presencia de aCPs en SP para diferenciar MGUS de SMM+MM (área bajo la curva, ABC = 0.778). En ella estudio se pudo establecer un punto de corte de 0.0035%, con una sensibilidad del 70.7% y especificidad del 75.0% para discriminar SMM o MM de MGUS (Figura 59A).

4.2.3 CAPACIDAD PREDICTIVA DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SANGRE PERIFÉRICA PARA LA PROGRESIÓN Y SUPERVIVENCIA

Este punto de corte tuvo igualmente gran utilidad para evaluar el impacto de las aCPs en SP tanto en la progresión como en la supervivencia de los pacientes. Como se puede observar en la Figura 59B, con independencia de que se estudiaran los mielomas de forma separada SMM y MM o conjuntamente, la capacidad para discriminar pacientes con evolución (progresión y/o supervivencia) favorable o desfavorable en función de la presencia de aCPs en SP fue muy clara y estadísticamente significativa tanto para SMM+MM ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, en progresión y supervivencia, respectivamente) como para MM ($p < 0.05$, en progresión y supervivencia). Cuando se analizaron los SMM por separado, no se alcanzó significación estadística quizás debido al limitado número de pacientes.

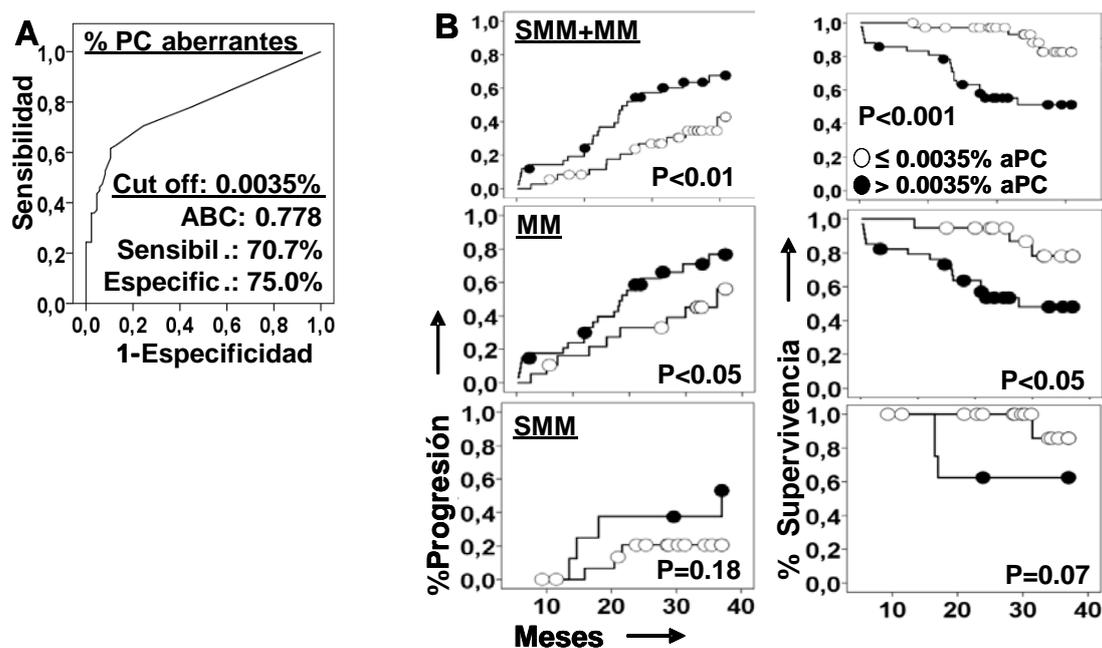


Figura 59. Impacto de las aCPs circulantes en la progresión y supervivencia de los pacientes. A) Curva ROC para establecer los valores de corte de aCPs en SP con mayor sensibilidad y especificidad para discriminar MGUS de mieloma (SSM+MM). Se seleccionaron valores de aPC $\geq 0.0035\%$. Cuando se utilizó el análisis ROC para contrastar la progresión y supervivencia de los pacientes, se encontraron valores de corte similares. B) Curvas de Kaplan-Meier para progresión y supervivencia de pacientes con aPC \geq (puntos negros) vs $< 0.0035\%$ (puntos blancos) diagnosticados de SMM+MM (arriba), SMM (centro) y MM (abajo). Se muestran los valores de p determinado en el análisis Log Rank (Mantel-Cox).

En la Tabla 53 se puede comprobar como la presencia de aCPs impacta negativamente tanto en la progresión como en la supervivencia de los pacientes a los tres años, cualquiera que sea el grupo que se compare. Así en función de la presencia o no de aCPs en SP la tasa de progresión fue del 37,5% vs 17,6%; 67,6% vs 47,4% y 61,9% vs 33,3% ($p < 0.05$) en SMM, MM o SMM+MM, respectivamente; y la de supervivencia de 62,5% vs 94,1%, 52,9% vs 84,2% ($p < 0.05$) y 54,8% vs 88,9% ($p < 0.001$), respectivamente.

Tabla 53. Impacto de la presencia de aCPs en sangre periférica en la progresión de la enfermedad y supervivencia de los pacientes

Grupo	Progresión enfermedad, Si/No n (%)		Supervivencia, Si/No n (%)	
	Sin aCPsC	Con aCPsC	Sin aCPsC	Con aCPsC
SMM	3 / 14 (17,6%)	3 / 5 (37,5%)	16 / 1 (94,1%)	5 / 3 (62,5%)
MM	9 / 10 (47,4%)	23 / 11 (67,6%)	16 / 3 (84,2%) ^a	18 / 16 (52,9%) ^a
SMM+MM	12 / 24 (33,3%) ^b	26 / 16 (61,9%) ^b	32 / 4 (88,9%) ^c	23 / 19 (54,8%) ^c

aCPsC, células plasmáticas clonales circulantes en sangre periférica

^aSG en pacientes MM con y sin aCPsC: OR=4.47; p<0.05

^bProgresión pacientes SMM+MM con y sin aCPsC: OR=3.25; p<0.05

^cSG pacientes SMM+MM con y sin aCPsC: OR=6.61;p<0.001

4.2.4 LA PRESENCIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ABERRANTES EN SP COMPLEMENTA LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE OTROS PARÁMETROS PRONÓSTICOS BIEN ESTABLECIDOS EN GAMMAPATÍAS

En los próximos análisis, la atención se centró en la evaluación de la utilidad de la presencia de aCPs en SP para complementar el riesgo estimado con parámetros clásicos en los pacientes nuevamente diagnosticados de gammapatías malignas tipo SMM o MM. En la Figura 60A se muestra el impacto de la presencia de aCPs en SP en la progresión y supervivencia de pacientes clasificados de riesgo bajo o estándar tanto por los criterios del IMWG, edad menor a la media, citogenética favorable o índices de proliferación bajos (menores de la media). En todos los casos, incluso en estos pacientes clasificados de buen pronóstico, la presencia de aCPs en SP parecía contribuir a identificar pacientes con una progresión más adversa (aunque no alcanzó la significación estadística en ningún caso) y supervivencias significativamente menores para todos los parámetros clásicos (p<0.05), p<0.01, para el caso de la citogenética favorable.

También en aquellos pacientes clasificados de mal pronóstico por los criterios del grupo internacional de mieloma, de edad mayor a la media, citogenética adversa o índices de proliferación elevados (mayores de la media) (Figura 60B), la presencia de CPs en SP tuvo una gran capacidad predictiva complementaria, ya que impactó muy negativamente tanto en la progresión como en la supervivencia de los pacientes. Debido al reducido número de pacientes clasificados como alto riesgo tanto para los criterios del grupo internacional de mieloma, citogenética adversa o índices de proliferación elevados, el impacto en la progresión solo alcanzó la significación

estadística para los pacientes con una edad superior a la media ($p < 0.01$). Igualmente, impactó de forma muy negativa en la **supervivencia de los pacientes clasificados de mal pronóstico**, con diferencias significativas entre los que tenían o no aCPs en SP para todos los parámetros clásicos, excepto para la citogenética adversa, que aunque las diferencias de supervivencia a tres años fueron claras (25.0% vs 66.7%), no se alcanzó significación estadística probablemente debido al reducido número de pacientes en esta situación.

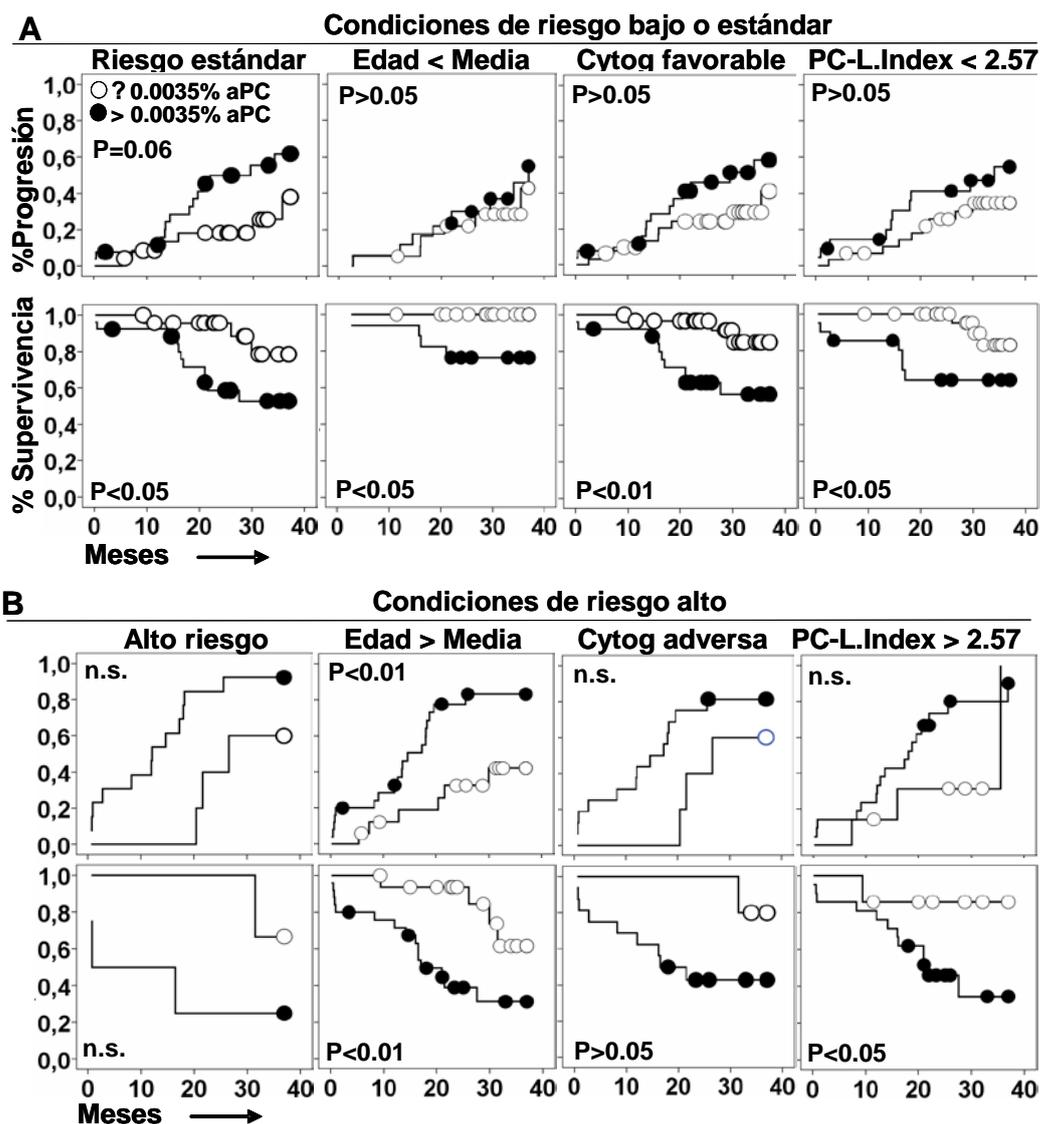


Figura 60. La presencia de aCPs en SP complementa el valor pronóstico de biomarcadores clásicos. **A)** Curvas Kaplan-Meier para progresión (arriba) y supervivencia (abajo) de pacientes con mieloma (SMM+MM) en función de la presencia de aCPs \geq vs $<$ 0.0035% en diferentes condiciones de riesgo bajo/estándar (riesgo bajo, (Chng., 2014) edad < media, citogenética favorable e índice de proliferación < media. **B)** Análisis Kaplan-Meier para la progresión (arriba) y la supervivencia (abajo) de pacientes con mieloma (SMM+MM) en función de la presencia de aCPs \geq vs $<$ 0.0035% en diferentes condiciones de riesgo alto (riesgo alto, (Chng., 2014) edad > media, citogenética desfavorable e índice de proliferación > media. Se muestran los valores de p determinado por análisis Log Rank (Mantel-Cox).

4.2.5 LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE LA PRESENCIA DE aCPs EN SP PARA LA SUPERVIVENCIA ES DE UTILIDAD TANTO EN TERAPIAS CLÁSICAS COMO NUEVAS

El siguiente aspecto en el que se centró el presente trabajo fue en determinar si la capacidad predictiva de la presencia de aCPs en SP era de utilidad cualquiera fuera el tipo de la terapia utilizada. En este sentido, se evaluó el impacto de la presencia de aCPs en SP tanto en función del número de líneas de tratamiento aplicadas, como de la utilización de terapias clásicas o nuevas o la inclusión del trasplante autólogo de SP (TASPE).

Como se puede comprobar en la Figura 61A, la aplicación de 1 o más líneas de tratamiento (entre 2 y 4) no parecía incidir sobre la SG a tres años, sin embargo, la presencia de aCPs en SP redujo de forma muy importante la SG ($p<0.05$) en ambas opciones terapéuticas.

Por el contrario, la utilización de las nuevas terapias (Figura 61B) conseguía supervivencias muy superiores (68.6%) a las clásicas (14.3%), aunque esta diferencia no resultara estadísticamente significativa debido probablemente al reducido número de pacientes a los que se les aplicaron terapias clásicas. No obstante, una vez más la presencia de aCPs en SP tuvo un impacto muy negativo sobre la supervivencia cualquiera que fuera la terapia empleada, con resultados muy significativos en el caso de las nuevas terapias ($p<0.01$).

Por último, cuando se tuvo en cuenta la inclusión del TASPE (Figura 61C) en el tratamiento de los pacientes, se encontró que la supervivencia fue significativamente muy superior (81.8%) en los pacientes que recibieron TASPE frente a los que no lo recibieron (50.0%, $p<0.05$). Muy probablemente este resultado pudo estar relacionado con la menor edad media de los pacientes que recibieron TASPE ($59,7\pm 2,26$ vs $73,9\pm 1,65$, $p<0.001$). No obstante, hay que destacar que otra vez la presencia de aCPs afectaba muy negativamente sobre la supervivencia con independencia de que se aplicara TASPE (69,2% vs 100% a tres años, $p=0.06$) o no (39,1% vs 69,2% a tres años, $p<0.05$).

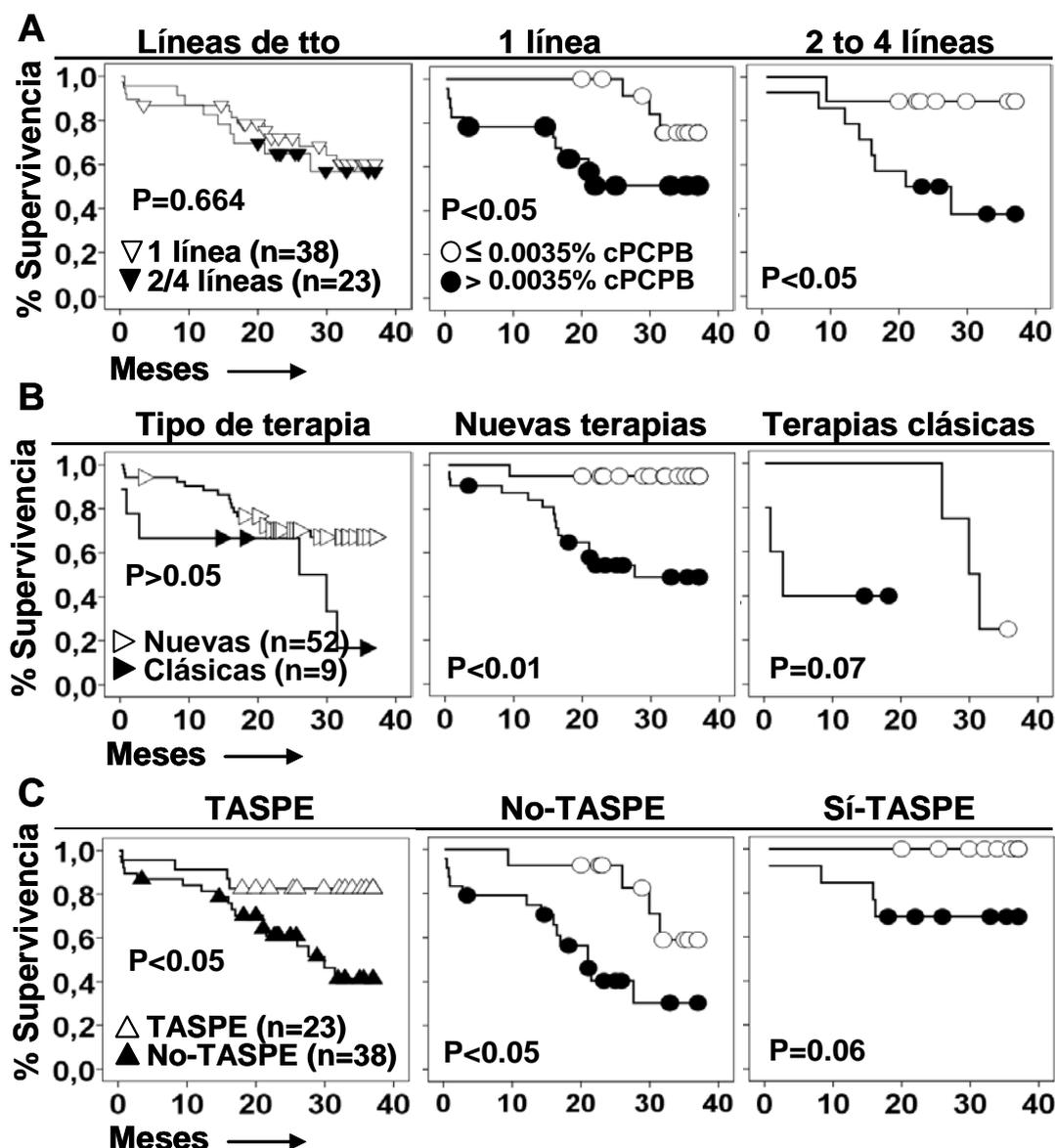


Figura 61. El valor pronóstico de las aCPs circulantes en sangre periférica es independiente del tipo de tratamiento. **A)** Análisis de Kaplan-Meier para la supervivencia de pacientes que recibieron 1 vs 2 a 4 líneas de tratamiento (izquierda). Supervivencia de pacientes con aCP en SP \geq vs $<$ 0.0035% para pacientes tratados con 1 (centro) o 2 a 4 líneas de tratamiento (derecha). **B)** Curvas de Kaplan-Meier para supervivencia de pacientes tratados con nuevos fármacos (Bortezomib y/o lenalidomida) vs los tratados con fármacos clásicos (izquierda). Supervivencia de pacientes con aCP en SP \geq vs $<$ 0.0035% para pacientes tratados con nuevos fármacos (centro) o clásicos (derecha). **C)** Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia de pacientes tratados o no con TASPE (izquierda). Supervivencia de pacientes con aCP en SP \geq o $<$ 0.0035% para pacientes tratados (derecha) o no (centro) con TASPE. Los valores de p de Log Rank (Mantel-Cox) se indican en cada caso.

4.2.6 PROPUESTA DE UN NUEVO MODELO DE PREDICCIÓN DE RIESGO EN PACIENTES CON MIELOMA BASADO EXCLUSIVAMENTE EN PARÁMETROS DE SP

La utilidad y versatilidad que demostraba la determinación de aCPs en SP, unido a su fácil, rápida y económica estimación, nos animó a proponer un nuevo modelo de estratificación del riesgo de pacientes con Mieloma (SMM+MM), basado exclusivamente en la utilización de parámetros determinados en SP que tiene la ventaja de ser mucho menos invasivo. En la Figura 62 se compara el modelo que se propone con el modelo de IMWG.

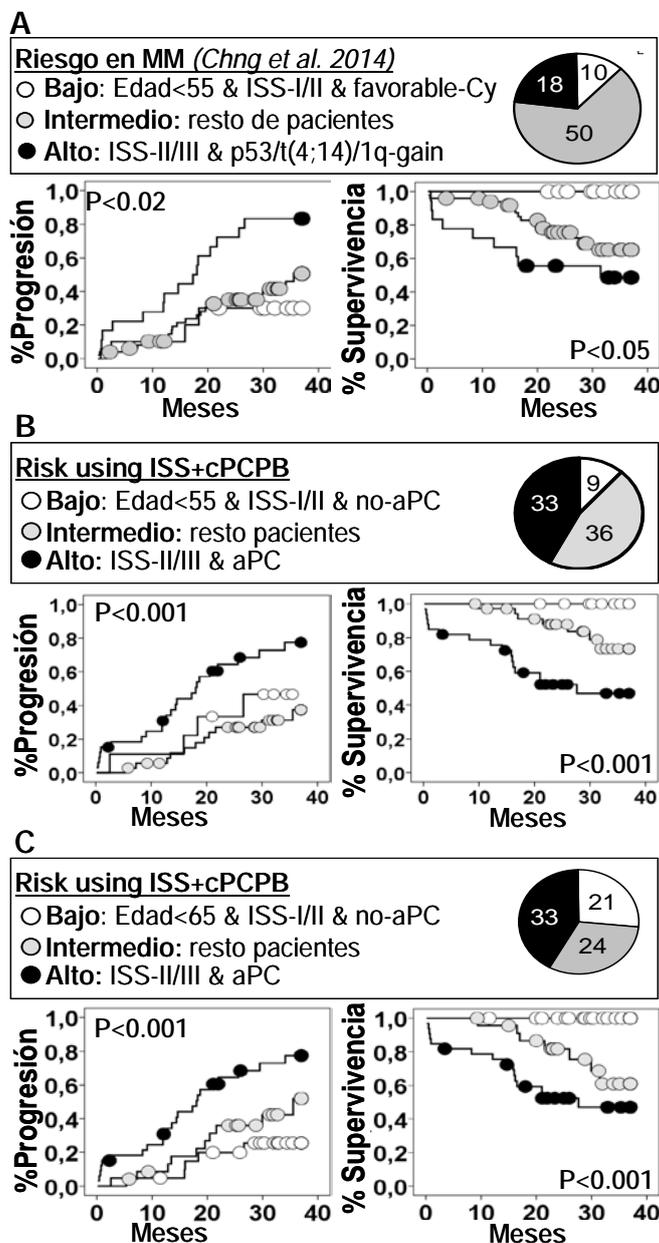


Figura 62. Nueva Estratificación de riesgo en MM basada exclusivamente en parámetros de SP. A) Análisis Kaplan-Meier de progresión de la enfermedad y supervivencia de pacientes para grupos de riesgo establecidos siguiendo los criterios descritos por el IMWG (Chng et al. 2014); B) Estratificación del riesgo basada exclusivamente en parámetros de SP, siguiendo criterios similares a los descritos en A, pero cambiando la presencia de citogenética adversa por la presencia de aCPs en SP (aPC); y C) Situación similar a B, pero incrementando la edad de los pacientes de bajo riesgo de 55 a 65 años. Los gráficos circulares representan la distribución de pacientes (número absoluto) en bajo (blanco), intermedio (gris) y alto (negro) riesgo en todos los casos.

Para ello, se tomó como referencia la clasificación propuesta por el grupo internacional de mieloma,(Chng., 2014) que define el riesgo bajo en función de una edad menor de 55 años, ISS-I o -II y ausencia de citogenética desfavorable, mientras que el alto riesgo lo establece en ISS-II o -III y citogenética desfavorable (presencia de delección p53 y/o t(4;14) y/o amplificación 1q), dejando el resto de pacientes como un grupo de riesgo intermedio o estándar. Según se representa en la Figura 62A siguiendo esta clasificación en la serie estudiada, 10 pacientes (12.8%) se clasificaron de bajo riesgo, 50 de riesgo estándar(64.1%) y 18 de alto riesgo(23.1%). Efectivamente con esta clasificación la tasa de progresión a tres años fue de 30%, 49.2% y 71.4% y el de la supervivencia del 100%, 68.9% y 42.9% para los grupos de bajo, estándar y alto riesgo, respectivamente. En ambos casos se alcanzaron diferencias significativas ($p < 0.02$ y $p < 0.05$, respectivamente).

Mediante un esquema similar de clasificación al anterior, pero sustituyendo únicamente el parámetro de citogenética desfavorable por la presencia de aCPs en SP, se conseguía un modelo de clasificación que permitía diferenciar pacientes de bajo 9 (11.5%), estándar 36 (46.1%) y alto riesgo 33 (42.3%). Con esta nueva clasificación, las tasas de progresión a tres años representaron un 43.4%, 37.6% y 69.7% y de supervivencia un 100%, 80.6% y 51.5% para los grupos de bajo, estándar y alto riesgo respectivamente, con diferencias significativas tanto para progresión como para SG ($p < 0.001$). De manera que ofrecía tasas de predicción para progresión y supervivencia comparables a los del modelo que se utilizaba la citogenética. Sin embargo, es interesante destacar que el modelo aquí propuesto tiene mayor capacidad para detectar pacientes de alto riesgo que el modelo IMWG (42.3% vs 23.1%), mientras que el número de pacientes de riesgo estándar se reduce de 64,1% a 46,1% (Figura 62B).

Con el objetivo adicional de mejorar el valor predictivo de este nuevo modelo, se recalculó la edad de corte para clasificar a los pacientes de buen pronóstico hasta los 65 años. Una edad que actualmente se ajusta más a la realmente utilizada en la toma de decisiones terapéuticas como la inclusión del TASPE, etc., principalmente debido a la mayor esperanza de vida y mejor estado fisiológico de los pacientes a esa edad. Con este nuevo punto de corte, 65 años, el modelo ofrecía una clasificación que permitía diferenciar pacientes de bajo riesgo 21 (26.9%), de riesgo estándar 24 (30.7%) y de alto riesgo 33 (42.3%). Con esta nueva clasificación las tasas de progresión a tres

años fueron 23.8%, 41.7% y 69.7% y de las de supervivencia de 100%, 70.8% y 51.5% para los grupos de riesgo de bajo, estándar y alto riesgo, respectivamente, con diferencias significativas en ambos casos $p < 0.001$ (Figura 62C).

A la vista de los resultados ofrecidos por los tres modelos, el modelo final propuesto aquí, sustituyendo la citogenética de mal pronóstico por la presencia de aCPs en SP y la edad de corte de 55 a 65 años para definir el buen pronóstico, observamos que este modelo ofrece valores predictivos comparables de progresión y supervivencia, pero una clasificación de pacientes con riesgo bajo, estándar y alto mucho más útil e informativa que el propuesto por el IMWG. De manera que es capaz de detectar mayor número de pacientes de bajo riesgo, 26.9% vs 12.8 %, con tasas de progresión del 23.8% vs 30% y supervivencia del 100% vs 100% comparables o incluso mejoradas a los tres años. Además, fue capaz de casi duplicar el porcentaje de pacientes del grupo de alto riesgo (42.3% vs 23.1%), pero manteniendo el nivel predictivo en progresión (69.7% vs 71.4%) y supervivencia (51.5% vs 42.9%). Y sobre todo redujo a menos de la mitad el grupo de pacientes con riesgo indeterminado o estándar (30.7% vs 64.1%), manteniendo una vez más, tasas comparables de predicción a tres años de la progresión (41.7% vs 49.2%,) y la supervivencia (70.8% vs 68.9%).

Finalmente, el análisis multivariante (Tabla 54) confirmó que la presencia de aCPs en SP se puede considerar un parámetro predictivo de riesgo de progresión y supervivencia independiente a otros parámetros bien establecidos como la edad, el índice de proliferación de las CPs o la citogenética adversa. Además fue el parámetro que ejercía mayor impacto sobre el riesgo de progresión y la supervivencia (OR de 3.37 y 8.8, respectivamente) y una elevada significación estadística ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$, respectivamente).

Al contrastar los dos sistemas de estratificación de riesgo, el propuesto por el IMWG y el aquí propuesto basado exclusivamente en parámetros de sangre periférica (con el punto de corte en 65 años), el análisis multivariante mostraba una vez más que este nuevo modelo impactaba con mayor fuerza en el riesgo de progresión y supervivencia (OR de 2.79 y 4.02, respectivamente) y lo hacía de forma igualmente muy significativa ($p < 0.001$ y $p < 0.002$, respectivamente).

Tabla 54. Regresión de Cox para progresión y supervivencia de pacientes con mieloma contrastando diferentes parámetros de estratificación del riesgo

Variable dependiente	Co-variables	OR	95%CI	p
Progresión	Edad	1,026	002 - 1,051	0,036
	Presencia de aCPs > 0.0035	3,374	1,636 - 6,960	0,001
	Índice de proliferación de CPs	2,913	1,444 - 5,879	0,003
	Citogenética adversa	1,101	1,002 - 1,211	0,046
	Riesgo-MM, grupo int. de mieloma	1,824	0,930 - 3,576	0,080
	Riesgo-MM, ISS+aCP en SP (65 años)	2,791	1,507 - 5,169	0,001
	Co-variables	OR	95%CI	p
Supervivencia global	Edad	1,054	1,015 - 1,095	0,007
	Presencia de aCPs > 0.0035	8,839	2,775 - 28,157	0,000
	Índice de proliferación de CPs	1,630	0,652 - 4,073	0,296
	Citogenética adversa	1,124	0,995 - 1,271	0,061
	Riesgo-MM, grupo int. de mieloma	1,396	0,597 - 3,267	0,442
	Riesgo-MM, ISS+ aCP en SP (65 años)	4,018	1,632 - 9,887	0,002

OR, odd ratio; 95%CI, 95% intervalo de confianza.

4.3 MARCADORES DE ACTIVACIÓN, SENESCENCIA Y ADHESIÓN DE LINFOCITOS T

En este apartado se analiza la expresión de algunos marcadores de activación, senescencia y adhesión de linfocitos T CD8+, como CD57, CD62L y HLA-DR (Tabla 55). Van den Hove *et al.*, 1998, describieron que en pacientes con MM, y en un número variable de MGUS, se expandía una población de linfocitos T de fenotipo activado CD8+CD57+CD62L-DR+, con potencial transcendencia en la evolución de los pacientes.

Tabla 55. Marcadores de activación en linfocitos T CD8+

Linfocitos TCD8+	Control	MGUS	SMM	MM	P (K.Wallis)
CD8+CD57+	1,45±0,23	2,25±0,23	3,68±0,65	2,67±0,33	0,025^a
CD8+CD57+DR+	0,13±0,03	0,13±0,02	0,24±0,05	0,31±0,05	0,021^b
CD8+HLA-DR+	0,76±0,11	0,58±0,08	0,76±0,12	1,17±0,16	0,005^c
CD8+CD62L+	2,71±0,41	2,11±0,14	2,41±0,38	2,18±0,23	0,502
CD8+CD62L-	4,36±0,62	4,23±0,33	6,00±0,86	5,29±0,60	0,117

Valores expresados en porcentaje referido a linfocitos ± error estándar de la media (EEM).

^a Control vs. SMM (p<0.01); Control vs. MM (p<0.05); MGUS vs. SMM (p<0.01).

^bMGUS vs. SMM (p<0.05); MGUS vs. MM (p<0.01).

^cMGUS vs. MM (p<0.01).

Los resultados obtenidos con tinción multiparamétrica de estos marcadores simultáneamente (Tabla 55), muestran una expansión de la subpoblación de linfocitos T CD8+ que expresa el marcador de senescencia CD57+ en todos los grupos de gammapatías comparadas con el grupo control de forma significativa (p=0.025, Kruskal Wallis). Significación estadística que se confirmó entre el grupo Control y el SMM (p<0.01) y entre el grupo Control y el MM (p<0.05), pero no llegaron a alcanzar significación estadística entre el grupo Control y MGUS. Igualmente la subpoblación **CD8+CD57+** se expandía de forma significativa en el grupo SMM respecto a MGUS (p<0.01), pero las diferencias con el grupo MM no alcanzaron significación estadística. Por tanto, la expansión de la subpoblación CD8+CD57+ podría estar asociada a la presencia de gammapatía tanto benigna como maligna, aunque de forma más marcada en las malignas (SMM y MM).

En relación con el marcador de activación **HLA-DR**, se observaba un incremento en los linfocitos T CD8+DR+ activados exclusivamente en los pacientes con MM y con valores significativamente elevados en estos respecto al grupo MGUS (p<0.01), aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística al compararlo con el grupo Control, probablemente debido al menor número de controles (n=30) que de MGUS (n=78).

El estudio de la expresión del marcador de activación HLA-DR en las células CD8+CD57+, reveló que se producía un incremento significativo de células CD8+CD57+DR+ exclusivamente en los pacientes con mieloma tanto SMM como MM

($p=0.037$, Kruskal Wallis) y que presentaba diferencias significativas cuando se comparaban los grupos MGUS y SMM ($p<0.05$) y MGUS y MM ($p<0.01$). Igualmente las diferencias fueron significativas entre el grupo MGUS y los mielomas agrupados (SMM+MM, $p=0.005$).

Para confirmar la capacidad diagnóstica y predictiva de este parámetro en la progresión y supervivencia de los pacientes, se realizó una curva ROC para diferenciar MGUS de Mieloma (SMM+MM). La curva presentaba un área bajo la curva de 0.63, y se estableció un punto de corta de 0.2% para células CD8+CD5+DR+ que permitía diferenciar MGUS de Mieloma con una baja sensibilidad (49%) aunque con una buena especificidad 82.0% (Figura 63).

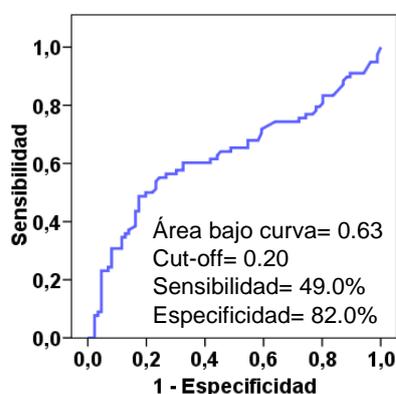


Figura 63. Curva ROC de linfocitos T CD8+CD57+DR+ para discriminar MGUS de Mieloma (SMM+MM).

Para evaluar la capacidad predictiva de este parámetro, se realizó análisis de Kaplan Meier para progresión de la enfermedad y supervivencia de los pacientes, en función del punto de corte de linfocitos T CD8+CD57+DR+ mayor o menor a 0.2% (Figura 64). El resultado obtenido, indicó que diferencias en este tipo de células no parecía conllevar cambios en la supervivencia (datos no mostrados), aunque al comparar el total pacientes con gammapatías se pudo comprobar que los pacientes con cifras elevadas de linfocitos T CD8+CD57+DR+ presentaban tasas de progresión a tres años superiores que los pacientes con cifras más reducidas (46% vs 31%, $p<0.05$). Sin embargo, esta diferencia en la progresión desaparecía cuando se analizaba el impacto de las cifras de dichas células en el grupo conjunto de mieloma (SMM+MM).

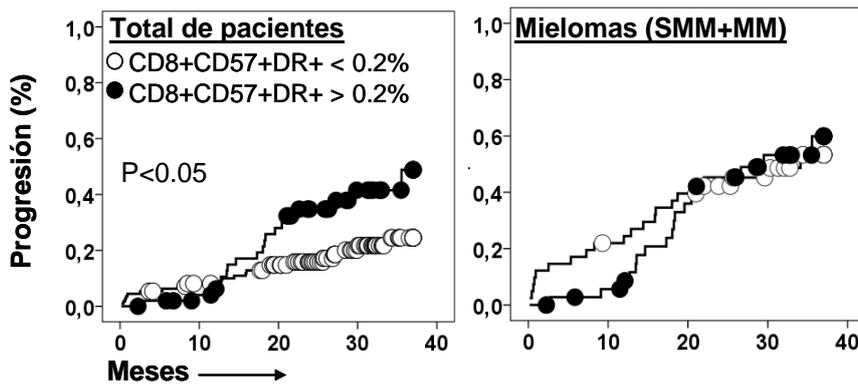


Figura 64. Valor pronóstico de las cifras de linfocitos T CD8+CD57+DR+. Análisis Kaplan Meier de progresión de la enfermedad en función de las cifras de linfocitos T CD8+CD57+DR+ superiores (puntos negros) o no (puntos blancos) al punto de corte del 0.2%. Se muestran los valores de p determinado en el análisis Log Rank (Mantel-Cox).

La baja capacidad predictiva de la presencia de linfocitos T activados en SP sobre la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes, hizo que se decidiera explorar en un análisis de regresión de Cox, su relación con el parámetro con mayor potencia predictiva de los analizados en SP, la presencia de aCPs en SP. Este análisis permitió comprobar que sólo la presencia de aCPs tuvo una fuerte capacidad predictiva independiente, mientras que las cifras de linfocitos T CD8+CD57+DR+ no tenía capacidad predictiva independiente (Tabla 56). Este hecho probablemente se debía a la relación existente entre las cifras de linfocitos T activados CD8+CD57+DR+ y la presencia de aCPs en SP, de manera que las cifras de linfocitos T activados CD8+CD57+DR+ eran significativamente muy superiores en los pacientes que presentaban cifras de aCPs > 0.0035% (Figura 65).

Tabla 56. Regresión de Cox para progresión de la enfermedad en pacientes con gammopatías en relación a las cifras de linfocitos CD8+CD57+DR+ y presencia de aCPs en SP.

Variable dependiente	Co-variables	OR	95%CI	p
Progresión	Presencia de aCPs > 0.0035	5.53	2.89– 10.59	0,000
	Cifras de linfocitos CD8+CD57+DR+	1.10	0.42 – 2.88	0,842

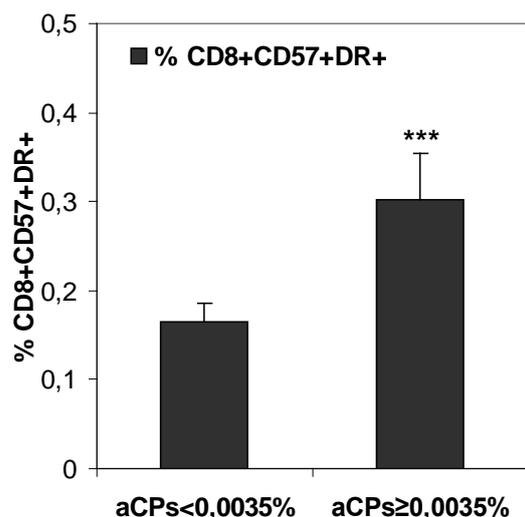


Figura 65. Cifras de linfocitos T CD8+CD57+DR+ en función de la presencia de aCPs en SP. Los pacientes con aCPs>0.0035% presentaban cifras de linfocitos T activados CD8+CD57+DR+ significativamente superiores al resto(***, p<0.001, test de Mann Whitney).

Con el objeto de determinar la causa de la activación celular, se investigó su posible relación con la masa tumoral, el fenotipo de las CPs y su capacidad proliferativa y apoptótica (Tabla 57). Esto permitió comprobar que tanto la masa tumoral (cifras de CPs en MO evaluada por histología, 11.9% vs 25.2%, p<0.001) como el índice de proliferación de las CPs (1.8% vs 2.3%, p<0.05) guardaba una relación directamente proporcional a las cifras de linfocitos T activados CD8+CD57+DR+ (menor o mayor al 0.2%), mientras que el índice de apoptosis (10.0% vs 6.0%, p<0.01) guardaba una relación inversa. Sin embargo, el fenotipo de la CP en MO (expresión de CD20, CD27, CD28, CD56 o CD117) no parecía tener relación con las cifras de linfocitos T activados.

Tabla 57. Relación entre la activación de los linfocitos T y el fenotipo de las CPs en MO

Variables (Media±SEM)	% Linfocitos CD8+CD57+DR+		p
	< 0.2%	≥0.2%	
% CPs por histología	11.19±1.3	25.2±3.4	0.001
% CPs CD20+	9.3±1.5	13.1±3.1	0.25
% CPs CD27+	71.8±2.6	68.0±3.5	0.16
% CPs CD28+	18.5±2.1	17.5±3.2	0.75
% CPs CD56+	43.2±3.2	52.8±5.3	0.17
% CPs CD117+	32.0±2.64	31.1±4.0	0.93
% Proliferación CPs	1.8±0.3	2.3±0.2	0.05
% Apoptosis CPs	10.0±0.9	6.0±1.0	0.01

Como complemento, mediante análisis de regresión logística multivariante se demostraba que la frecuencia de linfocitos T activados CD8+CD57+DR+ se relacionaba de forma independiente únicamente con la masa tumoral, pero no con los índices de proliferación o apoptosis, ya que estos en definitiva están directamente relacionados con la masa tumoral (Tabla 58).

Tabla 58. Regresión de Cox para progresión de la enfermedad en pacientes con gammapatías en relación a las cifras de linfocitos CD8+CD57+DR+ y presencia de aCPs en SP.

Variable dependiente	Co-variables	OR	95%CI	p
Cifras de linfocitos CD8+CD57+DR+	% CPs en la histología	1.04	1.02 – 1.06	0.003
	Índice de proliferación	2.68	0.87 – 8.27	0.086
	Índice de apoptosis	0.96	0.88– 1.04	0.329

Por último, el análisis de la expresión de la molécula de adhesión/migración celular CD62L tampoco evidenció diferencias significativas entre los grupos de estudio tanto si se consideraba la subpoblación de linfocitos T CD8+CD62L+ como la CD8+CD62L- (Tabla 55).

4.4 EXPRESIÓN DE RECEPTORES KIR2D EN LINFOCITOS T Y CÉLULAS NK

Al analizar la expresión de receptores KIR2D, concretamente las moléculas inhibitoras KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y la activadora KIR2DS1 (todos ellos receptores que unen a moléculas del grupo HLA-C) expresados sobre de linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ y células NK CD3-CD56+, no se encontraron diferencias significativas al comparar la presencia de estas poblaciones celulares entre los grupos de pacientes y el grupo control, ni entre los distintos grupos de pacientes, para ninguna de las subpoblaciones estudiadas (Tabla 59).

Tabla 59. Expresión de receptores KIR2D en linfocitos T y células NK de SP

	Control	MGUS	SMM	MM
Linfocitos T CD3+CD4+				
CD4+KIR2DS1+ (%)	0.030±0.025	0.083±0.062	0.008±0.062	0.005±0.006
CD4+KIR2DL1+	0.028±0.01	0.075±0.033	0.206±0.186	0.042±0.013
CD4+KIR2DL2+	0.27±0.06	0.31±0.08	0.97±0.6	0.42±0.12
CD4+KIR2DL3+	0.67±0.29	1.03±0.22	0.91±0.33	0.51±0.13
Linfocitos T CD3+CD8+				
CD8+KIR2DS1+	0.61±0.32	0.27±0.07	0.229±0.19	0.251±0.15
CD8+KIR2DL1+	1.98±0.77	2.47±0.51	2.12±0.92	1.77±0.63
CD8+KIR2DL2+	1.49±0.31	3.67±0.71	3.44±1.29	3.81±1.27
CD8+KIR2DL3+	5.41±1.11	5.84±0.94	2.85±0.58	4.33±1.38
Células NK CD3-CD56+				
NK KIR2DS1+	3.85±0.9	4.42±0.71	2.73±1.26	3.6±1.0
NK KIR2DL1+	16.21±2.46	15.91±1.15	19.64±2.94	15.35±2.12
NK KIR2DL2+	14.48±3.29	15.88±1.77	11.35±3.07	17.92±2.92
NK KIR2DL3+	21.23±2.65	20.81±1.64	29.29±4.41	22.28±3.01

Valores expresados en porcentaje ± error estándar de la media referido al total de la subpoblación linfocitaria implicada.

Igualmente, se trató de relacionar la expresión de receptores KIR2D en las diferentes subpoblaciones linfocitarias con la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes. En estos análisis, tan solo la subpoblación de linfocitos T CD8+KIR2DL2-KIR2DL3+parecía guardar cierta relación con la progresión de la enfermedad. Los pacientes en los que la enfermedad progresaba, presentaban cifras de estas células más reducidas que los que permanecían estables (3.0 ± 0.83 vs. 5.49 ± 0.84 , $p<0.05$) aunque esta significación desapareció al aplicar la corrección de Bonferroni.

En paralelo a esta memoria, se está realizando un estudio en la misma serie de pacientes, en el que se analiza genéticamente la relación de las interacciones de los receptores KIR con sus ligandos HLA específicos. Así, hay un trabajo aceptado para publicación (Martínez-Sánchez, 2015) que demuestra que no son las cifras de linfocitos T o NK que expresan KIR, si no la educación o no de las células que portan dichos receptores, lo que condiciona la susceptibilidad y la progresión de la enfermedad.

Gracias a dichos estudios genéticos, de los que amablemente se ha tomado información para conocer la presencia del ligando específico del único KIR2D activador analizado en esta tesis, KIR2DS1+, cuyos ligandos son los alelos C2 de HLA-C, se ha podido comprobar que efectivamente, no son las cifras de células NK que expresan KIR2DS1 las que parecen relacionarse con la aparición de gammapatías malignas, si no las células NK KIR2DS1+ que de forma efectiva pueden interactuar con su ligando C2 y con ello activar las células NK.

Como se puede comprobar en la Figura 66 izquierda, mientras que las cifras de células NK KIR2DS1+ se mantienen en niveles muy similares en los controles y pacientes que no portan su ligando específico HLA-C2 (barras grises), las células NK KIR2DS1+ se reducen significativamente ($p < 0.05$, test de Mann Whitney) en pacientes en los que estas células son realmente funcionales al interactuar con su ligando HLA-C2+ (barras negras). En la Figura 66 derecha, se pone de manifiesto que esta diferencia no se debe a diferencias en la frecuencia génica de KIR2DS1 en los pacientes de los diferentes grupos, ya que la frecuencia génica de KIR2DS1 es similar en controles, MGUS y mielomas (SMM+MM) tanto para individuos poseedores de HLA-C2+ como en los que los alelos del grupo HLA-C2 estaban ausentes (HLA-C2-negativos).

En definitiva, según estos datos, los pacientes con mieloma presentan de forma intrínseca cifras significativamente reducidas células NK con potencial actividad anti-tumoral respecto a individuos control y pacientes con gammapatías benignas, es decir, células NK que comparten la presencia de KIR2S1 (KIR2DS1+) con la de alelos HLA-C del grupo HLA-C2, que son sus ligandos específicos y que tras su unión a KIR2DS1, permiten la activación de esos clones concretos de células NK.

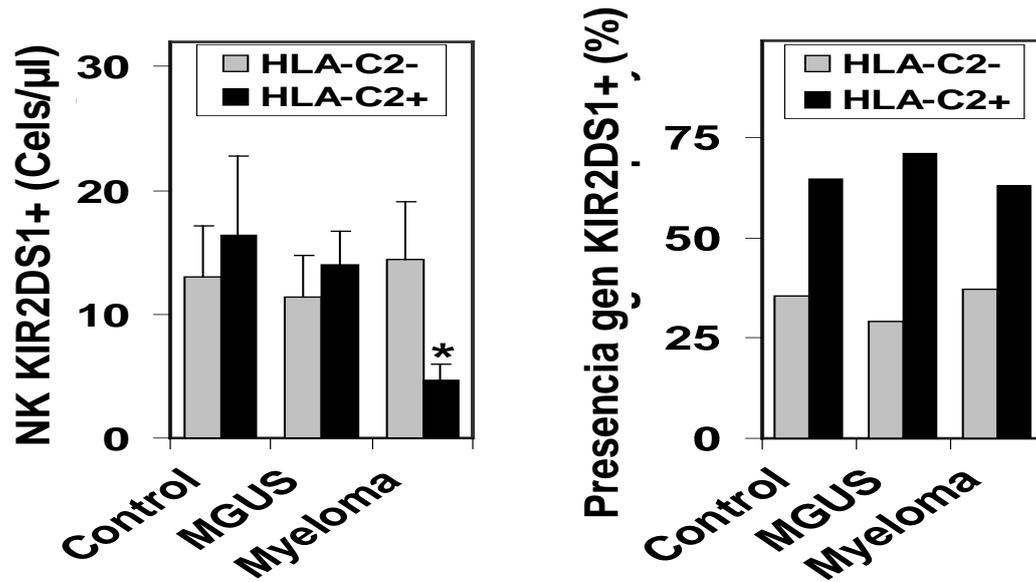


Figura 66. Cifras de células NK KIR2DS1+ en controles y paciente, en función de la presencia de su ligando HLA-C2 específico. **Figura Izquierda)** cifras de células NK KIR2DS1+ en controles, MGUS y mielomas (SMM+MM) en función de la ausencia (barras grises) o presencia (barras negras) de su ligando específico HLA-C2. *, $p < 0.05$ diferencias entre mieloma y Control y Mieloma y MGUS (test de Mann Whitney). **Figura Derecha)** frecuencia génica de KIR2DS1 en los diferentes grupos de estudio.

V DISCUSIÓN

1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

En los pacientes de la serie estudiada en este trabajo (ver pacientes y métodos), la edad media mediana de edad fue similar a la descrita por Kyle *et al.*, 2003, Bladé *et al.*, 2010 y Rosiñol *et al.*, 2007, y la mediana de edad fue de 68 años en el grupo de MGUS, 66 en el de SMM y de 70 años en el MM. En concordancia con lo descrito en la literatura, una edad superior a la media tuvo un impacto negativo tanto sobre la progresión de la enfermedad como sobre la SG (Ferlay J *et al.*, 2015). Sin embargo, en la serie aquí estudiada ha habido un leve predominio del **sexo** femenino en el conjunto global de las gammapatías (hombre/mujer= 1:1.1), siendo esta diferencia más acusada en el grupo SMM (1:2.1), lo que contrasta con estudios nacionales o internacionales que describen una mayor prevalencia de gammapatía en hombres que en mujeres, oscilando esta relación de 1.3:1 a 1.5:1 (Ferlay J *et al.*, 2015). Esto podría estar relacionado con el predominio sexo femenino en la Región de Murcia en edades de los 55 años (datos del Centro Regional de estadística de Murcia años 2010 a 2012 http://www.carm.es/econet/ecodata/toda_demografia.html) o simplemente a una desviación de la muestra de estudio debido a un número todavía limitado de pacientes. Nuestros datos revelan, sin embargo, que los hombres de esta serie tenían menor SG, especialmente en el grupo de MM, lo que es coincidente con los datos procedentes de la OMS (Ferlay J *et al.*, 2015).

Los **parámetros bioquímicos** no han sido el objetivo fundamental de esta tesis doctoral, pero se han analizado con el ánimo de corroborar conceptos ya bien establecidos, como es el incremento de β_2 microglobulina y el descenso de albúmina con la progresión de la enfermedad. Además, han sido de utilidad para establecer uno de los indicadores pronóstico más utilizado en la actualidad en mieloma, como es el índice pronóstico internacional (ISS, Greipp PR *et al.*, 2005).

El análisis del componente monoclonal reveló que predominaba el de tipo IgG tanto si se consideraba el total de gammapatías o los distintos grupos de estudio, seguidos por el tipo IgA y el de cadenas ligeras. Resultados que también son muy similares a los obtenidos por otros autores. El estudio de Kyle *et al.*, 2006 describen pacientes con MGUS en donde la IgG supuso el 68.9% y la IgA 10.8% y en el realizado

por el IMWG 2003 en SMM también predominaban la IgG 74% e IgA 22.5%. En nuestra serie, el tipo de cadena ligera predominante en el 59% de los pacientes fue la cadena Kappa en línea con lo observado previamente por Kyle *et al.*, 2006b. En cuanto al comportamiento “**progresivo**” de la proteína monoclonal, se constató en nuestra serie que ocurría en el 5% de MGUS mientras el SMM alcanzó un 43%, cifra en ambos casos similares a las reportadas por Rosiñol *et al.*, en 2007 en un estudio de 359 pacientes con MGUS de los cuales 29 (8%) presentaron comportamiento “progresivo” o *evolving* o en el estudio de la misma autora en 2003 en el que se identificaron este comportamiento en el 41.5% de pacientes con SMM. La **immunoparesis**, el **cociente κ/λ** en suero y la **proteinuria de Bence-Jones**, si bien son considerados factores pronóstico relacionados con la progresión de la enfermedad, en nuestro caso no tuvieron una influencia clara ni en la progresión de la enfermedad ni en la SG de los pacientes.

En el estudio citomorfológico de la MO mostró, como cabía esperar, una **infiltración** creciente **de células plasmáticas** desde MGUS a MM, lo que concordaba con lo descrito en otros estudios (Kyle *et al.*, 2002; Rosiñol *et al.*, 2007). También, la **morfología plasmablástica** creció desde MGUS a MM y dado que este parámetro no parecía impactar de forma significativa en la progresión de la enfermedad o en la SG de los pacientes de nuestra serie, se ha profundizado en la relación de este parámetro con las características clínico-biológicas de los pacientes. No obstante, resultados en los pacientes de nuestra serie, y que no se recogen en este trabajo, en los que la morfología plasmablástica en MM se correlacionó con el alto porcentaje de infiltración de células plasmáticas en MO y un cariotipo alterado, apoyan los recientemente descritos por Møller *et al.*, en 2015, pero a diferencia de ellos, nuestros datos no se relacionan con características clínicas desfavorables o altos índices de proliferación (en nuestro caso medido mediante citometría de ADN).

2 ESTIMACIÓN DEL RIESGO EN PACIENTES CON GAMMAPATÍA

Las gammapatías monoclonales constituyen unas de las afecciones tumorales de mayor incidencia en la población a partir de los 50-55 años de edad. La variabilidad en la presentación clínica de estas patologías, desde formas benignas a formas de gran malignidad como es el MM, o incluso entre los pacientes afectados por MM, ha llevado a la búsqueda de nuevos parámetros de valor pronóstico para tratar de individualizar las estrategias diagnóstica y terapéutica a cada paciente.

En la actualidad, los estimadores de riesgo de progresión más utilizados en la práctica clínica para los pacientes con MGUS y SMM, son los modelos de estratificación de riesgo definidos por el Grupo Español de Mieloma y la Clínica Mayo (Korde N *et al.*, 2011). El primero utiliza parámetros como la proporción de CP aberrantes en MO ($\geq 95\%$) y la presencia de aneuploidía (evaluada por citometría) en los pacientes con MGUS y la proporción de CP aberrantes en MO ($\geq 95\%$) y la presencia de inmunoparesis en los pacientes con SMM. Por su parte, la Clínica Mayo utiliza la concentración del componente monoclonal ($>1,5$ g/dL), el tipo de Ig (no IgG) y la alteración del cociente κ/λ en suero en MGUS, mientras que para SMM utiliza el porcentaje de CPs en MO evaluado por histología ($\geq 10\%$), la concentración del componente monoclonal (≥ 3 g/dL) y la alteración del cociente κ/λ , para establecer diversos grupos de riesgo.

El porcentaje de progresión de los pacientes MGUS fue del 1.1% anual, rangos esperables para este tipo de patología (Hillengass J. *et al.*, 2011) aunque sería necesario incrementar la serie de pacientes con MGUS así como alargar el periodo de seguimiento confirmar el efecto de los parámetros monitorizados en este trabajo. Igualmente, el porcentaje de progresión en los pacientes SMM de nuestra serie mantuvo los rangos esperables para este tipo de patología con un 8.0% anual (Kyle *et al.*, 2007). A pesar de ello, el reducido número de pacientes de este grupo, ha limitado la capacidad de análisis estadístico para establecer el valor predictivo de los parámetros analizados. No obstante, hay que tener en cuenta que siguiendo los nuevos criterios de clasificación de mieloma del IMWG 2014, 17 de los 25 pacientes con SMM, podrían actualmente ser considerados como MM, y por tanto debería pasar a evaluarse dentro del grupo MM.

En 2008 Ludwig *et al.*, trabajando con en una amplia muestra de 10.549 pacientes con mieloma, encontraron que el estadio III de Durie-Salmon se asociaba a mal pronóstico comparado a los estadios I-II. Sin embargo, desde que Durie y Salmon propusieran su sistema de clasificación en 1975, han sido propuestos diversos factores estimadores de riesgo, como el perfil citogenético, el proliferativo o el apoptótico de las células tumorales. Aun así, el índice más utilizado en la práctica clínica es el ISS (propuesto por Greipp en 2005), debido a su capacidad predictiva y fácil estimación, ya que simplemente utiliza parámetros que pueden determinarse en suero como la concentración de albúmina y β 2-microglobulina y por ello ha desplazado al sistema clásico de estadificación de Durie-Salmon.

Efectivamente, la capacidad predictiva del ISS pone de manifiesto que los pacientes de nuestra serie con ISS>I tienen tasas de progresión más elevadas (68.3% vs 41.7% $p=0.001$) y SG más reducidas (58.5% vs 83.8%, $p=0.007$), que los pacientes con ISS-I. A pesar de las notables diferencias en progresión y supervivencia, la toma de decisiones en cuanto a la mejor opción terapéutica en cada caso, es difícil basarla únicamente en este índice.

Más recientemente, el IMWG 2014 ha propuesto nuevos sistemas de estimación del riesgo, que incluyen la edad, una citogenética desfavorable y el ISS que permite diferenciar entre pacientes con riesgo bajo, intermedio y alto (Chng *et al.*, 2014). Los resultados de este trabajo obtenidos con este último sistema de clasificación se discuten con mayor detalle más adelante, donde se describe la capacidad predictiva de los modelos propuestos en este estudio, basados en parámetros de citometría en MO o en SP.

3 APORTACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MÉDULA ÓSEA AL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS GAMMAPATÍAS.

La **evaluación citomorfológica** de los aspirados de MO continúa siendo la metodología estándar en el diagnóstico y clasificación de las gammapatías, cuando se trata de estimar el grado de infiltración de CPs en MO y con ello, poder clasificar esta patología, principalmente en gammapatías benignas cuando el recuento no supera el 10% y hay ausencia de sintomatología clínica, o en mieloma cuando este recuento supera el 10%. Además, y a pesar de que ninguna dismorfia celular es patognomónica, esta sí que puede ofrecer información útil. No obstante, en las dos últimas décadas, el análisis inmunofenotípico mediante **citometría de flujo** ha venido a complementar los estudios citomorfológicos, gracias a que ofrecen información relevante sobre el grado de infiltración de la MO por CPs, su patrón fenotípico para discriminar la proporción de CPs aberrantes/clonales frente a las residuales sanas, la expresión de moléculas con valor pronóstico (CD28, CD117, etc.), la clonalidad de dichas células mediante el análisis de la inmunoglobulina citoplasmática y sobre la presencia de múltiples clonas tumorales, o incluso datos íntimos de la biología celular del tumor como son el grado de proliferación y de apoptosis (Rawstron *et al.*, 2008; Paiva *et al.*, 2010). Muchos de estos parámetros han demostrado tener un importante valor pronóstico tanto para la SLP como la SG (Pérez-Persona *et al.*, 2007; Paiva *et al.*, 2012). Además, la CMF se ha establecido como una técnica fundamental en la monitorización de la enfermedad mínima residual tras el tratamiento, por su gran valor predictivo (Rawstron AC *et al.*, 2002, 2008; Paiva *et al.*, 2009a, 2010).

Por todo ello, los análisis de citometría de flujo en MO se han establecido como esenciales en la práctica clínica de los pacientes con gammapatías. Sin embargo, las notables **diferencias en el recuento de CPs observado mediante citometría y citomorfolología** (Paiva *et al.*, 2009b) limitan en parte en su utilidad. Esta diferencia se ha atribuido a diversas causas, como hemodilución de la muestra, diferencias en los métodos de contaje, fragilidad o adherencia al plástico de la CP o su tendencia a asociarse a lípidos (Rawstron *et al.*, 2008) Hecho que se ha puesto también de manifiesto en el análisis de pacientes del presente estudio, donde el recuento de CPs

fue de $3.96 \pm 0.25\%$, $16.45 \pm 2.58\%$ y $33.91 \pm 2.90\%$ mediante citomorfología mientras que solo fue del $1.05 \pm 0.09\%$, $3.65 \pm 0.96\%$ y $10.79 \pm 1.90\%$ mediante citometría, respectivamente para MGUS, SMM y MM. A pesar de ello, se pudo demostrar que existía una correlación excelente entre los resultados obtenidos por ambos métodos, en los que los datos de esta serie ($r=0.503$, $p<0.001$) coinciden con los de Johnsen *et al.*, 2010 ($r=0.46$, $p<0.001$). Es más, fue posible establecer un **punto de corte en la frecuencia de CPs estimadas mediante citometría (1.78% de CPs)** que permitía discriminar MGUS de mieloma (SMM o MM) con una sensibilidad del 74,4% y una especificidad del 87,2%. La sensibilidad así calculada fue menor cuando se trataba de diferenciar SMM de MGUS (52,0%), pero claramente superior cuando se trataba de diferenciar MM de MGUS (84,9%).

Además, la citometría multiparamétrica se caracteriza por poder ofrecer un gran número de biomarcadores en tiempo y coste reducidos, por lo que a parte del recuento de CPs totales, ofrece otros parámetros que por sí solos o en diversas combinaciones, pueden ser igualmente de gran utilidad en diagnóstico y pronóstico. Entre estos parámetros, destaca la **proporción de CP aberrante $\geq 95\%$ dentro del compartimento global de CP (aCP/BMPC)** por su vinculación con el diagnóstico diferencial entre MGUS y Mieloma (Gressier M *et al.*, 2013) y la posibilidad de identificación de MGUS o SMM de alto riesgo (Paiva *et al.*, 2010; Gressier M *et al.*, 2013). Sin embargo, en esta serie aquí estudiada, la presencia de más del 95% de CPs aberrantes no ofrecía buena sensibilidad o especificidad para discriminar MGUS de Mieloma sino únicamente una tendencia a condicionar tasas de progresión y reducción de la SG en pacientes SMM y SMM+MM, que no alcanzaron en ningún caso la significación estadística. Por ello cabe pensar que desafortunadamente, el todavía reducido número de pacientes y el tiempo de seguimiento aun corto, no permite evaluar dicho parámetro en los pacientes con MGUS.

Otros parámetros con supuesto valor diagnóstico y pronóstico, como **CD28 y CD117** según Rawstron *et al.*, 2008, no resultaron informativos en los análisis preliminares de nuestra serie y, en consecuencia, fueron excluidos de los paneles de análisis, ya que incrementan el coste innecesariamente y se pudo constatar que la utilización de los marcadores **CD19, CD20, CD27, CD45 y CD56** era suficiente para poder diferenciar las CPs aberrantes de las sanas. El análisis individualizado de la

expresión de cualquiera de estos marcadores (CD19, CD20, CD27, CD45 y CD56) no aportaba información sobre el diagnóstico o pronóstico más que la de la ratio CPs aberrantes/CPs totales en MO. Algo similar ocurrió con el **estudio de la ploidía de las CPs mediante análisis de ADN** por citometría de flujo, que es también un parámetro pronóstico bien establecido en numerosos trabajos (Fonseca R *et al.*, 2004; Paiva *et al.*, 2012).

Por el contrario, otros parámetros como los **índices de proliferación y de apoptosis de CPs**, o su combinación en un **ratio proliferación/apoptosis**, sí ofrecieron resultados de gran utilidad en diagnóstico y pronóstico. Así, y como describe la bibliografía, se pudo evidenciar una relación inversa entre los índices de proliferación y apoptosis a medida que la patología incrementa su malignidad (Scudla V *et al.*, 2003, 2006). En efecto, las CPs de MO en controles sanos y pacientes con MGUS de nuestra serie presentaban cifras muy bajas de proliferación (por debajo del 1.5% de media) y elevadas de apoptosis (por encima del 9% de media), mientras que en los pacientes con mieloma (SMM+MM) esta relación se invertía pasando a presentar cifras más elevadas de proliferación (por encima del 2.3% de media) y más reducidas de apoptosis (por debajo del 4% de media). Esto permitió establecer **puntos de corte para diferenciar pacientes con gammapatía benigna (MGUS) de maligna (Mieloma)** tanto para el **índice de proliferación de CPs (1.1%)** como para el de **apoptosis de CPs (5.68%)** que ofrecieron sensibilidades (78.9% y 64.5%, respectivamente) y especificidades (62.6% y 78.1%, respectivamente) moderadas.

Estos puntos de corte aquí establecidos para proliferación de las células plasmáticas fueron muy similares a los descritos previamente (Scudla V *et al.*, 2006; Minarik J *et al.*, 2005, 2011). Sin embargo, los índices de apoptosis diferían ligeramente a la baja respecto a los descritos por otros trabajos (Scudla V *et al.*, 2006; Minarik J *et al.*, 2005, 2009, 2011). Aunque el método aquí utilizado para evaluar el índice de apoptosis de CPs fue similar al descrito en estos trabajos, las diferencias en los fluorocromos utilizados en la tinción de Anexina-V, V450 en nuestro caso frente FITC en otros, podrían explicar estas diferencias observadas, ya que el ruido o *background* de V450 es inferior al de FITC. Además, dado que este estudio incluyó muestras de 3 centros, con el objeto de minimizar el potencial impacto que el transporte y la demora pudiera tener en el índice de apoptosis de las CPs, al valor de apoptosis de las CPs

establecido como CPs Anexina-V+ se restó el índice de apoptosis de los linfocitos B CD19+ Anexina-V+, (considerado como valor basal de mortalidad celular de la MO). En definitiva, tal como parece corroborar la calidad de nuestros resultados, esta normalización ofrecía valores más reales de los índices de apoptosis de las CPs.

Para mejorar la sensibilidad y especificidad de estos parámetros, se aprovechó la relación inversa existente entre la proliferación y la apoptosis para establecer un **ratio proliferación/apoptosis con un punto de corte de 0.37** (resumido en la Tabla 40) que consiguió maximizar la sensibilidad (73.2%) y especificidad (79.1%). Estos valores mejoraron aún más cuando se pusieron en relación con la capacidad diagnóstica de la frecuencia de CPs totales detectadas por citometría, de tal manera que la utilización de valores de CPs totales superiores a 1.78% y ratios proliferación/apoptosis mayores a 0.37, permitía diferenciar las gammapatías malignas (SMM+MM) de benignas (MGUS) con una mayor sensibilidad (82.8%) y especificidad (83.5%).

Obviamente, estos valores hay que ponerlos aún en relación con la sintomatología clínica, lo que probablemente incrementará la sensibilidad y especificidad. Más aún, merece la pena destacar que estos resultados derivan de un simple análisis, de no más de 2 horas y con un coste reducido.

Pero además, y quizás más importante, puede ser que estos parámetros han demostrado tener gran valor predictivo sobre la evolución clínica de los pacientes. En este sentido, se han descrito por otros grupos que pacientes con alto índice de proliferación de sus CPs muestran peor pronóstico, con acortamiento de la SLP y SG (Scudla *et al.*, 2005, Paiva *et al.*, 2012; García-Sanz *et al.*, 2004). En concordancia con estos trabajos, las **cifras de proliferación de CPs mayor a 1.375%** en esta serie permiten **discriminar pacientes con tasas de progresión más elevadas** en SMM ($p=0.052$) y SMM+MM ($p=0.029$), así como una peor SG tanto en pacientes con SMM ($p=0.028$) como SMM+MM ($p=0.009$), que los pacientes que presentaban tasas proliferativas de CPs más reducidas. Quizás igualmente debido a diferencias en la metodología, los valores de corte previamente descritos por otros grupos de 2.9% y 2.8%, respectivamente para progresión y SG) (Scudla *et al.*, 2003; Minarik *et al.*, 2005) también fueron más elevadas que los aquí calculados. No obstante, esto es solo indicativo de que el valor de corte debe ser calibrado en cada laboratorio, pero una vez hecho, es capaz de ofrecer resultados de alto valor predictivo.

De igual modo, los datos de la presente serie para tasas de **apoptosis de CPs inferiores a 0.54%**, se asoció con una **progresión** ligeramente más elevada ($p>0.05$) y a una SG más reducidas en SMM ($p>0.05$), en MM ($p=0.018$) y SMM+MM ($p=0.009$), que la observada en pacientes con mayor tasa de apoptosis de CPs. Por otro lado, el uso de un punto de corte mayor correspondiente a 2.11% para la apoptosis de CPs y más próximo a los descritos en la bibliografía, sirvió para evidenciar que los perfiles de las curvas de supervivencia se mantuvieron en todos los grupos, aunque con ello se redujo la significación estadística. Es preciso también tener en cuenta que si al índice de apoptosis de CPs aquí establecido se le suma el valor sustraído de apoptosis en linfocitos B Anexina V positivos en cada paciente, la media global ascendía al 2% y ello redundaría en que el punto de corte de 0.57% se aproximara más a los puntos de corte descritos por otros grupos (Scudla *et al.*, 2003; Minarik *et al.*, 2005).

Si consideramos que el impacto que la proliferación y la apoptosis de CPs tienen sobre la progresión de la enfermedad y SG de los pacientes con gammapatías, no es más que el reflejo de la cinética de crecimiento neto de la masa tumoral, parece lógico, que si ambos parámetros considerados de forma aislada tienen capacidad predictiva, la combinación de ambos en un ratio proliferación/apoptosis, mejore su valor pronóstico. Los escasos trabajos publicados que utilizan esta ratio parecen confirmar dicha hipótesis (Scudla *et al.*, 2006), y son claramente confirmados por los resultados ahora observados en nuestra serie, donde **ratios de proliferación/apoptosis superiores de 1.77** se asocian a tasas de **progresión** más elevadas en SMM ($p=0.035$), MM y SMM+MM ($p<0.013$) y a una **SG** más reducida en SMM ($p=0.026$), como MM ($p=0.002$) y SMM+MM ($p<0.001$). Aunque el valor de corte de nuestro ratio (1.77) es en este caso superior a los descritos en la bibliografía (0.71, para Scudla *et al.*, 2006), simplemente es el reflejo de las cifras de apoptosis más reducidas que hemos manejado, al sustraer la apoptosis basal de las muestras de MO, representado como la apoptosis de linfocitos B.

Igualmente se ha podido poner en evidencia la existencia de una clara relación entre las alteraciones citogenéticas que presentan las CPs tumorales, y los índices de proliferación y apoptosis de las mismas. De esta manera, la presencia de cualquier tipo de alteración citogenética, exceptuando la hiperdiploidía, se ha podido asociar a masas tumorales más elevadas en el momento del diagnóstico, y salvo las

roturas de IGH y la hiperdiploidía, también a tasas proliferativas elevadas. Sin embargo, sólo las roturas de IGH y la delección de P53 parecen asociarse a reducciones significativas de la apoptosis de las células tumorales. En cuanto a las alteraciones que inducen las mayores tasas proliferativas, la delección de 13q o P53 y la amplificación de 1q, han sido las únicas que se han podido asociar a la frecuencia de CPs aberrantes circulantes en SP y que según se discute más adelante en el siguiente apartado, constituye un marcador pronóstico de progresión y supervivencia con alto valor predictivo.

En general, la presencia de las translocaciones del gen IGH, como la t(11;14) que involucra a BCL-1 (Roué *et al.*, 2008) y la t(4;14) que implica a FGFR3 (Trudel *et al.*, 2004), se caracteriza por reducir la sensibilidad a la apoptosis de las células tumorales. En concordancia con estos resultados, los pacientes con rotura IGH de nuestra serie (3 casos con IgH/BCL-1, 2 casos con IgH/FGFR3 y 2 casos con IgH/MAF) poseían al diagnóstico masas tumorales elevadas en el momento del diagnóstico, principalmente condicionado a su bajo índice de apoptosis, que parecían compensaron a su vez las bajas índice de proliferación. Y en particular fue evidente la delección de P53, alteración citogenética que en mieloma y en otros muchos tipos de cáncer se ha asociado a mal pronóstico (Fonseca R *et al.*, 2009). Nuestros resultados muestran que esta alteración implica altos índices de proliferación y bajos de apoptosis de las células tumorales que, aunque no se traduzcan en una infiltración de la MO más intensa que el resto de las alteraciones, si se traducen en una mayor diseminación vía SP y posiblemente hacia otros tejidos. Esto puede ser con gran probabilidad la causa principal de su impacto en la supervivencia, que ya claramente se evidente a los 3 años de seguimiento.

Los resultados descritos en la literatura sobre la posible relación entre las alteraciones citogenética y la proliferación celular en mieloma, son contradictorios. Así, Paiva *et al.*, en 2010, no encontraron asociación entre las alteraciones citogenéticas de alto riesgo evaluadas por FISH y los índices de proliferación de las CPs. Sin embargo, Rajkumar *et al.*, en 1999, sí encontraron una clara asociación entre alteraciones observadas por citogenética convencional y la actividad proliferativa de las células plasmáticas. Por otro lado, y en relación a las alteraciones citogenéticas detectadas por FISH y la actividad apoptótica de CPs, Linardi *et al.*, en 2012 tampoco fueron capaces de demostrar relación entre la delección de 13 y apoptosis.

El elevado valor predictivo que a nivel individual parecen tener los parámetros evaluados mediante citometría de flujo en MO sobre la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes con gammapatías, animó a explorar el valor pronóstico resultante de la combinación del **“porcentaje de CPs” y de la “ratio proliferación/apoptosis de las CPs”** y, a proponer un nuevo modelo de estimación del riesgo (Figura 51).

Al comparar el nuevo de estimación de riesgo propuesto con el establecido por los criterios propuestos por el IMWG en 2014 (Chng *et al.*, 2014) y que diferencia tres grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) en función de la edad, el ISS y la citogenética adversa (delección P53, t(4;14) y amplificación de 1q), permite observar que este **nuevo modelo** puede igualmente identificar tres grupos de riesgo, bajo, intermedio y alto sobretodo porque el análisis Kaplan Meier clara y muy significativamente diferencia entre: pacientes de **bajo riesgo** con cifras de CPs en MO<1.78%, **riesgo intermedio** con cifras de CPs en MO>1.78% y ratio proliferación/apoptosis < 1.77 y **riesgo alto** con cifras de CPs en MO>1.78% y ratio proliferación/apoptosis > 1.77. Esto queda claramente expresado y representado en la Figura 51 y la Tabla 42 donde se puede comprobar que ambos modelos (el aquí propuesto basado exclusivamente en parámetros de citometría de MO y el del IMWG que incluye parámetros citogenéticos, pueden definir tasas de progresión y SG bien diferenciadas para los tres grupos de riesgo. Aun así, conviene destacar la agilidad de los resultados de este nuevo modelo ya que en un plazo no mayor a 2 horas y con un coste mucho más reducido, se obtienen valores de predicción comparables en todos los casos e incluso ofrecer diferencias mucho más significativas entre los grupos de riesgo. Es igualmente importante resaltar que nuestro modelo, comparado con el del IMWG, permite además identificar pacientes de muy alto riesgo con tasas de supervivencia a tres años muy reducidas (33.3%), y en los que independientemente de la edad, se debería concentrar el mayor esfuerzo terapéutico tras el diagnóstico.

Aparentemente, este modelo basado en parámetros obtenidos por citometría en MO, podría ser de útil tanto en pacientes con SMM y en MM, aunque obviamente conviene verificar los resultados en series más amplias de pacientes con SMM clasificados según los nuevos criterios del IMWG (Chng *et al.*, 2014). Igualmente, queda pendiente de evaluar el valor predictivo en pacientes con MGUS, ya que el

reducido número de los mismos y el corto periodo de monitorización no ha limitado el abordaje de este análisis. Sin embargo, las bondades de este modelo son esperanzadoras sobre la utilidad que puede aportar para cualquier tipo de gammapatía, pues los parámetros en los que se asienta son el reflejo de la masa tumoral existente al diagnóstico (% CPs en MO) y la tasa neta de crecimiento del tumor (ratio proliferación/apoptosis).

Tal y como se ha podido evidenciar en este estudio, ambos parámetros parecen, además, estar en relación con las alteraciones citogenéticas que porta la célula tumoral, y por ello, tampoco es sorprendente que los resultados sean comparables a los observados con los criterios de riesgo del IMWG.

Además, este modelo basado en parámetros de MO evaluados por citometría es comparable al modelo de estimación de riesgo basado en la presencia de CPs aberrantes circulantes en SP, que también se propone en esta memoria. Igualmente, tampoco debe sorprender este hecho, ya que las alteraciones citogenéticas no solo parecen estar relacionadas con la masa tumoral al diagnóstico y la ratio proliferación/apoptosis, sino también con la diseminación de la enfermedad a través de la sangre.

Muy importante, y por último es el hecho de que el modelo propuesto de estimación del riesgo mediante el análisis combinado de la masa tumoral (% CPs en MO) y la tasa neta de crecimiento tumoral (ratio proliferación/apoptosis) medida mediante citometría de flujo en MO y, a diferencia de lo descrito para otros modelos en algunos estudios recientes (Paiva *et al.*, 2012), parece mantener su valor predictivo cualquiera que sea la terapia utilizada y que incluye por supuesto los nuevos tratamientos basados en Bortezomib o incluso el TASPE.

4 UTILIDAD PRONÓSTICA DE LOS ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN GAMMAPATÍAS

La serie de pacientes incluida en este estudio proceden de 3 hospitales, en los que la solicitud de estudios citogenéticos convencionales (cariotipo) no fue homogénea, de hecho solo se solicitó en 91 de los 164 pacientes. Aun así, hay concordancia con la bibliografía previa en el hecho de que debido a la baja proliferación de las CPs y a que existen anomalías cripticas, la citogenética convencional solo detecta alteraciones entre el 22-40% (Biran *et al.*, 2013). En similitud a estudios previos, en la serie aquí recogida la información fue muy limitada, pues del total de pacientes en los que se obtuvieron metafases para su análisis, solo en el 9.9% se detectaron alteraciones cromosómicas, algo en claro contraste con la información que aportó el análisis de FISH aplicado a célula plasmática purificada y con el que se pudo evidenciar al menos una alteración en el 43.1% de los pacientes.

Llama la atención que el porcentaje de alteraciones en el análisis citogenético fuera similar en los tres grupos de estudio (10%), mientras que las alteraciones observadas mediante FISH se incrementaban desde MGUS al MM (19.7% en MGUS, 61,9% en SMM y 71% en MM). Datos que parecen indicar que la obtención de metafases procedentes de células plasmáticas (y no de las células proliferativas sanas de la MO) sea independiente de la masa tumoral, del índice de proliferación o del de apoptosis de células plasmáticas, o de cualquier otro parámetro asociado a malignidad.

Dado que los estudios de citogenética convencional se realizaron en un centro externo, la información necesaria para evaluar las causas de tan reducido número de alteraciones citogenéticas observadas en esta serie queda fuera de nuestro alcance.

Por tanto, estos datos cuestionan la utilidad de solicitar estudios tan costosos y que lejos de contribuir a una correcta orientación del pronóstico, llevan generalmente a falsos negativos y por tanto a una infravaloración del mismo.

Hasta fechas recientes la utilidad de las alteraciones cromosómicas ha tenido valor principalmente cuando estas eran detectadas mediante citogenética convencional. Sin embargo, la irrupción otros métodos más rápidos y económicos de purificación de células plasmáticas en las que se puede aplicar la metodología FISH, ha llevado a

mejores y más sensibles resultados, y con mayor valor predictivo, tal y como atestiguan los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En efecto, al evaluar de forma aislada cada una de las alteraciones citogenéticas, permitió dejar patente que tanto la Aneuploidía, como la ganancia de 1q o la delección de p53 detectadas mediante FISH inferían un impacto negativo e independiente en la progresión de la enfermedad y en la SG de los pacientes, pero no así la delección de 13q. Estos resultados concuerdan con los descritos en la bibliografía (Rajkumar *et al.*, 2013), principalmente para delección de p53 (Fonseca *et al.*, 2009) y ganancia de 1q (Fonseca *et al.*, 2009; Neben *et al.*, 2013). Sin embargo, dichos resultados contrastan con los descritos para la aneuploidía, ya que lejos de ser un factor de riesgo, se describe como un factor de pronóstico más favorable (Paiva *et al.*, 2012).

Para una mejor interpretación de estos resultados, hay que tener en cuenta que con frecuencia las alteraciones citogenéticas no se presentan de forma aislada, sino que cada paciente puede presentar diversas combinaciones de los mismos. Por eso, en un intento de analizar el impacto real de cada una de estas alteraciones, se reclasificaron los pacientes en un solo tipo de estas alteraciones, teniendo en cuenta la anomalía citogenética de mayor impacto según una jerarquía establecida a tenor de lo descrito impacto pronóstico en la bibliografía (Nadiminti K *et al.*, 2013; Rajkumar 2015): p53 > 1q > 13q > IGH > Aneuploidía > Sin alteración. En esta nueva clasificación, los pacientes con delección p53 podían asociar cualquier otra alteración, pero serán clasificados como p53 y no entraran a formar parte de ningún otro grupo; los pacientes con amplificación 1q, podrían asociar cualquier otra alteración, pero no la delección de p53, y así sucesivamente. De esta manera, mediante análisis de Kaplan-Meier se consiguió demostrar que los pacientes con cualquiera de estas alteraciones presentaban porcentajes de progresión más elevados que los pacientes sin alteraciones, aunque solo la delección p53 y la amplificación 1q alcanzaba la significación estadística. La aneuploidía quedaba próxima a la significación estadística. Igualmente, solo la delección p53 y la amplificación 1q, llevaban a tasas de SG significativamente inferiores.

El presente estudio, como otros trabajos (Bacher *et al.*, 2010), pone además de manifiesto que anomalías cromosómicas que son consideradas eventos genéticos

secundarios en MM, como son las deleciones de 13q y p53, también estaban presentes en los pacientes con MGUS y SMM. Se puede afirmar que, la aplicación de la metodología FISH a muestras de célula plasmática purificada permite encontrar casi cualquier tipo de alteración citogenética y bajo cualquier forma de presentación clínica. Obviamente, la frecuencia de alteraciones, y en particular las de mal pronóstico como la deleción p53 y la amplificación 1q, se incrementaba con la mayor malignidad de la patología desde MGUS a MM. En cualquier caso, esta metodología de fácil y rápida realización en la mayoría de los pacientes, muestra resultados con un valor predictivo en la progresión de la enfermedad como con la SG de los pacientes.

La monitorización simultánea de la ploidía de las CPs mediante FISH y citometría de ADN, realizada en este estudio ha proporcionado evidencias que sugiere que los cromosomas analizados en gammapatías de forma rutinaria mediante FISH (cromosoma 5, 9, 13, 15, 14 y 17), se han seleccionado por ser las alteraciones numéricas de mayor impacto en la evolución clínica, y en particular en los pacientes con MM. De hecho, en una gran proporción de pacientes con MM en los que se detectó aneuploidía por citometría (que permite detectar alteración numérica de cualquiera de los 23 pares de cromosomas), se detectó igualmente mediante FISH (62.26% mediante citometría y 47.83% mediante FISH). Esta diferencia se multiplicó por 2 en el caso de SMM (68% vs. 30%) y por 3 en MGUS (43.37% vs. 15.28%), lo que sugiere que la aneuploidía observada en patologías más benignas probablemente se podría relacionarse con cromosomas cuyo impacto sobre la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes es menos relevante.

En efecto y al contrario de lo que ocurre con la aneuploidía determinada por FISH, la **aneuploidía evaluada mediante citometría** no parecía tener impacto negativo en la evolución clínica de los pacientes de ninguno de los grupos estudiados. Debido a que solo 1 de los 164 casos estudiados mediante citometría presentaba hipodiploidía, la presencia de aneuploidía en nuestro estudio pudo equipararse a hiperdiploidía y, se pudo concluir que, en general, la presencia de hiperdiploidía no parecía tener impacto negativo significativo en la evolución clínica de los pacientes. Sin embargo, cuando la **aneuploidía se determinaba mediante FISH** y afectaba a los cromosomas 5, 9, 13, 15, 14 y 17, ésta aparentemente impactaba de forma negativa e independiente tanto en la progresión de la enfermedad como en la SG de los pacientes. En un intento por

esclarecer esta contradicción con lo descrito previamente (Fonseca *et al.*, 2009; Nadiminti *et al.*, 2013), se revisaron los 39 pacientes con aneuploidía y se observaba que mostraban otras alteraciones concomitantes (7 monosomías, 6 con del 13q, 3 con amplificación 1q, 2 con delección P53 y 1 con rotura de IGH). Al comparar los pacientes con mieloma (SMM+MM) que tenían la hiperdiploidía en los cromosomas 5, 9, 13, 15, 14 y 17 como única alteración con el resto de pacientes con mieloma, encontramos que la hiperdiploidía analizada mediante FISH, al igual que la analizada mediante citometría, aparentemente no tenía impacto en la progresión de la enfermedad o la SG de los pacientes con mieloma de nuestra serie. No obstante, dado que la hiperdiploidía parece ser un factor de buen pronóstico bien establecido en la bibliografía, cabe pensar el hecho de que esta alteración no fuera relevante en nuestra serie, pudo ser debida al número reducido de pacientes con esta alteración o al escaso periodo de tiempo monitorizado, por lo será un punto interesante a comprobar en una serie más amplia y monitorizada durante mayor tiempo.

5 CITOMETRÍA DE FLUJO EN SANGRE PERIFERICA

La sangre periférica es la muestra más accesible en las primeras aproximaciones diagnósticas de las gammapatías, pudiéndose detectar en suero la presencia del componente monoclonal y con ello obtener la primera evidencia, y además, se pueden medir diferentes parámetros bioquímicos y hematimétricos de importante valor diagnóstico y pronóstico como la $\beta 2$ microglobulina, la albúmina, el calcio, la hemoglobina etc. Sin embargo, el valor predictivo de cualquiera de estos biomarcadores es limitado, siendo necesario proceder al aspirado de MO para acceder a una fuente más abundante de células tumorales donde realizar estudios cromosómicos y con ellos obtener parámetros de mayor valor.

En este sentido, las últimas recomendaciones del IMGW 2014 para establecer la mejor estratificación del riesgo se basan en descartar la presencia de alteraciones citogenéticas de mal pronóstico, como delección la P53, la t(4;14) o la amplificación de 1q. Sin embargo, resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que estas alteraciones cromosómicas se manifiestan en una serie de peculiaridades fenotípicas y biológicas que pueden ser igualmente de fácil evaluación, como son la capacidad proliferativa y apoptótica de las células portadoras de los mismos. Más aún, como se puede ver en la Figura 53, las alteraciones citogenéticas también median en la capacidad de diseminación del tumor a través de la SP, donde las alteraciones de mal pronóstico inducen cifras significativamente más elevadas de células CPs aberrantes circulantes. Este hecho, impulsó a evaluar la utilidad potencial que la determinación de CPs aberrantes podía aportar al diagnóstico y pronóstico en estas patologías de impacto creciente en nuestra envejecida población.

El papel de las CPs aberrantes circulantes en sangre periférica en las discrasias de células plasmáticas, ha venido siendo investigado desde 1993 (Witzig *et al.*, 1993) y de hecho se ha demostrado que pueden ser detectadas en la circulación al diagnóstico en un porcentaje relativamente alto (46-75%) en casos de MM (Rawstron *et al.*, 1997), en 50% de SMM y en un 25% de MGUS (Billadeau, *et al.*, 1996). Incluso se han detectado en productos de leucoaféresis después de la movilización (Kopp *et al.*, 2009) o previo al trasplante (Dingli D *et al.*, 2006) e incluso en el 92% en MM en recaída (Rawstron *et al.*, 1997). En el estudio aquí presentado se ha encontrado que el 40% de

los pacientes SMM y el 72% de los MM presentan aCPs circulantes al diagnóstico, lo que está en concordancia con lo descrito anteriormente en la literatura (Billadeau *et al.*, 1996; Rawstron *et al.*, 1997; Paiva *et al.*, 2010). Sin embargo, la presencia de aCPs circulantes en MGUS, fue ligeramente algo inferior a lo previamente descrito (Vagnoni *et al.*, 2015; Billadeau *et al.*, 1996; Sezer 2001). Este hecho podría justificarse sobre la base de que siguiendo los criterios de grupo español de mieloma, el 71% de los pacientes con MGUS incluidos en nuestro estudio no presentaban ningún factor de riesgo, el 26% sólo presentaban uno, y tan solo el 3% mostraba el mayor riesgo de progresión (2 factores de riesgo). Tal es así, que el curso clínico de los pacientes MGUS de nuestra serie ha sido benigno, con tan solo 3 pacientes en 3 años de seguimiento han progresado a estadios superiores pero sin fallecimientos. Por tanto, habida cuenta que tanto nuestros resultados como los ya descritos en la bibliografía (Bianchi *et al.*, 2013), proponen que la presencia de aCPs circulantes constituye un factor de mal pronóstico, la baja frecuencias de aCPs observada en nuestros pacientes de MGUS parece concordar con su favorable curso clínico.

Como novedad respecto a los estudios a los que hemos hecho referencia, en este trabajo se ha tratado de correlacionar la aparición de aCPs circulante con otros parámetros clínicos y biológicos del paciente. Así, se ha podido observar que el parámetro más estrechamente asociado a la presencia de aCPs circulantes fue el número de CPs totales en la histología ($p < 0.0001$), pero este parámetro aporta un riesgo relativamente pequeño ($OR = 1.054$), si se compara con el que aporta la citogenética de alto riesgo ($OR = 4.47$) o la delección de 13q ($OR = 6.25$). Parece pues razonable pensar, que una elevada masa tumoral y una citogenética adversa, como es la presencia de la delección p53, sean factores que incrementen la presencia de aCPs circulantes. Sin embargo, es en cierta medida contradictorio que la delección 13q se asocie tan fuertemente a la presencia de aCPs circulantes, dado que en principio los pacientes con dicha alteración muestran un curso clínico intermedio. Es posible que el número limitado de paciente de mieloma que portan dicha alteración, pueda haber influido en la estimación adecuada de su impacto clínico, por lo que sería conveniente proseguir los estudios para completar una serie más amplia que permita obtener conclusiones más seguras.

Igualmente de este estudio, y de otros (Vagnoni et al., 2015), se desprende que no solo la frecuencia de pacientes con aCPs circulantes en SP crece al aumentar la malignidad de la gammapatía, sino que también el número de aCPs detectadas en la sangre es mayor en los pacientes con patologías más graves. Aunque algunas evidencias (Billadeau et al., 1996) parecían indicar que el estudio de aCPs en SP no permitiría diferenciar formas benignas de malignas, nosotros quisimos explorar esta posibilidad, y en concordancia con otros estudios (Vagnoni et al., 2015; Gonsalves et al., 2014, Bianchi et al., 2013) conseguimos demostrar que era posible establecer un punto de corte de **CPs aberrantes de 0.0035%**, con una sensibilidad del 70.7% y una especificidad del 75%, para discriminar estas patologías. Es obvio que la sensibilidad y la especificidad de esta determinación por sí sola, no se puede considerar suficiente para ser de utilidad en la práctica clínica, pero también es cierto que se trata de un simple análisis en SP, poco invasivo con un coste muy reducido y que en media hora puede complementar las evidencias clínicas para una orientación apropiada de la enfermedad en cada paciente y en conjunto puede guiarnos para alcanzar diagnósticos con cierta precisión.

A pesar de esta limitación, el estudio aquí ha demostrado ser de gran utilidad pronóstica. De tal manera, que este punto de corte permite discriminar claramente entre dos grupos de pacientes de acuerdo a las cifras de aCPs en SP, uno con aCPs $\geq 0.0035\%$ y una evolución mucho más desfavorable, que implica mayor tasa de progresión y menor supervivencia y otro de mejor pronóstico en el que los valores de aCPs en SP quedan por debajo de ese valor de corte.

Es también importante el hecho que, aún con diferente grado de significación, este parámetro pueda ser de utilidad en pronóstico tanto de pacientes con SMM como en los MM. En la bibliografía, aparecen trabajos que apuntan en esta misma dirección que nuestros resultados, aunque el punto de corte estudiado puede diferir principalmente por el tipo de metodología y muy especialmente por la sensibilidad de la técnica. Así, se han propuesto puntos de corte que varían desde el 0.26% (Gonsalves et al., 2014), a 0.082% (Vagnoni et al., 2015) y al 0.02% (Nowakowski et al., 2005b) todos mayores que el definido en este trabajo. En cualquier caso es evidente que a medida que aumentan las cifras de aCPs en SP el pronóstico empeora, tal como se observa en nuestra serie (no se muestran estos datos). La elevada sensibilidad de

nuestra técnica quizás hizo posible que el un punto de corte hallado para definir el grupo de alto riesgo fuera más bajo y, maximizar así el número de pacientes en los que el modelo de detección de riesgo que aquí se propone permita diferenciar dentro del grupo de SMM+MM entre **pacientes con muy bajo riesgo** y supervivencia del 100% de 3 años y **pacientes con muy alto riesgo** con supervivencia del 51.5% a 3 años, al tiempo que minimiza el **grupo de riesgo intermedio** con supervivencia de 70.8% a tres años.

En definitiva, se puede decir que la presencia de aCPs en SP se comporta como un factor pronóstico independiente en pacientes con SMM y MM, y que en consecuencia, vuelve complementar otros parámetros pronósticos más clásicamente utilizados para evaluar las gammapatías como son la edad, la citogenética, el índice de proliferación celular o incluso el modelo de riesgo establecido por el IMWG. Como ocurre en este nuestro, muchos otros han comunicado también el valor pronóstico independiente del análisis de aCPs en SP tanto en MGUS (Kumar *et al.*, 2005; Nowakowski *et al.*, 2005), como en SMM (Bianchi *et al.*, 2013) y MM (Nowakowski *et al.*, 2005b, Gonsalves *et al.*, 2014). Sin embargo, y a pesar su gran valor pronóstico, simplicidad y economía el estudio rutinario de aCPs no termina de incorporarse a la práctica clínica, algo que sorprende más incluso, si se tiene en cuenta que este factor mantiene su gran valor predictivo, independientemente del número de líneas de tratamiento aplicadas a los pacientes, a la utilización de las nuevas terapias basada en Bortezomib o la inclusión del TASPE. De nuevo, estos resultados son refrendados por los descritos por Gonsalves *et al.*, 2014 demostrando que el número de aCP en SP detectadas por citometría continua siendo un factor pronóstico independiente en pacientes de nuevo diagnóstico de MM tratados con nuevos agentes. Como aquí, este último autor encuentra que la presencia de aCPs en SP impactaba de forma negativa tanto en pacientes que fueron o no tratados con TASPE. Junto a esto, Dingli *et al.*, en 2006 determinan que la presencia de aCP en el momento del trasplante es un factor de riesgo de progresión independiente.

A la vista de todos estos resultados en este trabajo se consideró muy interesante aplicar un modelo de estratificación de riesgo basado exclusivamente en parámetros de SP para pacientes con mieloma (SMM+MM) y que mostramos en la Figura 62. De manera que los pacientes fueron estratificados siguiendo los criterios

establecidos por IMWG (Chng *et al.*, 2014) pero sustituyendo la citogenética adversa por los de aCP en SP. En estas condiciones, ambos modelos ofrecen predicciones de progresión de la enfermedad y SG de los pacientes comparables, tanto para los pacientes de riesgo bajo, como medio o alto. Sin embargo, el modelo de aCPs en SP reduce el número de pacientes del grupo de riesgo intermedio (64% al 46%), y enriquece los pacientes de alto riesgo (23% a 42%), lo que permite identificar un número mayor de pacientes de alto riesgo y que podrían beneficiarse de terapias más apropiadas inmediatamente tras el diagnóstico. Estas cifras se mejoran aún más al incrementar la edad de corte sugerida por el IMWG de 55 a 65 años, de tal forma que aun ofreciendo predicciones de progresión y supervivencia comparables al modelo propuesto por el IMWG, el aquí propuesto muestra mayor capacidad para detectar pacientes de riesgo alto y bajo y reduce a la mitad los de riesgo estándar. En consecuencia, las diferencias de progresión y SG para los tres grupos de riesgo son mucho más evidentes en el modelo propuesto que el del IMWG.

En suma, lo largo de este estudio se han evaluado diversos modelos de predicción de riesgo en los pacientes afectados por gammapatías malignas, principalmente SMM y MM. De los datos obtenidos se desprende que tanto el modelo el modelo basado en el análisis por citometría de flujo en MO para determinar la masa tumoral (% CPs en MO) y la tasa neta de crecimiento tumoral (Ratio proliferación/apoptosis), o el modelo propuesto utilizando exclusivamente parámetros evaluados en SP (aCPs circulantes, ISS y edad), ofrecen información pronóstica de tanta utilidad como el modelo propuesto por el IMWG en 2014 que utiliza la edad, el ISS y la citogenética de alto riesgo. Así, aunque los tres modelos son perfectamente complementarios y de utilidad variable según qué circunstancias el presentado en este trabajo a priori resulta más rápido, más económico y económico y lo que resulta más importante menos molesto para el paciente.

Por contra, el modelo propuesto por el IMWG basado en citogenética es quizás el mejor establecido en la práctica clínica y académica (Chng *et al.*, 2014). Es un modelo que requiere muestras de MO y FISH en CPs purificada, pues la citogenética convencional no ofrece los resultados deseados. La FISH en CP purificada es una metodología cada vez más accesible, a costes moderados que ofrece resultados de utilidad en un plazo de unos pocos días en un porcentaje elevado de pacientes con

gammapatías, que en nuestra serie fue superior al 88%. Sin embargo, la relativamente baja frecuencia de alteraciones cromosómicas de mal pronóstico condujo a un modelo predictivo que clasifica gran número de pacientes con riesgo intermedio, y por tanto a una indeterminación sobre la mejor terapia a utilizar.

Partiendo de MO, la citometría de flujo ofrece gran número de parámetros a un precio considerablemente más reducido y que en 2 horas puede estar a disposición del clínico. Estos datos, sin embargo, no terminan de ser determinantes en el diagnóstico o el pronóstico del paciente, más allá de una confirmación rápida de una sospecha clínica de gammapatía. Sin embargo, los resultados se mueven en la indefinición sobre la patología del paciente, ya que es el recuento de CPs al microscopio óptico lo que las guías clínicas utilizan para diferenciar MGUS de Mieloma, además el otro dato con valor diagnóstico y pronóstico, como es la proporción de CPs aberrantes, al menos en nuestra serie, no ofrece la utilidad pronóstica y diagnóstica esperable. Sin embargo, hemos sido capaces de demostrar que aunque el recuento de CPs en MO por citometría de flujo difiere al de la microscopía (por diversas razones), ambos son claramente proporcionales y se ha podido establecer un valor de 1.78% de CPs en MO determinada por citometría, equivalente al 10% de CPs evaluadas por microscopía, que permite también diferenciar MGUS de Mieloma. Pero lo que es aún más interesante, es la utilización de este parámetro en combinación con otros parámetros igualmente extraídos del análisis citométrico de la MO, como son la proliferación y la apoptosis de la CPs. Los tres datos conjuntamente proporcionan de forma rápida y objetiva información sobre la masa tumoral al diagnóstico (% CPs en MO) y sobre la tasa de crecimiento neto del tumor (ratio proliferación/apoptosis), lo que nos ha permitido establecer un modelo con gran utilidad pronóstica de la progresión de la enfermedad y la SG de los pacientes con MM, y que además parece tener valor con independencia del tratamiento que se utilice, sea este de nueva generación o incluya el TASPE.

Por último, el modelo de predicción de riesgo más simple, rápido (30 minutos) y económico como ya se ha mencionado, pero no por ello menos informativo, es el basado en el recuento de aCPs en SP mediante citometría de flujo. La utilidad de este modelo es especialmente importante en pacientes de bajo riesgo (sin aCPs, ISS-I/II y edad menor a 65 años) y sin patologías asociadas a su gammapatía que puedan

comprometer su integridad, y en los que tras la detección del componente monoclonal en suero, el riesgo podría ser valorado mediante una simple extracción de sangre, sin necesidad de recurrir a la punción-aspiración de la MO. En estas circunstancias, los pacientes de bajo riesgo (26.7% en esta serie) tendrían una probabilidad de progresión del 23.8% a tres años y una SG del 100% a tres años. Otra evidencia importante de este trabajo es que en los pacientes sin aCPs e ISS-I/II, la edad podía incrementarse manteniéndose la SG del 100% a tres años. Por tanto, una actitud más conservadora con monitorización semestral o anual de la SP en estos pacientes de bajo riesgo, permitiría posponer o incluso evitar la evaluación del aspirado medular.

6 PAPEL DEL SISTEMA INMUNITARIO EN LAS GAMMAPATÍAS

El sistema inmunitario juega un papel crucial en la prevención del cáncer al reconocer específicamente antígenos tumorales o moléculas inducidas por estrés y con ello evitar la cronificación de infecciones y procesos inflamatorios propicios para la tumorigénesis y eliminar células transformadas (Swann *et al.*, 2007). Los linfocitos son las células principalmente implicadas en la respuesta antitumoral, y en particular los linfocitos T citotóxicos CD8+ desempeñan un papel preponderante en la eliminación de células infectadas y/o transformadas (Wood KL *et al.*, 2009). Un fenómeno muy extendido en el desarrollo tumoral y que apoya un papel relevante del sistema inmunitario en el control del cáncer, es la regulación a la baja de las moléculas HLA clase-I en la membrana de las células malignas cuyo objeto es propiciar la evasión de la acción citotóxica de los linfocitos TCD8+ específicos del tumor, ya que en ausencia de HLA-I hace imposible la presentación de antígenos tumorales y su reconocimiento por linfocitos T, evitando así el reconocimiento de antígenos tumorales específicos por los linfocitos T. Bajo estas circunstancias las células NK adquieren un papel relevante que guiadas por el reconocimiento de la pérdida de expresión de moléculas de HLA (pérdida de identidad o *Missing Self*), desencadenan su potencial citolítico anti-tumoral.

La función de ambos tipos de células, linfocitos T y NK, está finamente regulada por numerosas moléculas presentes en sus membranas celulares y, que al

interaccionar con sus ligandos correspondientes, dirigen el adecuado funcionamiento de unas células que por su “arsenal” citolítico podrían llegar a provocar lesiones tisulares en caso de mal funcionamiento. Resultados descritos en la bibliografía indican que la exposición antigénica crónica asociada a infecciones por VIH o CMV, mieloma u otras onco-hemopatías o enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, a menudo induce la expansión de linfocitos T CD8⁺CD57⁺ (Frassanito MA *et al.*, 1998, Van den Hove LE *et al.*, 1998; Sze DM *et al.*, 2001). Por ello, este estudio se enfocó también hacia la evaluación de la expresión de otras moléculas en las células TCD8⁺CD57⁺ que, como HLA-DR (HLA clase-II) o CD62L (L selectina), podrían ser indicativas de un mayor grado de activación o movilidad de dichos linfocitos. Mas algunas investigaciones han demostrado cambios significativos en las cifras de linfocitos T CD8⁺CD57⁺ en sangre periférica específicamente en pacientes con MM pero no en MGUS, y que otras han observado cambios similares en MGUS y MM al compararlos con controles sanos (Van den Hove, *et al.*, 1998). En concordancia con este segundo hallazgo, nuestros resultados parecen indicar que la expansión de la población de linfocitos T CD8⁺CD57⁺ en sangre periférica podría ser un fenómeno común a todas las gammopatías (benignas y malignas), aunque de forma más marcada en las malignas, mientras que la expansión de células T CD8⁺CD57⁺DR⁺ podría producirse más específicamente en los pacientes con mieloma, tanto SMM como MM. Es importante destacar que esta población de células T es heterogénea en términos de su capacidad replicativa y apoptótica (Strioga *et al.*, 2011), y que tanto en mieloma como en otras enfermedades onco-hematológicas (Frassito *et al.*, 1998) su expansión se han relacionado con un efecto inmunosupresor y un incremento en la apoptosis de los linfocitos efectoras de sangre periférica, lo que podría redundar en la potenciación de la inmunodeficiencia asociada a MM y otros tipos de cáncer. Por otro lado, estos resultados concuerdan también con los descritos previamente por nuestro grupo sobre el enriquecimiento de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD28⁻ en células que expresan CD57, en receptores de trasplante hepático que muestran una predisposición a la buena aceptación del injerto y por tanto, para una respuesta inmunitaria más tolerante (Blanco-García R M *et al.*, 2011). Hay que destacar igualmente que los linfocitos CD8⁺CD28⁻ suelen sobreexpresar receptores KIR y que como se expone a

continuación, también guardan relación con la regulación de la respuesta anti-tumoral de las células NK y de algunos subtipos de linfocitos T.

Por eso, uno de los objetivos iniciales fue valorar si la cuantificación de células T CD8+ que expresaban CD57, o DR o CD62L podrán tener valor diagnóstico a la hora de diferenciar gammapatías benignas y malignas, de manera que fuera de utilidad rápida en la clínica. Sin embargo, comparado con el valor para diagnóstico y pronóstico de la monitorización de la presencia de aCPs en SP, la evaluación de linfocitos T CD8+CD57+DR+ resultó ser un parámetro mucho más modesto o incluso poco operativo para estos fines. No obstante, y como resultado novedoso, si se ha podido demostrar que existe una relación directa entre las cifras de linfocitos T CD8+CD57+DR+ y la masa tumoral o las cifras de aCPs circulantes en SP. Este dato confirmaría la hipótesis de que la expansión de estas células se debe principalmente a la exposición antigénica crónica que es proporcional a la masa tumoral y, que incide en la supresión de la respuesta antitumoral y con ello en la potenciación de la inmunodeficiencia asociada a gammapatía que progresará según lo hace la estadificación clínica.

Aun así, estos resultados hay que interpretarlo en un marco más amplio y tener en cuenta el notable impacto que la malignización de las células plasmáticas tiene en el microambiente medular. De hecho la médula ósea es la fuente principal de células del sistema inmunitario y, en este trabajo se ha puesto de manifiesto que a medida que la enfermedad progresa, se perturban de forma progresiva y significativa la maduración de neutrófilos y linfocitos B (ver tablas 28 y 29). Así, se observan cifras descendentes de neutrófilos inmaduros CD66+CD13- y de linfocitos B *naïve* o vírgenes CD19+IgM+ según se avanza en el grado de malignidad de la gammapatía, lo que unido al incremento de linfocitos T CD8+ y concretamente los CD8+CD57+ podría estar favoreciendo la instauración de un microambiente supresor en la médula que favorecería el escape tumoral y agravaría de forma secundaria los síntomas de inmunodeficiencia asociada al incremento tumoral.

Otras moléculas que regulan la actividad citolítica/funcional de los linfocitos T TCD3+CD4+ y CD3+CD8+ y células NK CD3-CD56+ en las que se ha centrado el análisis son los receptores KIR, concretamente las moléculas inhibitoras KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y la activadora KIR2DS1. Todos ellos, receptores que tienen como ligandos,

diferentes alelos HLA-C. Sin embargo, y a pesar del importante papel que estas moléculas juegan en la función de las células citolíticas, no se encontraron diferencias claramente significativas en las cifras de linfocitos T o células NK que expresaban dichos receptores KIR al comparar los grupos de pacientes con el grupo control, ni entre los grupos de pacientes. Tampoco la presencia de estas células se ha encontrado asociada con la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes. En este sentido, es importante destacar que en paralelo a este trabajo se ha realizado un estudio en la misma serie de pacientes, en el que se ha analizado la diversidad de genes KIR y las posibles interacciones de los receptores KIR con sus ligandos HLA específicos, cuyos resultados han dado lugar a un trabajo aceptado para publicación (Martínez-Sánchez MV *et al.*, 2015) en el que se demuestra que lo que condiciona la susceptibilidad y la progresión de la enfermedad no son las cifras de linfocitos T o NK que expresan KIR, sino la cualidad de estas células en términos de si han recibido o no la apropiada educación al interactuar con sus ligandos específicos. Además la veracidad de esta hipótesis, se ha podido comprobar al estimar la presencia del ligando específico del único KIR activador analizado en el presente trabajo, KIR2DS1+, que tiene como ligandos específicos alelos HLA-C C2 del grupo C2 (datos no publicados del Servicio de Inmunología) que efectivamente no son las cifras de células NK que expresan KIR2DS1 las que parecen relacionarse con el control de la aparición de gammapatías malignas, si no las células NK KIR2DS1+ que de forma efectiva pueden interactuar con su ligando C2 y con ello activar las células NK. Así, mientras que las cifras de células NK KIR2DS1+ se mantienen en niveles muy similares entre controles y pacientes que no portan su ligando específico HLA-C2, las células NK KIR2DS1+ decrecen significativamente en pacientes en los que estas células son realmente funcionales y pueden interactuar con su ligando HLA-C2. Más importante aún ha sido la observación de que por diferencias en la frecuencia génica de KIR2DS1 en pacientes de los diferentes grupos de gammapatías, ya que la frecuencia génica de KIR2DS1 fue similar en controles, MGUS y mielomas (SMM+MM) tanto en individuos HLA-C2 positivos como para los HLA-C2 negativos. Por tanto, los pacientes con mieloma presentan de forma intrínseca cifras de células NK con potencial actividad anti-tumoral siempre que KIR2DS1+ se halle en presencia de su ligando activador HLA-C2,

significativamente reducidas, comparadas tanto al grupo control como a los pacientes con gammapatías benignas.

Para comprender adecuadamente la relevancia de estos resultados, hay que tener en cuenta que con el envejecimiento de la población en los países occidentales, la creciente incidencia de las gammapatías va a requerir de nuevas estrategias terapéuticas para atender al creciente número de pacientes refractarios incluso a los más modernos y eficaces tratamiento.

Los datos aquí recogidos proporcionan información que podría ser de utilidad de para el diagnóstico y el pronóstico para el diseño de nuevas terapias celulares basadas en el control de células NK o T citotóxicos así como para potenciar el efecto injerto contra mieloma mediante una mejor selección de donantes haploidénticos para el trasplante de células progenitoras.

VI CONCLUSIONES

1 CONCLUSIONES

De los datos obtenidos en este estudio, cabe concluir:

1. Se ha demostrado la existencia de una estrecha relación entre las cifras de CPs detectadas por microscopía y por citometría. Entre ambos métodos se ha establecido una equivalencia entre el 10% de CPs evaluadas por microscopía y el 1.78% evaluadas por citometría. Con este valor es posible diferenciar gammapatías benignas (MGUS) de las agresivas (SMM y MM) con una sensibilidad del 74.4% y especificidad del 87.2%.
2. La citometría de flujo en MO ofrece diversos parámetros de gran valor pronóstico. Entre ellos, el porcentaje de CPs en MO representativo de la masa tumoral y el cociente proliferación/apoptosis de CPs del crecimiento neto del tumor. Con ellos, se ha podido establecer un modelo predictivo para mieloma que discrimina pacientes con riesgo bajo, medio y alto de progresión de la enfermedad y SG, en función de cifras de CPs $\geq 1.78\%$ e índices de proliferación/apoptosis ≥ 1.77 , que minimiza además la frecuencia de pacientes clasificados como riesgo intermedio.
3. La expresión de CD28 o la de CD117 en CPs, así como la proporción CPs de fenotipo aberrante en MO o la hiperdiploidía no han ofrecido resultados informativos.
4. La hibridación in situ fluorescente en CP purificada ha resultado más sensible y con mayor valor predictivo que el cariotipo convencional, con la delección de P53 y la amplificación de 1q como principales marcadores de mal pronóstico para la progresión y la supervivencia.
5. Existe una relación directa de las alteraciones citogenéticas con la capacidad proliferativa y apoptótica de las CPs, con la masa tumoral y con la presencia de CPs aberrantes en sangre. Todas las alteraciones citogenéticas, excepto la aneuploidía, se asocian a cargas tumorales elevadas, mientras la rotura de IGH lo hace con índices apoptóticos bajos, la delección 13q y la ganancia 1q a índices proliferativos elevados y la delección de P53 a apoptosis reducida y proliferación elevada. La delección P53, la ganancia 1q y la delección 13q se asocian principalmente y en ese orden a la presencia de CPs de fenotipo aberrante en sangre periférica.

6. Porcentaje de CPs aberrantes en sangre periférica $\geq 0.0035\%$, permiten discriminar gammapatías benignas (MGUS) de malignas (SMM y MM) con una sensibilidad del 70.7% y una especificidad del 75.0% y, establecer un modelo de predicción de riesgo en mieloma basado exclusivamente en parámetros de sangre periférica. Este modelo permite discriminar pacientes con riesgo bajo, medio y alto de progresión de la enfermedad y SG y minimiza la frecuencia de pacientes clasificados como riesgo intermedio.
7. La predicción de riesgo mediante parámetros analizados por citometría de flujo bien en MO o en sangre periférica, mantiene su valor pronóstico con independencia del tipo de tratamiento administrado a los pacientes con mieloma, incluido el TASPE.
8. La cuantificación en sangre periférica de células T CD8⁺ que expresan CD57, CD62L y/o HLA-DR en pacientes con discrasias de células plasmáticas parece tener escasa utilidad en el diagnóstico y el pronóstico. Sin embargo, la expansión de linfocitos T CD8⁺CD57⁺DR⁺ se ha podido asociar con la frecuencia CPs de fenotipo aberrante en sangre periférica y con la carga tumoral en MO.
9. La presencia del ligando que media en la educación funcional de las células NK y en particular la del ligando específico para KIR2DS1, HLA-C2, parece condicionar la susceptibilidad para padecer mieloma, más que la expresión de receptores KIR2D inhibidores (KIR2DL1, KIR2L2/S2 y KIR2DL3) o activadores (KIR2DS1). Aunque las cifras de células NK KIR2DS1⁺ fueron similares en todos los grupos de estudio, en presencia de su ligando HLA-C2, el número de estas células se redujo significativamente en pacientes afectados de mieloma, lo que podría implicar una menor actividad anti-tumoral.

VII REFERENCIAS

- Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:440–452.
- Alici E, Sutlu T, Björkstrand B, Gilljam M, Stellan B, Nahi H, et al. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3155-3162.
- Anderson KC. New insights into therapeutic targets in myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011:184-90
- Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 2002 May 17;296(5571):1323-1326.
- Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, Riley EM. Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2003;171(10):5396–405.
- Attal M, Harousseau JL, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet JG, Monconduit M, Hulin C, Caillot D, Bouabdallah R, Voillat L, Sotto JJ, Grosbois B, Bataille R; InterGroupe Francophone du Myélome. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003 Dec 25;349(26):2495-502.
- Augustson BM, Begum G, Dunn JA, Barth NJ, Davies F, Morgan G, Behrens J, Smith A, Child JA, Drayson MT. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002--Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 20;23(36):9219-9126.
- Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C, Callet-Bauchu E, Terré C, Lafage-Pochitaloff M, Désangles F, Ramond S, Talmant P, Bataille R. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the InterGroupe Francophone du Myélome and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):822-825.
- Bacher U, Haferlach T, Kern W, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach C. Correlation of cytomorphology, immunophenotyping, and interphase fluorescence in situ hybridization in 381 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 301 patients with plasma cell myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Dec;203(2):169-75

- Bahler DW, Hartung L, Hill S, Bowen GM, Vonderheid EC. CD158k/KIR3DL2 is a useful marker for identifying neoplastic T-cells in Sezary syndrome by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;74B(3):156–162.
- Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:277-300.
- Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica.* 2006 Sep;91(9):1234-1240.
- Bedel R, Thiery-Vuillemin A, Grandclement C, Balland J, Remy-Martin JP, Kantelip B, Pallandre JR, Pivot X, Ferrand C, Tiberghien P, Borg C. Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):1615-1626.
- Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood.* 2010 Sep 30;116(13):2286-2294.
- Benson DM Jr, Bakan CE, Zhang S, Collins SM, Liang J, Srivastava S, et al. IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. *Blood.* 2011 Dec 8;118(24):6387-6391.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 10;23(26):6333-6338.
- Besson C, Roetyncck S, Williams F, Orsi L, Amiel C, Lependeven C, Antoni G, Hermine O, Brice P, Ferme C, Carde P, Canioni D, Brière J, Raphael M, Nicolas JC, Clavel J, Middleton D, Vivier E, Abel L. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. *PLoS ONE.* 2007;2(5):e406.
- Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One.* 2010 Aug 6;5(8):e11966.
- Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, Witzig TE, Kumar S, Dispenzieri A et al. 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.

- Biassoni R, Pessino A, Malaspina A, Cantoni C, Bottino C, Sivori S, Moretta L, Moretta A. Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol*. 1997 Dec;27(12):3095-3099.
- Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, Kyle RA, Therneau TM, Greipp PR, Witzig TE. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood*. 1996 Jul 1;88(1):289-296.
- Biran N, Jagannath S, Chari A. Risk stratification in multiple myeloma, part 1: characterization of high-risk disease. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2013 Aug;11(8):489-503.
- Bladé J, Cibeira MT, Fernández de Larrea C, Rosiñol L. Multiple myeloma. *Ann Oncol*. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii313-319.
- Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, Fernandez Larrea C. Pathogenesis and progression of gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2008;22:1651-1657.
- Bladé J, Rosiñol L. Changing paradigms in the treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 2008; 111.3968-3977.
- Blanco-García RM, López-Álvarez MR, Garrido IP, Salgado-Cecilia G, Campillo JA, Bolarín JM, Legaz I, Muro M, García-Alonso AM, Martínez-Sánchez MV, Moral JM, Pascual-Figal DA, Alvarez-López MR, Miras M, Minguela A. CD28 and KIR2D receptors as sensors of the immune status in heart and liver transplantation. *Hum Immunol* 2011;72(10):841-8.
- Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Apr;54(4):307-3014.
- Bochner BS, Gleich GJ. What targeting eosinophils has taught us about their role in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jul;126(1):16-25; quiz 26-27.
- Bogen B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol*. 1996 Nov;26(11):2671-2679.
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):467-4678.

- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:175-208.
- Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 2003 Aug 18; 198(4):557-567.
- Boyton RJ, Smith J, Ward R, Jones M, Ozerovitch L, Wilson R, Rose M, Trowsdale J, Altmann DM. HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(3):327-333.
- Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol*. 2009 Apr;30(4):143-149.
- Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3388-3394.
- Bruno Paiva, Norma C. Gutiérrez, Laura Rosiñol, María-Belén Vídriales, María-Ángeles Montalbán, Joaquín Martínez-López et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):687-91
- Butsch Kovacic M, Martin M, Gao X, Fuksenko T, Chen CJ, Cheng YJ, Chen JY, Apple R, Hildesheim A, Carrington M. Variation of the killer cell immunoglobulin-like receptors and HLA-C genes in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Nov;14(11 Pt 1):2673-2677.
- Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B, Venuta S. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):251-258.
- Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, Herrero R, Rodriguez AC, Kurman R, Mortel R, Schwartz P, Glass A, Hildesheim A. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1069-1075.
- Cetin M, Buyukberber S, Demir M, Sari I, Sari I, Deniz K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in multiple myeloma: association with reduced survival. *Am J Hematol*. 2005 Nov;80(3):169-173.

- Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):267-285.
- Chng WJ, Dispenzieri A, Chim C-S, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, Munshi N, Palumbo A, Miguel JS, Sonneveld P, Cavo M, Usmani S, Durie BGM, Avet-Loiseau H. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* (2014) 28, 269–277.
- Cook M, Briggs D, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, Fegan C, Darbyshire P, Lawson S, Boxall E, Moss P. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood.* 2006;107(3):1230–1232.
- Cooper MA, Yokoyama WM. Memory-like Responses of Natural Killer Cells. *Immunol Rev.* 2010 May; 235(1): 297–305.
- Dai Y, Hamm TE, Dent P, Grant S. Cyclin D1 overexpression increases the susceptibility of human U266 myeloma cells to CDK inhibitors through a process involving p130-, p107- and E2F-dependent S phase entry. *Cell Cycle.* 2006 Feb;5(4):437-446.
- Dalyot-Herman N, Bathe OF, Malek TR. Reversal of CD8+ T cell ignorance and induction of anti-tumor immunity by peptide-pulsed APC. *J Immunol.* 2000 Dec 15;165(12):6731-6737.
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993 Sep 1;178(3):1041-1048.
- Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* 2001 Jul 1;98(1):210-216.
- 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):427-36.
- 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):3384-8.

- Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, Clark RJ, Melton LJ 3rd, Gertz MA, Kumar SK, Fonseca R, Jelinek DF, Rajkumar SV. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 785–789.
- Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol.* 2006;90:51-81.
- Einhorn S, Ahre A, Blomgren H, Johansson B, Mellstedt H, Strander H. Interferon and natural killer activity in multiple myeloma. Lack of correlation between interferon-induced enhancement of natural killer activity and clinical response to human interferon-alpha. *Int J Cancer.* 1982 Aug 15;30(2):167-172.
- El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, Cook G, Feyler S, Richards SJ, Davies FE, Morgan GJ, Cook GP. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8444-8449.
- 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.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
- Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood.* 2005 Jun 1;105(11):4416-4423.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD Jr, Stewart AK, Avet-Loiseau H. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1546-58.
- 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 molecular classification of multiple mieloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-2221.

- 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.
- Frassanito MA, Silvestris F, Cafforio P, Dammacco F. CD8+/CD57 cells and apoptosis suppress T-cell functions in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1998;100:469-477.
- Frassanito MA, Silvestris F, Cafforio P, Silvestris N, Dammacco F. IgG M-components in active myeloma patients induce a down-regulation of natural killer cell activity. *Int J Clin Lab Res*. 1997;27(1):48-54.
- Fritz E, Ludwig H. Interferon-alpha treatment in multiple myeloma: meta-analysis of 30 randomised trials among 3948 patients. *Ann Oncol*. 2000 Nov;11(11):1427-1436.
- Frohn C, Höppner M, Schlenke P, Kirchner H, Koritke P, Luhm J. Anti-myeloma activity of natural killer lymphocytes. *Br J Haematol*. 2002 Dec;119(3):660-664.
- Gandhi AK, Kang J, Capone L, Parton A, Wu L, Zhang LH, Mendy D, Lopez-Girona A, Tran T, Sapinoso L, Fang W, Xu S, Hampton G, Bartlett JB, Schafer P. Dexamethasone synergizes with lenalidomide to inhibit multiple myeloma tumor growth, but reduces lenalidomide-induced immunomodulation of T and NK cell function. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 Mar;10(2):155-167.
- García-Sanz R, González-Fraile MI, Mateo G, Hernández JM, López-Berges MC, de las Heras N, Fernández-Calvo J, Ortega F, Portero JA, Báñez A, Galende J, Orfão A, San Miguel JF. Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients. *Int J Cancer*. 2004 Dec 10;112(5):884-889.
- Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:130-142.
- Gazit R, Garty BZ, Monselise Y, Hoffer V, Finkelstein Y, Markel G, Katz G, Hanna J, Achdout H, Gruda R, Gonen-Gross T, Mandelboim O. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood*. 2004;103(5):1965-1966.
- Gherman M, Manciulea M, Bancu AC, Sulica A, Stanworth DR, Herberman RB. Regulation of human natural cytotoxicity by IgG--I. Characterization of the structural site on monomeric IgG responsible for inhibiting natural killer cell activity. *Mol Immunol*. 1987 Jul;24(7):743-750.
- Gisslinger H. Interferon alpha in the therapy of multiple myeloma. *Leukemia*. 1997 Dec;11 Suppl 5:S52-556.

- Godfrey J, Benson DM Jr. The role of natural killer cells in immunity against multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2012 Sep;53(9):1666-1676.
- 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):500-5
- Görgün G, Calabrese E, Soydan E, Hideshima T, Perrone G, Bandi M, et al. Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2010 Oct 28;116(17):3227-3237.
- Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, Oken MM, Kay NE, Van Ness B, Kyle RA. Plasmablastic morphology. An independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. *Blood* 1998; 91:2501–2507.
- Greipp PR, Lust JA, O’Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* 1993; 81:3382–3387.
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-3420.
- Gressier M, Chaquin M, Lhermitte L, Asnafi V, Macintyre E, Brouzes C. [Utility of 8-colours multiparameter flow cytometry immunophenotyping of plasma cells for the management of monoclonal gammopathy]. *Annales de biologie clinique*. 2013 May-Jun;71(3):313-323.
- Hall PD, Self SE, Hall RK. The interaction of maintenance interferon with cytolytic cells in patients with multiple myeloma who responded to cytotoxic chemotherapy. *Pharmacotherapy*. 1997 Mar-Apr;17(2):248-255.
- Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91:3-21.
- Hallett WH, Ames E, Motarjemi M, Barao I, Shanker A, Tamang DL, Sayers TJ, Hudig D, Murphy WJ. Sensitization of tumor cells to NK cell-mediated killing by proteasome inhibition. *J Immunol*. 2008 Jan 1;180(1):163-710.

- Hebraud B, Leleu X, Lauwers-Cances V, Roussel M, Caillot D, Marit G, et al. Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):675-679.
- Herberman RB. Natural killer (NK) cells and their possible roles in resistance against disease. *Clin Immunol Rev*. 1981;1(1):1-65.
- Herrington LJ, Weiss NS, Olshan AF. Epidemiology of myeloma. In: myeloma: Biology and management. 3rd ed. Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA, Anderson KC. Eds Saunders. Philadelphia 2004. pg 117-157.
- Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2008;23(4):972-976.
- Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004 200:957-965.
- Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:585-598.
- Hillengass J, Moehler T, Hundemer M. Monoclonal gammopathy and smoldering multiple myeloma: diagnosis, staging, prognosis, management. Recent results in cancer research. *Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*. 2011;183:113-131.
- Hiwase DK, Hiwase S, Bailey M, Bollard G, Schwarzer AP. Higher infused lymphocyte dose predicts higher lymphocyte recovery, which in turn, predicts superior overall survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Jan;14(1):116-124.
- Hoang B, Zhu L, Shi Y, Frost P, Yan H, Sharma S, et al. Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4484-4490.
- Holt D, Ma X, Kundu N, Fulton A. Prostaglandin E(2) (PGE (2)) suppresses natural killer cell function primarily through the PGE(2) receptor EP4. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Nov;60(11):1577-86.
- Hsi ED, Steinle R, Balasa B, Szmania S, Draksharapu A, Shum BP, Huseni M, et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2775-2784.

- Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 2002 Dec;190:40-52.
- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Apr;2(4):277-288.
- Jakubowiak A. Management strategies for relapsed/refractory multiple myeloma: current clinical perspectives. *Semin Hematol* 2012; 49 (Suppl 1): S16–S32.
- Jakubowiak AJ, Siegel DS, Martin T, Wang M, Vij R, Lonial S, Trudel S, Kukreti V, et al. Treatment outcomes in patients with relapsed and refractory multiple myeloma and high-risk cytogenetics receiving single-agent carfilzomib in the PX-171-003-A1 study. *Leukemia.* 2013 Dec;27(12):2351-2356.
- Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adjé-Touré CA, Vuylsteke B, Nkengasong JN, Kestens L. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol.* 2006;177(10):6588–6592.
- Jimenez-Zepeda VH, Mikhael J, Winter A, Franke N, Masih-Khan E, Trudel S, Chen C, Kukreti V, Reece DE. Second autologous stem cell transplantation as salvage therapy for multiple myeloma: impact on progression-free and overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 May;18(5):773-779.
- Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai YT, Prabhala RH, Ritz J, Neuberg D, Anderson KC, Carrasco DR, Dranoff G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 29;105(4):1285-1290.
- Johnsen HE, Bøgsted M, Klausen TW, Gimsing P, Schmitz A, Kjaersgaard E, Damgaard T, Voss P, Knudsen LM, Mylin AK, Nielsen JL, Björkstrand B, Gruber A, Lenhoff S, Remes K, Dahl IM, Fogd K, Dybkaer K; Nordic Myeloma Study (NMSG); Myeloma Stem Cell Network (MSCNET). Multiparametric flow cytometry profiling of neoplastic plasma cells in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Sep;78(5):338-347.
- Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol.* 2009;182:4572–4580.
- Jonsson AH, Yang L, Kim S, Taffner SM, Yokoyama WM. Effects of MHC Class I Alleles on Licensing of Ly49A+ NK Cells. *J Immunol.* 2010;184:3424–2432.

- Karlsen TH, Boberg KM, Olsson M, Sun JY, Senitzer D, Bergquist A, Schrupf E, Thorsby E, Lie BA. Particular genetic variants of ligands for natural killer cell receptors may contribute to the HLA associated risk of primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* 2007;46(5):899–906.
- Katz G, Gazit R, Arnon TI, Gonen-Gross T, Tarcic G, Markel G, Gruda R, Achdout H, Drize O, Merims S, Mandelboim O. MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J Immunol.* 2004 Aug 1;173(3):1819-1825.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science.* 2004 Aug 6;305(5685):872-874.
- Kim H, Sohn HJ, Kim S, Kim K, Lee JH, Bang SM, Kim DH, Sohn SK, Lee JJ, Suh C. New staging systems can predict prognosis of multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation as first-line therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006 Aug;12(8):837-844.
- Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):709-713.
- Kitawaki J, Xu B, Ishihara H, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Mizuno S, Ohta M, Obayashi H, Honjo H. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with susceptibility to endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(6):481–486.
- Klein J, Sato A. The HLA system. First of Two Parts. *N Engl J Med.* 2000 Sep 7;343(10):702-709.
- Komiyama K, Crago SS, Itoh K, Moro I, Mestecky J. Inhibition of natural killer cell activity by IgA. *Cell Immunol.* 1986 Aug;101(1):143-155.
- Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood.* 2011 May 26;117(21):5573-5581.
- Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mulé J, Kerr WG, Jove R, Pardoll D, Yu H. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med.* 2005 Dec;11(12):1314-1321.

- Kröger N, Shaw B, Iacobelli S, Zabelina T, Peggs K, Shimoni A, et al. Clinical Trial Committee of the British Society of Blood and Marrow Transplantation and the German Cooperative Transplant Group. Comparison between antithymocyte globulin and alemtuzumab and the possible impact of KIR-ligand mismatch after dose-reduced conditioning and unrelated stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005 Jun;129(5):631-43.
- Kröger N, Zabelina T, Berger J, Duske H, Klyuchnikov E, Binder T, et al. Donor KIR haplotype B improves progression-free and overall survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia*. 2011 Oct;25(10):1657-1661.
- Kuehl WM, Bergsagel PL. Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:346-352.
- Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol*. 2008 Dec;20(6):343-352.
- Kumar A, Kharfan-Dabaja MA, Glasmacher A, Djulbegovic B. Tandem versus single autologous hematopoietic cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 100–106.
- Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Hayman SR, Buadi FK, Dingli D, Knudson RA, Greenberg A, Russell SJ, Zeldenrust SR, Lust JA, Kyle RA, Bergsagel L, Rajkumar SV. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*. 2012 Mar 1;119(9):2100-5.
- 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.
- Kyle RA, Child J. A, Anderson K., Barlogie B., Bataille Regis, Bensinger W et al. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003 Jun; 121(5):749-757.
- Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N et al. International Myeloma Working Group. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and

- guidelines for monitoring and management. *Leukema*. 2010 Jun;24(6):1121-1127.
- Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003 Jan; 78(1):21-33.
 - Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 2006b;134, 573–589.
 - 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.
 - 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.
 - Lacy MQ, Kumar SK, LaPlant BR, Laumann K, Gertz MA, Hayman SR, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone (pom/dex) in relapsed myeloma: long term follow up and factors predicting outcome in 345 patients. *Blood* 2012; 120, abstract 201.
 - Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L et al. Mayor tumor encogimiento y persistentes moleculares remisiones después de la consolidación con bortezomib, talidomida y dexametasona en pacientes con autoinjertadas mieloma. *J Clin Oncol* 2010 20 de abril; 28 (12): 2077-84
 - Ladetto M, Vallet S, Trojan A, Dell'Aquila M, Monitillo L, Rosato R, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4784-2791.
 - Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR, Caporaso NE, Blimark C, Mellqvist UH, Wahlin A, Bjorkholm M, Turesson I. Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders among 14621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. *Blood* 2009 Jul 23;114(4):791-779.
 - Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, Beane Freeman LE, Cerhan JR, Katzmann JA, Rajkumar SV, Alavanja MC. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood* 2009b Jun 18;113(25):6386-6391.

- Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009c May 28;113(22):5412-5417.
- Landgren O, Rajkumar SV, Pfeiffer RM, Kyle RA, Katzmann JA, Dispenzieri A, Cai Q, Goldin LR, Carporaso NE, Fraumeni JF, Blot WJ, Signorello LB. Obesity is associated with an increased risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance among black and white women. *Blood* 2010; 116:1056-1059.
- Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma: new insights into pathophysiology and epidemiology. American society of hematology. *Hematology* 2010b;295-302.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23: 225-274.
- Levinson RD, Du Z, Luo L, Monnet D, Tabary T, Brezin AP, Zhao L, Gjertson DW, Holland GN, Reed EF, Cohen JH, Rajalingam R. Combination of KIR and HLA gene variants augments the risk of developing birdshot chorioretinopathy in HLA-A*29-positive individuals. *Genes Immun*. 2008 Apr;9(3):249-258.
- Linardi CC, Martinez G, Velloso ED, Leal AM, Kumeda CA, Buccheri V, Azevedo RS, Peliçario LM, Dorlhiac-Llacer P. Evaluation of chromosomal abnormalities by clg-FISH and association with proliferative and apoptotic indexes in multiple myeloma. *Braz J Med Biol Res*. 2012 Nov;45(11):1074-9.
- Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990 Jul;11(7):237-244.
- Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, Lanier LL, Hecht FM, Nixon DF, Barbour JD. Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2008 May;82(10):4785-4792.
- López-Botet M, Bellón T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 301-7.
- Lu ZY, Zhang XG, Rodriguez C, Wijdenes J, Gu ZJ, Morel-Fournier B, Harousseau JL, Bataille R, Rossi JF, Klein B. Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. *Blood*. 1995 May 1;85(9):2521-2527.
- Ludwig H, Avet-Loiseau H, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Cavo M et al. European perspective on multiple myeloma treatment strategies: update following recent congresses. *Oncologist*. 2012;17(5):592-606
- Ludwig H, Bolejack V, Crowley J, Bladé J, Miguel JS, Kyle RA, Rajkumar SV, Shimizu K, Turesson I, Westin J, Sonneveld P, Cavo M, Boccadoro M, Palumbo

- A, Tosi P, Harousseau JL, Attal M, Barlogie B, Stewart AK, Durie B. Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 20;28(9):1599-1605.
- Ludwig H, Durie BG, Bolejack V, Turesson I, Kyle RA, Blade J et al. Myeloma in patients younger than age 50 years presents with more favorable features and shows better survival: an analysis of 10 549 patients from the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4039-4047.
 - Ludwig H, Durie BG, McCarthy P, Palumbo A, San Miguel J, Barlogie B, Morgan G, Sonneveld P, Spencer A, Andersen KC, Facon T, Stewart KA, Einsele H, Mateos MV. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood* 2012b; 119: 3003–3015.
 - Ludwig H, Miguel JS, Dimopoulos MA, Palumbo A, Garcia Sanz R, Powles R, et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. *Leukemia*. 2014 May;28(5):981-892.
 - Luszczek W, Mańczak M, Cisko M, Nockowski P, Wiśniewski A, Jasek M, Kuśnierczyk P. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol*. 2004 Jul;65(7):758-766.
 - Markasz L, Stuber G, Vanherberghen B, Flaberg E, Olah E, Carbone E, et al. Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Mol Cancer Ther*. 2007 Feb;6(2):644-654.
 - Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, Colombo S, Brown EE, Shupert WL, Phair J, Goedert JJ, Buchbinder S, Kirk GD, Telenti A, Connors M, O'Brien SJ, Walker BD, Parham P, Deeks SG, McVicar DW, Carrington M. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*. 2007 Jun;39(6):733-740.
 - Martínez-Sánchez MV, Periago A, Legaz I, Gimeno L, Mrowiec A, Montes-Barqueros NR, Campillo JA, Bolarin JM, Bernardo MV, López-Álvarez MR, González C, García-Garay MC, Muro M, Cabañas-Perianes V, Fuster JL, García-Alonso AM, Moraleda JM, Álvarez-Lopez MR, Minguela A. Overexpression of KIR inhibitory ligands (HLA-I) determines that immunosurveillance of myeloma depends on diverse and strong NK cell licensing. Aceptada en *Oncoimmunology* 2015.
 - Mateos M-V, et al. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev* (2015).
[http:// dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.06.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.06.001)
 - Mateos M-V, Ocio EM, Paiva B, Rosiñol L, Martínez-López J, Bladé J, Lahuerta JJ, García-Sanz R, San Miguel JF. Treatment for patients with newly diagnosed

- multiple myeloma in 2015. *Blood Rev.* 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.06.001>
- Mateos MV, Oriol A, Martínez-López J, Gutiérrez N, Teruel AI, López de la Guía A, López J, et al. Maintenance therapy with bortezomib plus thalidomide or bortezomib plus prednisone in elderly multiple myeloma patients included in the GEM2005MAS65 trial. *Blood* 2012; 120: 2581–2588.
 - Mellqvist UH, Gimsing P, Hjertner O, Lenhoff S, Laane E, Remes K, et al. Nordic Myeloma Study Group. Bortezomib consolidation after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a Nordic Myeloma Study Group randomized phase 3 trial. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4647-4654.
 - Méndez A, Granda H, Meenagh A, Contreras S, Zavaleta R, Mendoza MF, Izquierdo L, Sarmiento ME, Acosta A, Middleton D. Study of KIR genes in tuberculosis patients. *Tissue Antigens*. 2006 Nov;68(5):386-389.
 - Millar BC, Bell JB. 2',5'-Oligoadenylate synthetase levels in patients with multiple myeloma receiving maintenance therapy with interferon alpha 2b do not correlate with clinical response. *Br J Cancer*. 1995 Dec;72(6):1525-1530.
 - Min B. Basophils: what they 'can do' versus what they 'actually do'. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1333-1339.
 - Minarik J, Scudla V, Ordeltova M, Bacovsky J, Pika Tlangovak. Prognostic significance of apoptotic index in multiple myeloma patients treated by conventional therapy and novel agents, thalidomide and bortezomib. *Eur J Haematol*. 2009 Dec 1;83(6):528-534.
 - 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.
 - 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.
 - Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):656-663.
 - Møller HE, Preiss BS, Pedersen P, Kristensen IB, Hansen CT, Frederiksen M, Abildgaard N, Møller MB. Clinicopathological features of plasmablastic multiple myeloma: a population-based cohort. *APMIS*. 2015 Aug;123(8):652-658.

- Momot T, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE, Witte T. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1561–1565.
- Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, Moine P, Bourin P, Moos M, Corre J, Möhler T, De Vos J, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2006 Dec 15;108(13):4194-4197.
- Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):764-771.
- Moretta L, Locatelli F, Moretta A. Alloreactive natural killer cells in targeting high-risk leukaemias. *Ann Rheum Dis.* 2008 Dec;67 Suppl 3:iii39-43.
- Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE, Bell SE, Szubert AJ, Brown JM, Coy NN, Cook G, Russell NH, Rudin C, Roddie H, Drayson MT, Owen RG, Ross FM, Jackson GH, Child JA; National Cancer Research Institute Haematological Oncology Clinical Studies Group. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood.* 2012 Jan 5;119(1):7-15.
- Morice WG, Kurtin PJ, Leibson PJ, Tefferi A, Hanson CA. Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;120(6):1026–1036.
- Moța G, Galatiuc C, Popescu I, Hirt M, Cialăcu V, Sulică A. IgA monoclonal and polyclonal proteins as regulatory factors of the NK cytotoxic activity. *Rom J Virol.* 1999 Jan-Dec;50(1-4):17-31.
- Mothy B, El-Cheikh J, Yakoub-Agha I, Avet-Loiseau H, Moreau P, Mothy M. Treatment strategies in relapsed and refractory multiple myeloma: a focus on drug sequencing and ‘retreatment’ approaches in the era of novel agents. *Leukemia* 2011; 26: 73–85.
- Nadiminti K, Zhan F, Tricot G. Abnormalities in Multiple Myeloma-A Review. Cytogenetics and Chromosomal. *Clon Transgen* (2013)2: 114.
- Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):106-113.
- Naumova E, Mihaylova A, Stoitchkov K, Ivanova M, Quin L, Toneva M. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients:

- prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(2):172–178.
- Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge heterozygote advantage in autoimmune disease: Hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 2004 173:4273–4276.
 - Nielsen H, Nielsen HJ, Tvede N, Klarlund K, Mansa B, Moesgaard F, Drivsholm A. Immune dysfunction in multiple myeloma. Reduced natural killer cell activity and increased levels of soluble interleukin-2 receptors. *APMIS.* 1991 Apr;99(4):340-346.
 - Nowakowski GS, Morice WG, Phylly RL, Li CY, Tefferi A. Human leucocyte antigen class I and killer immunoglobulin-like receptor expression patterns in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;128(4):490–492.
 - 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.* 2005b Oct 1;106(7):2276-9.
 - Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2233-2238.
 - Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Bladé J, González M, García-Sanz R, López-Berges C, Moro MJ, Hernández J, Escibano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol.* 1998 Jun;152(6):1655-1665.
 - Ogmundsdóttir HM. Natural killer cell activity in patients with multiple myeloma. *Cancer Detect Prev.* 1988;12(1-6):133-143.
 - Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance. *Cell.* 2010 Sep 17;142(6):847-856.
 - 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):239-2352.
 - Paiva B, Vidriales MB, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, Sureda A et al. GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica

- en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood*. 2009a Nov 12;114(20):4369-4372.
- Paiva B, Vidriales MB, Montalbán MÁ, Pérez JJ, Gutiérrez NC, Rosiñol L et al. Multiparameter flow cytometry evaluation of plasma cell DNA content and proliferation in 595 transplant-eligible patients with myeloma included in the Spanish GEM2000 and GEM2005<65y trials. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1870-1878.
 - Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, Mateo G, Montalbán MA, Mateos MV, Bladé J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica*. 2009b Nov; 94(11): 1599–1602.
 - Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011 Mar 17;364(11):1046-1060.
 - Palumbo A, Rajkumar S, San Miguel S, Larocca A, Niesvizky R, Morgan G et al. International Myeloma Working Group Consensus Statement for the Management, Treatment, and Supportive Care of Patients With Myeloma Not Eligible for Standard Autologous Stem-Cell Transplantation. *J Clin Onc*. 2014, Feb20; 32(6):587-600
 - Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005 Mar;5(3):201-214.
 - Paust S, Senman B, von Andrian UH. Adaptive Immune Responses Mediated by Natural Killer Cells. *Immunol Rev*. 2010 May ; 235(1): 286–296.
 - Pavlova Y, Kolesar L, Striz I, Jabor A, Slavcev A. Distribution of KIR genes in the Czech population. *Int J Immunogenet*. 2008 Feb;35(1):57-61.
 - Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro MJ, Martín-Nuñez G, Galende J, et al. A. Spanish Network on multiple myeloma (G03/136); Spanish Network of Cancer Research Centers (C03/10) Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia*. 2005 Mar;19(3):449-455.
 - Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, et al. 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; 110: 2586–2592.
- Porrata LF, Gastineau DA, Padley D, Bundy y Markovic SN. Re-infused Autologous Graft Natural Killer Cells Correlates with Absolute Lymphocyte Count Recovery after Autologous Stem Cell Transplantation. *Leukemia & Lymphoma*, 2003, Vol. 44, No. 6 : Pages 997-1000.
 - Porrata LF, Inwards DJ, Lacy MQ, Markovic SN. Immunomodulation of early engrafted natural killer cells with interleukin-2 and interferon-alpha in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Oct;28(7):673-680.
 - Porrata LF, Markovic SN. Timely reconstitution of immune competence affects clinical outcome following autologous stem cell transplantation. *Clin Exp Med*. 2004 Oct;4(2):78-85.
 - Pottern LM, Gart JJ, Nam JM, Dunston G, Wilson J, Greenberg R, Schoenberg J, Swanson GM, Liff J, Schwartz AG. HLA and multiple myeloma among black and white men: evidence of a genetic association. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1992 Mar-Apr;1(3):177-182.
 - Powell N, Walker MM, Talley NJ. Gastrointestinal eosinophils in health, disease and functional disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Mar;7(3):146-156.
 - Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007 Sep;138(5):563-579.
 - Price P, Witt C, de Santis D, French MA. Killer immunoglobulin-like receptor genotype may distinguish immunodeficient HIV-infected patients resistant to immune restoration diseases associated with herpes virus infections. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;45(3):359–361.
 - Quach H, Ritchie D, Stewart AK, Neeson P, Harrison S, Smyth MJ, Prince HM. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010 Jan;24(1):22-32.
 - Raja KR, Kovorova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol*. 2010; 149(3):334-351.
 - Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1025-1029.
 - Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014 Nov;15(12):e538-48.

- Rajkumar SV, Gupta V, Fonseca R, Dispenzieri A, Gonsalves WI, Larson D, Ketterling RP, Lust JA, Kyle RA, Kumar SK. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013 Aug;27(8):1738-44.
- Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011. Vol 8 :479-491.
- Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):520-531.
- Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, Tran HK, Tran T, Nguyen N, Truong LX, Theodorou I, Barré-Sinoussi F, Pancino G, Paul P. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4296-4305.
- Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3095-3100.
- Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdickova L, Brooimans RA, Bumbea H et al. 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.
- Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997 Apr;97(1):46-55.
- Reece D, Song K, LeBlanc R, Mezzi K, Olujohungbe A, White D, Zaman F, Belch A. Efficacy and safety of busulfan-based conditioning regimens for multiple myeloma. *Oncologist*. 2013;18(5):611-618.
- Renedo M, Arce I, Rodríguez A, Carretero M, Lanier LL, López-Botet M, Fernández-Ruiz E. The human natural killer gene complex is located on chromosome 12p12-p13. *Immunogenetics*. 1997;46(4):307-311.
- Romagné F, André P, Spee P, Zahn S, Anfossi N, Gauthier L, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood*. 2009 Sep 24;114(13):2667-2677.
- Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 2001 (246); 19:3562-3571.

- Roodman GD. Pathogenesis of mieloma bone disease. *Leukemia* 2009;23:435-441.
- Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*. 1999 Mar;10(3):281-287.
- Rosiñol L, Bladé J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Montoto S, Giné E, Nadal E, Filella X, Queralt R, Carrió A, Montserrat E. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol*. 2003 Nov;123(4):631-636.
- Rosiñol L, Cibeira MT, Montoto S, Rozman M, Esteve J, Filella X, Bladé J. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc*. 2007 Apr;82(4):428-434.
- Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, Hernández D, López-Jiménez J, de la Rubia J, Granell M, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood*. 2012 Aug 23;120(8):1589-1596.
- Roué G, Pichereau V, Lincet H, Colomer D, Sola B. Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators. *Oncogene* 2008;27:4909-4920.
- Roussel M, Moreau P, Huynh A, Mary JY, Danho C, Caillot D et al. Bortezomib and high-dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with de novo multiple myeloma: a phase 2 study of the *Intergroupe Francophone du Myelome* (IFM). *Blood* 2010; 115: 32–37
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002 Mar 15;295(5562):2097-2100.
- Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:202-128.
- San Miguel JF, García-Sanz R, González M y Orfao A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1996; Sep;23(1-2):33-41.
- San Miguel JF, Garcia-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. En: *bests practice & Research clinical haematology*. Advances in the Biology and management of plasma cell dyscrasias 2005; 18: 569-583.

- 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.
- 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.
- 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.
- Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. 2001 Aug;86(8):837-43.
- Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. B. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2276-2284.
- Shi FD, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren HG. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *J Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):3099-3104.
- Shi J, Tricot GJ, Garg TK, Malaviarachchi PA, Szmania SM, Kellum RE, Storrie B, et al. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1309-1137.
- Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*. 2004 Dec;64(6):631-649.
- Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyan D, Parham P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol*. 2002 Mar 1;168(5):2307-15.
- Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, et al. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Br J Haematol*. 2006 Sep;134(6):596-601.

- Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet.* 2007 Sep;39(9):1114-1119.
- Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo AA, Fremont DH, Yokoyama WM. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8826-8831.
- Snyder MR, Lucas M, Vivier E, Weyand CM, Goronzy JJ. Selective activation of the c-Jun NH2-terminal protein kinase signaling pathway by stimulatory KIR in the absence of KARAP/DAP12 in CD4+ T cells. *J Exp Med.* 2003 Feb 17;197(4):437-449.
- Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, Iannitto ML, Ricciardi MR, Di Gialleonardo V, et al. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood.* 2009 Apr 9;113(15):3503-3511.
- Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 3;95(3):1178-1183.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711.
- Storkus WJ, Alexander J, Payne JA, Dawson JR, Cresswell P. Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr;86(7):2361-2364.
- Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011 Sep;134(1):17-32.
- Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, Muto M. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1133-1136.
- Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007 May 1; 117(5): 1137-1146.
- Sze DM, Giesajtis G, Brown RD, Raitakari M, Gibson J, Ho J, Baxter AG, Fazekas de St Groth B, Basten A, Joshua DE. Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8(+)/CD57(+)/CD28(-) compartment. *Blood.* 2001; 98:2817-2827.

- Tai YT, Li XF, Catley L, Coffey R, Breitskreutz I, Bae J, Song W, Podar K, Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Treon SP, Grewal IS, Munshi NC, Anderson KC. Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications. *Cancer Res.* 2005 Dec 15;65(24):11712-11720.
- Tanner J, Tosato G. Impairment of natural killer functions by interleukin 6 increases lymphoblastoid cell tumorigenicity in athymic mice. *J Clin Invest.* 1991 Jul;88(1):239-247.
- Terragna C, Durante S, Zamagni E, Petrucci MT, Patriarca F, et al. Molecular remission after bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) compared with thalidomide-dexamethasone (TD) as consolidation therapy following double autologous transplantation (ASCT) for multiple myeloma (MM): results of a qualitative and quantitative analysis. *Haematologica* 2011; 96: S96 (abstract P-224).
- 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.
- Torres-García D, Barquera R, Zúñiga J. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR): Structure, function and relevance in disease susceptibility. *Rev Inst Natl Enf Resp Mex* 2008; 21 (1).
- Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3725-3729.
- Trotta R, Dal Col J, Yu J, Ciarlariello D, Thomas B, Zhang X, et al. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):3784-3792.
- Trudel S, Ely S, Farooqi Y, Affer M, Robbiani DF, Chesi M, Bergsagel PL. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood* 2004;103:3521-3528.
- Uchida A, Colot M, Micksche M. Suppression of natural killer cell activity by adherent effusion cells of cancer patients. Suppression of motility, binding capacity and lethal hit of NK cells. *Br J Cancer.* 1984 Jan;49(1):17-23.
- Vachon CM, Kyle RA, Therneau TM, Foreman BJ, Larson DR, Colby CL, Phelps TK, Dispenzieri A, Kumar SK, Katzmann JA, Rajkumar SV. Increased risk of monoclonal gammopathy in first-degree relatives of patients with multiple

- myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2009 Jul 23;114(4):785-790.
- Vagnoni D, Travaglini F, Pezzoni V, Ruggieri M, Bigazzi C, Dalsass A, et al., Circulating plasma cells in newly diagnosed symptomatic multiple myeloma as a possible prognostic marker for patients with standard-risk cytogenetics. *Br J Haematol*. 2015 Aug;170(4):523-31
 - Valés-Gómez M, Reyburn HT, Mandelboim M, Strominger JL. Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors. *Immunity*. 1998 Sep;9(3):337-344.
 - Van den Hove LE, Meeus P, Derom A, Demuyneck H, Verhoef GE, Vandenberghe P, Boogaerts MA. Lymphocyte profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: flow-cytometric characterization and analysis in a two-dimensional correlation biplot. *Ann Hematol*. 1998 Jun;76(6):249-256.
 - Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Boogaerts MA, Ceuppens JL. CD57+/CD28- T cells in untreated hemato-oncological patients are expanded and display a Th1-type cytokine secretion profile, EX VIVO cytolytic activity and enhanced tendency to apoptosis. *Leukemia*.1998;12:1573-82.
 - Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes*.2003;52(10):2639-2642.
 - Van Rhee F, Szmania SM, Dillon M, van Abbema AM, Li X, Stone MK, et al. Combinatorial efficacy of anti-CS1 monoclonal antibody elotuzumab (HuLuc63) and bortezomib against multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2009 Sep;8(9):2616-2624.
 - Vande Broek I, Vanderkerken K, Van Camp B, Van Riet I. Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:325-334.
 - Velardi A, Ruggeri L, Mancusi A. Killer-cell immunoglobulin-like receptors reactivity and outcome of stem cell transplant. *Curr Opin Hematol*. 2012 Jul;19(4):319-323.
 - Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia*. 2004;18(12):2002-2007.
 - Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* (2002) 20:217-251.

- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503-510.
- Volkman A, Gowans JL. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br J Exp Pathol*. 1965 February; 46(1): 62–70.
- Waheed S, Mitchell A, Usmani S, Epstein J, Yaccoby S, Nair B, et al. Standard and novel imaging methods for multiple myeloma: correlates with prognostic laboratory variables including gene expression profiling data. *Haematologica*. 2013 Jan;98(1):71-8
- Wang S, Zhao YR, Jiao YL, Wang LC, Li JF, Cui B, Xu CY, Shi YH, Chen ZJ. Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360(3):696–701.
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*. 2004 Jan;10(1):48-54.
- Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113(22):5418-5422.
- Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*. 2006 Feb;16(1):3-15.
- 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):108-13.
- Witzig TE. Detection of malignant cells in the peripheral blood of patients with multiple myeloma: clinical implications and research applications. *Mayo Clin Proc*. 1994 Sep;69(9):903-907.
- Wood KL, Twigg HL III, Doseff AI. Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14: 3771-3781.
- Woodworth CD. HPV innate immunity. *Front Biosci*. 2002 Oct 1;7:d2058-2071.
- Wu X, Shao Y, Tao Y, Ai G, Wei R, Meng X, Hou J, Han Y, Zhan F, Zheng J, Shi J. Proteasome inhibitor lactacystin augments natural killer cell cytotoxicity of myeloma via downregulation of HLA class I. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 11;415(1):187-192.

- Yan WH, Lin A, Chen BG, Zhou MY, Dai MZ, Chen XJ, Gan LH, Zhu M, Shi WW, Li BL. Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57(4):233–242.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):633-645.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2369-8230.
- Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Gorozny JJ. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2001;193(10):1159–1167.
- Yokoyama WM, Scalzo AA. Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes Infect*. 2002 Dec;4(15):1513-21.
- Yu J, Wei M, Becknell B, Trotta R, Liu S, Boyd Z, Jaung MS, Blaser BW, Sun J, Benson DM Jr, Mao H, Yokohama A, Bhatt D, Shen L, Davuluri R, Weinstein M, Marcucci G, Caligiuri MA. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity*. 2006 May;24(5):575-590.
- Yu YY, Kumar V, Bennett M. Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:189-213.
- Zambello R, Falco M, Della Chiesa M, Trentin L, Carollo D, Castriconi R, Cannas G, Carlomagno S, Cabrelle A, Lamy T, Agostini C, Moretta A, Semenzato G, Vitale M. Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1797-1805.
- 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.

