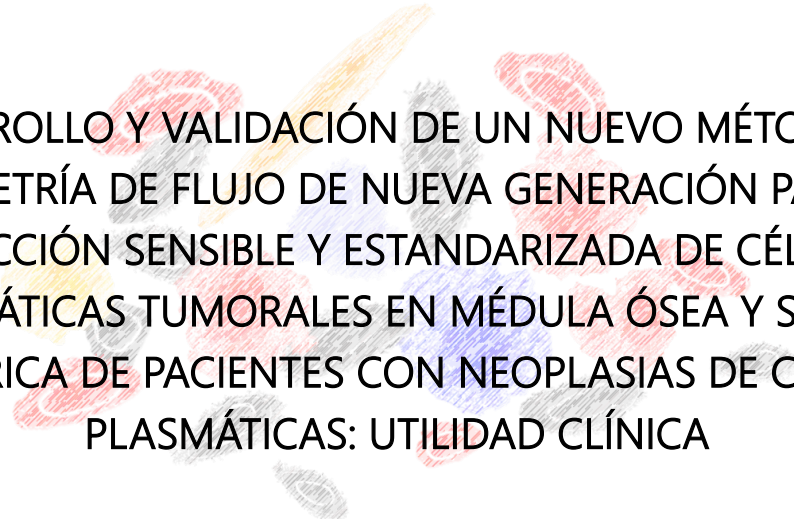


Departamento de Medicina
Centro de Investigación del Cáncer
Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca
Programa de doctorado en Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional

Tesis Doctoral



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO DE NUEVA GENERACIÓN PARA LA
DETECCIÓN SENSIBLE Y ESTANDARIZADA DE CÉLULAS
PLASMÁTICAS TUMORALES EN MÉDULA ÓSEA Y SANGRE
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON NEOPLASIAS DE CÉLULAS
PLASMÁTICAS: UTILIDAD CLÍNICA

Luzalba Sanoja Flores

Directores:

José Alberto Orfao de Matos
María Victoria Mateos Manteca

Tutor: Martín Pérez y Andrés

Salamanca, 2020



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

D. José Alberto ORFÃO DE MATOS CORREIA E VALE, Doctor en Medicina y Cirugía, y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por Dña. Luzalba del Carmen SANOJA FLORES titulado *“Desarrollo y validación de un nuevo método de citometría de flujo de nueva generación para la detección sensible y estandarizada de células plasmáticas tumorales en médula ósea y sangre periférica de pacientes con neoplasias de células plasmáticas: Utilidad clínica”*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Salamanca a 08 de junio de 2020.

Fdo.: Prof. José Alberto Orfão de Matos Correia e Vale

Dña. María Victoria MATEOS MANTECA, Doctora en Medicina y Cirugía, Hematóloga e Investigadora asociada al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi dirección por Dña. Luzalba del Carmen SANOJA FLORES, titulado *“Desarrollo y validación de un nuevo método de citometría de flujo de nueva generación para la detección sensible y estandarizada de células plasmáticas tumorales en médula ósea y sangre periférica de pacientes con neoplasias de células plasmáticas: Utilidad clínica”*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Salamanca a 08 de junio de 2020.



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

D. Martín PÉREZ Y ANDRÉS, Doctor en Medicina y Cirugía, y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado en formato de compendio de artículos bajo mi tutoría por Dña. Luzalba del Carmen SANOJA FLORES, titulado *“Desarrollo y validación de un nuevo método de citometría de flujo de nueva generación para la detección sensible y estandarizada de células plasmáticas tumorales en médula ósea y sangre periférica de pacientes con neoplasias de células plasmáticas: Utilidad clínica”*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Salamanca a 08 de junio de 2020.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se ha contado con el apoyo (financiación por proyectos, utilización de infraestructuras y/o cesión de muestras) de las siguientes instituciones:

- Fundación Internacional del Mieloma (IMF), "*Black Swan Research Initiative*" (Los Ángeles, Estados Unidos): IMF13/ IMF16
- Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad)-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional): DTS15/00119
- Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Valladolid: SA079U14
- Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC)
- CIBERONC (Instituto de Salud Carlos III): CB16/12/00400, CB16/12/00233, CB16/12/00369 y CB16/12/00489
- Servicio General de Citometría (NUCLEUS) de la Universidad de Salamanca
- Servicios de Hematología y Bioquímica y del Hospital Clínico Universitario de Salamanca
- Servicio de Hematología, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona
- Servicio de Hematología, Hospital General de Segovia, Segovia
- Servicios de Hematología de los Hospitales de las provincias de Castilla y León: Ávila, Burgos, Palencia, Ponferrada, Soria y Zamora
- Hospital Universitario Clementino Fraga Filho, Universidad Federal de Río de Janeiro (Río de Janeiro, Brasil)
- Consorcio EuroFlow: Centro Médico Universitario de Rotterdam (Rotterdam, Países Bajos); Departamento de Inmuno-hematología y transfusión sanguínea del Centro Médico Universitario de Leiden (Leiden, Países Bajos); Hospital Universitario de Schleswig-Holstein (Kiel, Alemania); Instituto Portugués de Oncología (Lisboa, Portugal); Centro Médico Universitario de Silesia en Katowice (Zabrze, Polonia)

La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el *Science Citation Reports*, según se detalla a continuación:

1. Next Generation Flow (NGF) for Highly Sensitive and Standardized Detection of Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma.

Juan Flores-Montero*¹, Luzalba Sanoja-Flores*¹, Bruno Paiva*², Noemí Puig³, Omar García-Sánchez³, Sebastian Böttcher⁴, Vincent H.J. van der Velden⁵, José-Juan Pérez-Morán³, María-Belén Vidriales³, Ramón García-Sanz³, Cristina Jimenez³, Marcos González³, Joaquín Martínez-López⁶, Alba Corral Mateos¹, Georgiana-Emilia Grigore⁷, Rafael Fluxá⁷, Roberia Pontes⁸, Joana Caetano⁹, Lukasz Sedek¹⁰, María-Consuelo del Cañizo³, Joan Bladé¹¹, Juan-José Lahuerta⁶, Carlos Aguilar¹², Abelardo Báñez¹³, Aránzazu Gracia-Mateo¹⁴, Jorge Labrador¹⁵, Pilar Leoz¹, Carmen Aguilera-Sanz¹⁶, Jesús San-Miguel², María-Victoria Mateos³, Brian Durie¹⁷, Jacques J.M. van Dongen^{5,18} y Alberto Orfao¹.

*Estos autores han contribuido en igual proporción en este trabajo y por tanto deben ser considerados como primer autor.

Leukemia (2017), 1–10. DOI: 10.1038/leu.2017.29

2. Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC).

Luzalba Sanoja-Flores*¹, Juan Flores-Montero*¹, Juan José Garcés^{2*}, Bruno Paiva^{2*}, Noemí Puig³, Aránzazu García-Mateo¹⁴, Omar García-Sánchez³, Alba Corral-Mateos¹, Leire Burgos², Elena Blanco¹, José Hernández-Martín¹⁴, Roberia Pontes⁸, María Díez-Campelo³, Pamela Millacoy¹⁹, Paula Rodríguez-Otero², Felipe Prosper², Juana Merino², María-Belén Vidriales³, Ramón García-Sanz³, Alfonso Romero²⁰, Luis Palomera²¹, Rafael Ríos-Tamayo²², Martín Pérez-Andrés¹, Juan F. Blanco²³, Marcos González³, Jacques J.M van Dongen¹⁸, Brian Durie¹⁷, María-Victoria Mateos³, Jesús San-Miguel² y Alberto Orfao¹.

*Estos autores han contribuido en igual proporción en este trabajo y por tanto deben ser considerados como primer autor.

Blood Cancer Journal (2018), 8:117. DOI: 10.1038/s41408-018-0153-9

3. Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy.

Luzalba Sanoja-Flores¹, Juan Flores-Montero¹, Noemí Puig³, Teresa Contreras-Sanfeliciano²⁴, Roberia Pontes⁸, Alba Corral-Mateos¹, Omar García-Sánchez³, María Díez-Campelo³, Roberto José Pessoa de Magalhães Filho²⁵, Luis García-Martín²⁶, José María Alonso-Alonso²⁷, Aranzazú García-Mateo¹⁴, Carlos Aguilar-Franco¹², Jorge Labrador¹⁵, Abelardo Barez-García¹³, Angelo Maiolino²⁵, Bruno Paiva², Jesús San Miguel², Elaine Sobral da Costa⁸, Marcos González³, María Victoria Mateos³, Brian Durie¹⁷, Jacques van Dongen¹⁸ y Alberto Orfao¹.

Blood (2019), 134:24. DOI: 10.1182/blood.2019002610

Afiliaciones de los autores:

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL); Servicio General de Citometría (NUCLEUS) y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, Instituto Carlos III, Madrid, España; ²Clínica Universidad de Navarra; Centro de Investigación de Medicina Aplicada (CIMA), IDISNA, Pamplona, España (UNAV); ³Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, España (HUSAL); ⁴Segundo Departamento de Medicina, Hospital Universitario de Schleswig-Holstein, Campus de Kiel, Kiel, Alemania (UNIKIEL); ⁵Departamento de Inmunología, Erasmus MC, Centro Médico Universitario de Rotterdam, Rotterdam, Países Bajos (EMC); ⁶Servicio de Hematología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España; ⁷Cytognos SL, Salamanca, España; ⁸Servicio de Pediatría, Instituto de Pediatría y Puericultura, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Brasil; ⁹Servicio de Hematología, Instituto Portugués de Oncología, Lisboa, Portugal (IPOLFG); ¹⁰Servicio de Hematología y Oncología Pediátrica, Universidad Médica de Silesia en Katowice, Zabrze, Polonia (SUM); ¹¹Servicio de Hematología, Hospital Clinic I Provincial, Barcelona, España; ¹²Servicio de Hematología, Hospital General de Santa Bárbara, Soria, España; ¹³Servicio de Hematología, Complejo Asistencial de Ávila, Ávila, España; ¹⁴Servicio de Hematología, Complejo Asistencial de Segovia, Segovia, España; ¹⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, España; ¹⁶Servicio de Hematología, Hospital Universitario del Bierzo, Ponferrada, España; ¹⁷Centro del Cáncer Cedars-Sinai Samuel Oschin, Los Angeles, Estados Unidos; ¹⁸Departamento de Inmuno-hematología y Hemoterapia, Centro Médico Universitario de Leiden, Leiden, Países Bajos; ¹⁹Servicio de Hematología, Centro Hospitalario de Navarra, Pamplona, España; ²⁰Centro de Atención Primaria Miguel Armijo, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Salamanca, España; ²¹Servicio de Hematología, Hospital Lozano Blesa, Zaragoza, España; ²²Servicio de Hematología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, España; ²³Servicio de Traumatología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, España; ²⁴Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España; ²⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario Clementino Fraga Filho, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Brasil; ²⁶Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Concha, Zamora, España; ²⁷Servicio de Hematología, Hospital del Río Carrión, Palencia, España.

A mis padres.

A Peter y a Olivia.

A la memoria de mi Pancha.

La imagen de la portada ha sido inspirada en las *Nubes Flotantes* de Alexander
Calder

Agradecimientos

"Si quieres llegar rápido, ve solo, pero si quieres llegar lejos, hazlo acompañado".

Steve Jobs

Creo que soy verdaderamente afortunada al encontrarme día a día arropada por el apoyo y cariño de muchas personas que me han acompañado de cerca o desde otras fronteras para poder consolidar este gran proyecto en mi vida.

Siempre había tenido particular ilusión por escribir estas líneas de agradecimiento dentro de mi tesis doctoral, pero nunca había imaginado que coincidiera con una pandemia histórica como la que hemos estado viviendo. Quiero con ello reforzar aún más mi agradecimiento al Dr. Orfao, por confiar en mí y en mi capacidad de trabajo desde el primer momento, por su capacidad de liderazgo, su apoyo y enseñanza durante todos estos años, y por invertir parte de su tiempo en ayudarme a materializar este proyecto. A Juan, por tu infinita paciencia, por siempre sacar tiempo "para darle una vuelta" a las cosas y por guiarme de forma constante en este camino científico. A Mariví, por la entrega que transmites en todo lo que haces. A Martín, por tus directrices y tutoría en el análisis de los datos.

Gracias a mis compis del "hospí", Irene, Cris, Ana, María e Isabel por estar día a día cerquita, echando una mano cuando hace falta o riendo un rato en las tertulias de las comidas. A Josito, por compartir tu experiencia profesional con total disposición y amabilidad. A Noemí, por tu orientación y valiosa ayuda en todos los trabajos. A Chema, por tu mano amiga desde el primer día que llegué al laboratorio. A las chicas de "morfo", por su carisma y colaboración desinteresada. A todo el equipo médico y técnico del Servicio de Hematología del Hospital de Salamanca y, especialmente, al de Citometría de Flujo: María Belén Vidriales, Alejandro, Ana, María Diez, Pilar, Félix, Omar, Gloria, Maite, Lola y Cristina, por facilitarme gran parte de las muestras de pacientes incluidos en esta tesis doctoral, pero, sobre todo, por el compromiso y la vocación que tienen con los pacientes y con su profesión.

Gracias a toda mi gente del laboratorio 11, quienes se han convertido en mi familia Salmantina y han influido de una manera positiva en mí. Daniela, por compartir conmigo esta aventura desde el día uno (literal). Laura, por ofrecerme tu especial punto de vista. Sergio, por tus ocurrencias que me sacaban alguna(s) carcajada(s). Lourdes, por tu positividad y por aclararme tantas dudas de estadística. Carlitos, por enseñarme citometría con tanta paciencia. Nacho, por tu capacidad de relativizar los momentos de angustia laboral. Sara, por tu simpatía y por tu amabilidad al encargarte de procesar mis muestras durante mi baja de maternidad. Toñito, por ser siempre tan amable conmigo y trasmitirme un poco de todo lo que sabes. Juana, por mostrarme otra manera de hacer ciencia. Susana, por tu sinceridad. Miriam Santos, por tu calidez como persona. Miriam Fierro, por las largas charlas en los días de "infinitas" muestras. Virginia, por tu carisma. Sheila, por tener siempre una sonrisa contagiosa y espontánea, incluso cuando tenías que separar alguna muestra con fenotipo "complejo". Paloma, por ser tan resolutiva. María GG, por tener siempre una palabra de motivación. Quentin, por sacar algún hueco en tu ajetreada agenda y darte una vuelta por el hospital para aclararme dudas o ayudarme con cualquier problema informático que me surgiera. Noemí, por tu simpatía. A todos los que forman parte del Laboratorio de Biología Molecular y Secuenciación, especialmente a María Jara y Carolina, por su disposición para colaborar amablemente en todos los proyectos con células en nivel "mínimo residual". Gracias

también a Javi, por tu contagioso buen humor. A Andrea, por tu simpatía y por estar siempre pendiente de cómo iba con mi tesis. A Guillermo, por ser tan diligente ayudándome a gestionar las innumerables firmas de documentos, organización de pedidos de reactivos, albaranes, etc. A Julio, por ser tan responsable y comprometido con el trabajo que hemos desarrollado juntos. A Oihane, por asumir con tanta proactividad e ilusión esta "batuta" que dejo ahora relevada en sus manos.

Un agradecimiento especial a Marga, por su colaboración con suma amabilidad desde el primer momento que llegué a Salamanca. Tu ayuda incondicional desde los primeros meses del máster hasta estas fases finales de la tesis doctoral, han sido clave para conseguir que todo marche de la mejor manera. ¡Haces que todo sea más fácil!

Gracias a mis amigos "VIP". Elena, por tu apoyo y comprensión en todo este proyecto de vida, por invertir parte de tu tiempo en revisar cada apartado de este manuscrito y por tener siempre una palabra de motivación cuando sabes que la necesito. Noelia, por hacer de los detalles, tu particular manera de expresarme tu afecto. Alba, por tu paciencia, colaboración y disposición durante todo el tiempo que trabajamos juntas. Nacho, por tus palabras de ánimo para seguir avanzando. Vítor, por transmitirme tu paciencia y tranquilidad característica. Alejandro, nuestro chileno favorito, por tu calidez humana y por el cariño que le tienes a mi tierra. Roberia, por tu energía contagiosa. Alejandro, por tu entereza.

Gracias a mis amigas del alma, Kamila, Valentina, Elizabeta, María y Dalia. Por alegrarse de mi felicidad, por estar ahí en los días llenos de luz, pero también, en los días grises, tristes y llenos de frustración. Por compartir el sentimiento de estar lejos de casa, de extrañar a los nuestros. Por las noches de fiesta, de risa y de hermandad. ¡Las quiero, chicas!

Gracias a mis amigos de la UCV, Rosalicia, Gersy, Diego, Antonio, Willy, Kely, Mary y Maritza. Porque nuestra amistad se mantiene a pesar de las distancias, fronteras y el paso de los años. Me llena de alegría tenerlos en mi vida.

Gracias a mis amigas Ana Clara, Mery, Tibisay, Norha y Paola. Porque aún en la distancia, han sido un apoyo súper valioso para mí. ¡Espero volver a verlas pronto!

Doy gracias a todos los profesores y maestros que he tenido en mi vida académica. A mis profesoras del Colegio La Concepción, Mariela Requena y María Belén, porque su enseñanza aún la aplico en mi día a día. A todos mis profesores de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, mi Alma Máter, *"La casa que vence La Sombra"*, por transmitirme tanta vocación, por enseñar en condiciones tan complejas y por formar profesionales con compromiso social y calidad humana. A mis profesores de la Especialidad en Hematología, especialmente a la Prof. Sandra Quijano, por ser un modelo científico que inspiró en mí el interés por aprender citometría y, también, por haberme brindado la oportunidad de venir a Salamanca y darle un giro tan importante a mi vida. A "Chelita" por transmitirme parte de tus conocimientos con tanto cariño y pedagogía. Directamente aquí en Salamanca, agradezco a Julia Almeida, por ser ejemplo de organización y por tu capacidad inspiradora de conciliar una carrera científica y académica brillante, con el ejercicio de la maternidad y la crianza de tus hijos.

En la distancia, le mando las gracias a mi "Tita" Alida y a mi abuela Carmen, por alegrarme con sus llamadas, por tenerme presente en sus oraciones, por su cariño fraternal y por las largas conversaciones como si, todos estos años sin vernos, no hubiesen pasado. A mis primas, Roxyna, Suhey y Marianne, por ser tan especiales con mis padres durante todo este tiempo que llevo fuera de mi país. A mis cuñados, Ricardo y Thoren, gracias por escuchar mis largas historias acerca de la tesis. A mi sobrino hermoso, Tomás, por darle tanta alegría a vida desde el primer minuto que supe de tu existencia.

I want to say thank you to my parents in law, Jane and Tim, because you both love me like a daughter, and your support and companionship have been very special for me throughout these years.

A mi abuelita querida, Panchita, donde quiera que esté, hoy elevo mi mirada para agradecerle por todo lo maravilloso que fue y significó para mí. Siempre la llevaré conmigo.

Brindo especial agradecimiento a mis hermanas, Maralba y Floralba, por valorarme y honrarme con orgullo, por ser partícipes de todo lo que he vivido durante estos años de doctorado, por estar tan cerca, aunque estemos lejos. Gracias por ayudarme a levantar el ánimo cuando el cansancio flaqueaba mi impulso y por celebrar conmigo mis alegrías y triunfos más grandes. ¡Las quiero infinito!

Gracias infinitas, hoy y siempre, a mis padres Sol y Orlando. Gracias por ser incondicionales conmigo. Por comprender que, para llegar a este punto, hemos tenido que sacrificar muchísimos años juntos. Gracias por motivarme a ser cada día mejor, por ayudarme a luchar por lo que quiero, con constancia y empeño, por enseñarme a ir por la vida con principios, valores y respeto. Por guiarme y acompañarme en cada etapa, ayudándome a combatir mis miedos y a brindar la mano a quien lo necesite. Gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y del trabajo. Todo lo que soy, se lo debo a ustedes. ¡Los quiero con mi vida!

Por último, quiero agradecer a mi familia: Peter y Olivia. Pete, mi chamito, esto no sería posible sin ti. Eres mi amor, mi aliado, mi amigo, mi apoyo sin condición. Gracias por ser tal cual eres, por quererme, por ayudarme con la revisión de la gramática de todos los artículos en inglés, por cuidar de mí y escucharme, pero, sobre todo, gracias por cuidar con tanta dedicación a nuestra minichamita. I love you so much! Olivia, mi niña, eres lo más bonito de mi vida, mi fuerza, mi inspiración. Gracias por regalarme tu risa que me recarga de la felicidad más absoluta y me hace poner los pies en la tierra cuando mi mente está volando fuera, en otra dimensión. ¡Te adoro con mi alma! Gracias a los dos por la infinita paciencia y comprensión que me han brindado, especialmente, en estos últimos días de escritura, correcciones y confinamiento. Nada de esto tendría sentido sin ustedes. ¡Son mi mundo!

A Dios y a la Virgen, por lo simple, por lo complejo y por todo lo que me rodea y me permite vivir a plenitud, Gracias.

Índice general

-INTRODUCCIÓN-	1
1. LA CÉLULA PLASMÁTICA	3
1.1 DIFERENCIACIÓN B A CÉLULA PLASMÁTICA	3
1.1.1 Respuesta B dependiente de linfocitos T	5
1.1.2 Respuesta B independiente de linfocitos T	9
1.2 FENOTIPO DE LA CÉLULA PLASMÁTICA	10
1.3 FUNCIÓN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA	12
2. NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS	15
2.1 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	17
2.2 ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA DE LOS PACIENTES CON NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS	23
2.2.1 Estratificación pronóstica de pacientes con distintos subtipos de neoplasias de células plasmáticas	23
2.2.2 Otros factores pronósticos	28
2.2.2.a- Parámetros pronósticos asociados al metabolismo óseo	29
2.2.2.b- Alteraciones genómicas y pronóstico en gammapatías monoclonales	30
2.2.2.c- Células plasmáticas tumorales circulantes en neoplasias de células plasmáticas	32
2.3 CÉLULAS PLASMÁTICAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON NEOPLASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS	32
2.3.1 Técnicas disponibles para el rastreo de CPTC en sangre periférica	32
2.3.1.a- Detección de CP en láminas de sangre periférica mediante citología convencional	33
2.3.1.b- Detección de CPTC mediante microscopía de fluorescencia	34
2.3.1.c- Detección de CPTC mediante citometría de flujo	36
2.3.1.d- Detección de CPTC mediante técnicas moleculares (ASO-qPCR y secuenciación masiva)	39
2.3.2 Características biológicas de las CPTC y su relevancia en la fisiopatología de las neoplasias de células plasmáticas	41
2.4 TRATAMIENTO	43
2.5 CRITERIOS CLÁSICOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO	46
2.6 MONITORIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL TRAS TRATAMIENTO	48
2.6.1 Técnicas de monitorización de EMR en médula ósea de pacientes con MM tras tratamiento	49
2.6.1.a- Detección de EMR mediante citometría de flujo convencional	49
2.6.1.b- Detección de EMR mediante técnicas moleculares	52
2.6.2 Monitorización de EMR en sangre periférica de pacientes con MM	54
2.6.3 Monitorización de enfermedad residual extramedular en el MM	57
-HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS-	59
-MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS-	67
ARTÍCULO 1	71
" CITOMETRÍA DE FLUJO DE NUEVA GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN SENSIBLE Y ESTANDARIZADA DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN EL MIELOMA MÚLTIPLE "	71
ARTÍCULO 2	77
" UTILIDAD CLÍNICA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE NUEVA GENERACIÓN COMO TÉCNICA MÍNIMAMENTE INVASIVA PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS TUMORALES CIRCULANTES EN LA SANGRE DE PACIENTES CON GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO Y MIELOMA MÚLTIPLE AL DIAGNÓSTICO "	77

ARTÍCULO 3	83
“MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS TUMORALES CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE TRAS TRATAMIENTO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE NUEVA GENERACIÓN”	83
-DISCUSIÓN-	89
-CONCLUSIONES-	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
-ANEXO I-	137
-ANEXO II-	153
-ANEXO III-	167

Glosario de abreviaturas

A

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AID:	Deaminasa de citidina inducible por activación (del inglés, <i>activation-induced cytidine deaminase</i>)
APRIL:	Ligando inductor de proliferación (del inglés, <i>a proliferation-inducing ligand</i>)
ARN:	Ácido ribonucleico
ASO-qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con sondas de oligonucleótidos alelo-específicas

B

BAFF:	Factor activador de células B (del inglés, <i>B cell-activating factor</i>)
BAFF-R:	Receptor de BAFF (del inglés, <i>BAFF-receptor</i>)
BCL-6:	Proteína 6 del linfoma de célula B (del inglés, <i>B-cell lymphoma 6 protein</i>)
BCMA:	Antígeno de maduración B (del inglés, <i>B cell maturation antigen</i>)
BCR:	Receptor de célula B (del inglés, <i>B-cell receptor</i>)
Blimp-1:	Proteína inductora de maduración del linfocito B tipo 1 (del inglés, <i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>)

C

CCL:	Ligando de quimiocina con dos residuos de cisteína contiguos (del inglés, <i>Chemokine C-C motif ligand</i>)
CCR:	Receptor de quimiocinas tipo CC
CCND1:	Ciclina D-1
CD:	Grupo de diferenciación (del inglés, <i>cluster of differentiation</i>)
CDR:	Región determinante de complementariedad (del inglés, <i>complementarity-determining region</i>)
CLL:	Cadenas ligeras (de inmunoglobulinas) libres en suero
CM:	Componente monoclonal
CP:	Célula plasmática
CPTC:	Célula plasmática tumoral circulante
CRAB:	Hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia, lesiones osteolíticas (del inglés, <i>hyperCalcemia, Renal insufficiency, Anemia, and Bone disease</i>)
CT:	Tomografía axial computarizada
cTNT:	Troponina-T cardíaca (del inglés, <i>cardiac troponin T</i>)
CXCL:	Ligando de quimiocina con dos residuos de cisteína separados por un aminoácido (del inglés, <i>C-X-C motif chemokine</i>)
CXCR:	Receptor de quimiocinas tipo CXC (del inglés, <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor</i>)

D

del:	Delección cromosómica
------	-----------------------

E

EMR:	Enfermedad mínima residual
------	----------------------------

F

Fc:	Fragmento cristizable de la molécula de las inmunoglobulinas
FDC:	Células dendríticas foliculares (del inglés, <i>follicular dendritic cells</i>)
FGFR3:	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-3 (del inglés, <i>fibroblast growth factor 3</i>)

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente (del inglés, *fluorescence in situ hybridization*)

G

GEM: Grupo Español de Mieloma
GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (del inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto

I

IL: Interleucina
Ig: Inmunoglobulina
IGH: Gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
IMWG: Grupo internacional de trabajo en mieloma (del inglés, *International Myeloma Working Group*)
Irf4: Factor regulador de interferón tipo 4 (del inglés, *Interferon regulatory factor 4*)
ISS: Sistema de estratificación internacional (del inglés, *International Staging System*)

L

LCP: Leucemia de células plasmáticas
LDH: Lactato deshidrogenasa
LFA-1: Antígeno-1 asociado a la función linfocitaria (del inglés, *Lymphocyte function-associated antigen 1*)

M

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosa (del inglés, *mucosa-associated lymphoid tissue*)
MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*)
MM: Mieloma múltiple (activo)
MMQ: Mieloma múltiple quiescente o asintomático
MMSET: Dominio SET del mieloma múltiple (del inglés, *multiple myeloma SET domain*)
MO: Médula ósea

N

NGF: Citometría de flujo de nueva generación (del inglés, *Next Generation Flow*)
NGS: Secuenciación de nueva generación (del inglés, *next generation sequencing*)
NK: Células asesinas naturales (del inglés, *natural killer*)
NT-ProBNP: Propéptido N-terminal del péptido natriurético (del inglés *N-terminal propeptide*)

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

p.ej.: Por ejemplo
Pax-5: Factor de transcripción tipo "caja-pareada" 5 (del inglés, *paired-box protein Pax-5*)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)
PET-TC: Tomografía axial computarizada con emisión de positrones (del inglés, *positron emission tomography combined with computerized tomography*)
POEMS: Polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y lesiones en piel
PRDM1: Dominio regulador positivo-1 (del inglés, *positive-regulatory-domain containing 1*)

R

RC:	Respuesta completa al tratamiento
R-ISS:	Sistema de estratificación internacional revisado (del inglés, <i>Revised International Staging System</i>)

S

SDF-1:	Factor derivado de células estromales-1 (del inglés, <i>stromal derived factor-1</i>)
--------	----------------------------------------------------------------------------------------

T

t:	Traslocación cromosómica
TACI:	Activador transmembrana-modulador de calcio y ligando de la ciclofilina (del inglés, <i>transmembrane activator and calcium-modulating and cyclophilin ligand interactor</i>)
TEMPI:	Telangiectasia, eritropoyetina elevada, eritrocitosis, gammapatía monoclonal, derrame perinefrítico y afectación pulmonar.
TFH:	Linfocitos T colaboradores foliculares (del inglés, <i>T follicular helper cells</i>)
TGF:	Factor de crecimiento transformante (del inglés, <i>transforming growth factor</i>)
TLR:	Receptores tipo aduana (del inglés, <i>Toll-like receptor</i>)
TNF:	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>tumor necrosis factor</i>)

V

VEGF:	Factor de crecimiento endotelial (del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-4:	Antígeno muy tardío tipo 4 (del inglés, <i>very late antigen-4</i>)

X

XBP- 1:	Gen/proteína de unión a caja-X tipo 1 (del inglés, <i>X-box binding protein 1</i>)
---------	-------------------------------------------------------------------------------------

Z

ZC:	Zona clara del centro germinal
ZO:	Zona oscura del centro germinal

-INTRODUCCIÓN-

1. La célula plasmática

La célula plasmática (CP) constituye el estadio final de diferenciación de los linfocitos B. Desde el punto de vista funcional, la CP desempeña un papel clave en la respuesta inmune específica de tipo humoral^{1,2}, al ser la célula encargada de la producción y secreción de anticuerpos³⁻⁶ con distintas funciones efectoras según el isotipo y subclase de inmunoglobulina (Ig) que exprese¹.

En la actualidad se conoce la existencia de diferentes poblaciones de CP, según su vida media (corta o larga) y localización tisular^{7,8}. Aunque al nacer no se detectan CP circulantes en la sangre de cordón umbilical ni en la sangre periférica del neonato, éstas se incrementan de forma muy significativa en los primeros meses de vida⁹, localizándose de forma preferente en el bazo y órganos linfoides secundarios¹⁰. Por el contrario, en la edad adulta, la gran mayoría de las CP se encuentran en médula ósea (MO)^{5,10}, órgano que actúa como nicho de supervivencia de estas células^{8,11} (aunque con una capacidad limitada)^{3,8}, y en el que representan entre el 0,1% y 1% de la celularidad global de MO¹². Además de localizarse en MO, las CP pueden detectarse también en otros órganos, como el bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas, el intestino y en tejidos en los que tiene lugar una respuesta inflamatoria^{3,8,13-15}. En contraposición con las CP de MO, aquellas presentes en otros tejidos representan con frecuencia CP recién producidas (plasmablastos)⁵.

1.1 Diferenciación B a célula plasmática

Tras el reconocimiento antigénico y la activación (específica de antígeno) de los linfocitos B, las células B activadas se diferenciarán a linfocito B de memoria o a CP^{4,11,16}. Así, los precursores de las CP (plasmablastos) pueden generarse tanto a partir de linfocitos B recién producidos (p.ej. linfocitos B naïve provenientes de MO y localizados en la zona marginal, folicular o en el centro germinal de los órganos linfoides secundarios)⁸, como a partir de un linfocito B de memoria capaz de recircular por vía sanguínea entre órganos linfoides secundarios¹⁷.

A nivel genómico, la diferenciación de los linfocitos B a CP está regulada de forma estrecha mediante la unión (ligando-receptor) a la célula B de determinados factores de diferenciación, como el factor activador de células B (BAFF), capaces de inducir la activación de los mecanismos

transcripcionales responsables de la diferenciación a CP ^{11, 14, 18-20}. Así, hoy se sabe que niveles elevados de *Irf4* ^{14, 18, 19, 21}, junto con la activación del gen *PRDM1* ^{8, 11}, que codifica la expresión del factor de transcripción Blimp-1, favorecen la inhibición de los programas de maduración B temprana dependientes de PAX5, a la vez que facilitan la transcripción de genes esenciales para el desarrollo, activación funcional ^{2, 8, 11, 18, 19} y establecimiento del fenotipo asociado a la CP ¹⁸. A su vez, la expresión de Blimp-1 reprime a BCL-6 e induce la sobreexpresión de XBP1 ^{2, 8, 18}, un factor de transcripción clave en la inducción y regulación de la síntesis de grandes cantidades de Ig por parte de la que será finalmente una CP ¹⁸. Sin embargo, aunque la expresión de Blimp-1 representa un paso fundamental en la inducción de la diferenciación B a CP, su papel a la hora de determinar la vida media de las CP generadas, es más limitado ²² (Figura 1).

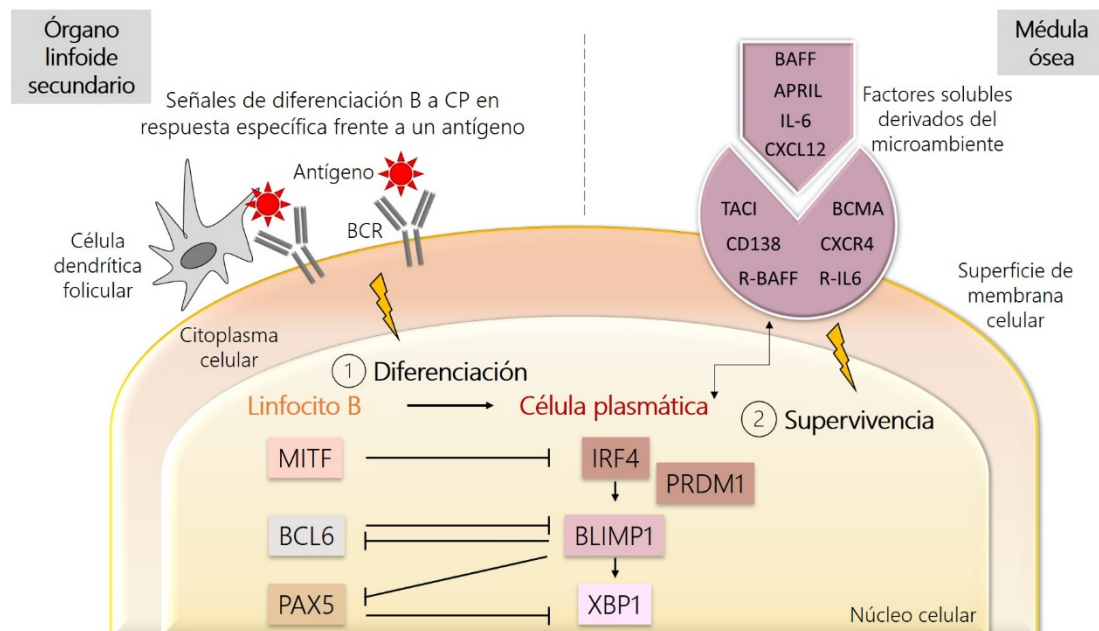


Figura 1. Perfiles de expresión génica asociados a la diferenciación de las células B a CP y su supervivencia a largo plazo en los nichos tisulares responsables de la producción de anticuerpos. Los estímulos de activación y diferenciación de células B a CP que actúan tras el reconocimiento antigénico en los órganos linfoides secundarios, provocan un bloqueo progresivo de factores de transcripción propios del linfocito B, como PAX5 y BCL6, induciendo simultáneamente el incremento en los niveles de IRF4 que conducen la expresión de BLIMP-1 y XBP1, que en conjunto inducirán y mantendrán las características fenotípicas y funcionales de la CP, asociados a la represión de los programas de maduración B temprana (Paso 1). A su vez, moléculas como BAFF, APRIL, IL-6 y la quimiocina CXCL12, secretadas por parte de las células del estroma medular, aunque participan en menor medida en el proceso de diferenciación B a CP (p.ej. estabilizando la expresión de BLIMP1 y PRDM1), cumplen un papel relevante en el mantenimiento de la supervivencia de las CP en los nichos medulares, una vez que son reconocidos por sus receptores (TACI, BCMA, R-BAFF, R-IL6, CD138 y CXCR4) presentes en la membrana de la CP recién producida. Su unión al receptor específico genera así la activación de las cascadas de señalización intracelular que garantizan la longevidad de la CP a largo plazo (Paso 2). ^{8, 14, 19, 23}

En este sentido, el factor activador BAFF y el ligando inductor de proliferación (APRIL), a través de su unión a los receptores TACI y BCMA, y en menor medida también CD268 (BAFF-R) ²², tienen un papel clave tanto en la diferenciación a CP, como en el mantenimiento de su supervivencia ⁸.

^{11, 13, 14, 24, 25}. Así, varios estudios demuestran que APRIL junto con la interleucina (IL)-6 ^{11, 26, 27}, producidos activamente por las células del estroma medular (principalmente por los eosinófilos ⁸ y monocitos ²⁸), o por las células de la lámina propia del intestino delgado ¹⁵, actúan como piezas clave en el mantenimiento de la longevidad de las CP dentro de su nicho.

En términos generales, la puesta en marcha de la diferenciación de los linfocitos B activados a CP, aunque habitualmente depende de la participación de los linfocitos T (LT) ¹⁹ y del tipo de antígeno involucrado ²⁹, puede ocurrir también de forma independiente de las células T. Así, hoy se conoce que existirían al menos dos grandes tipos de respuesta B con producción de CP, según ésta tenga lugar de forma dependiente o independiente de las células T (Figura 2).

1.1.1 Respuesta B dependiente de linfocitos T

La mayoría de los antígenos activan una respuesta B que depende de la colaboración de los linfocitos T ¹⁹. Este proceso de diferenciación T-dependiente ocurre en el centro germinal de los órganos linfoides secundarios, incluidos los ganglios linfáticos, el bazo o el tejido MALT (tejido linfoide asociado a mucosas), ⁴ y habitualmente conduce al desarrollo de linfocitos B de memoria, a CP de vida larga ^{1, 2, 4, 11, 17, 25, 30, 31} y, en menor medida, a CP típicas de una respuesta rápida y de vida corta ¹¹.

Los linfocitos B maduros (naïve) recién producidos en MO y liberados a la circulación sanguínea ⁴, expresan receptores de quimiocinas (tipo CXCR5 y CCR7) ¹⁴ que facilitan su migración a los *folículos linfoides primarios*, dentro de los órganos linfoides secundarios. Una vez allí, la activación de la respuesta B va transformando progresivamente los folículos linfoides primarios, compuestos en su mayoría por células B maduras de tipo naïve ¹ (IgM⁺D⁺) ³², en *folículos linfoides secundarios* en los que se observa un área proliferativa central denominada centro germinal ², generada aproximadamente 4 días ³² después de la estimulación antigénica ¹. A su vez, en el centro germinal se observan dos compartimentos diferentes, tanto a nivel histológico ^{1, 32} como molecular ¹⁸, denominados zona oscura (ZO) y zona clara (ZC). En la zona oscura se localizan la mayoría de los linfocitos B que están en fase proliferativa (centroblastos) y en ella se produce el fenómeno de hipermutación somática (en el que se generan mutaciones puntuales en los dominios ya reordenados de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las Ig), con la consecuente maduración de la afinidad por el antígeno ^{1, 19}. Además, en esta ZO, es donde tiene lugar el proceso de cambio de isotipo de la Ig y la selección de los linfocitos B específicos del

antígeno que muestran elevada afinidad por el mismo ^{8, 11, 21}, aptos para sobrevivir y diferenciarse a célula B de memoria o a CP ^{1, 18}. La zona clara, integrada por células B foliculares que han pasado la fase proliferativa y han salido del ciclo celular (centrocitos) junto con linfocitos T colaboradores CD4⁺ de tipo folicular (TFH, del inglés, *T follicular helper cells*) y las células dendríticas foliculares (FDC, del inglés, *follicular dendritic cells*) ³², se encuentra en el polo opuesto del centro germinal y es donde ocurre el proceso final de diferenciación a linfocito B de memoria o CP, en presencia de la IL-21 ^{1, 19} (Figura 2).

Así, los linfocitos B foliculares y algunos linfocitos B de la zona marginal ³³, al ser activados por los antígenos (generalmente de naturaleza proteica) retenidos en la superficie de las células dendríticas foliculares ¹⁶, sobreexpresan el factor de transcripción BCL-6 facilitando la formación del centro germinal ³². En paralelo, estos linfocitos B recién activados por el antígeno, muestran un incremento de expresión de CCR7 que favorece su migración a la interfase entre el espacio B y T, en respuesta a los ligandos de CCR7 (CCL19 y CCL21) que predominan en la zona paracortical T ¹. A su vez, la sobreexpresión de CXCR5 en los linfocitos B activados, junto a un entorno enriquecido en su ligando (la quimiocina CXCL13) en ausencia de IL-12, se favorece el contacto del linfocito B activado con los linfocitos T colaboradores Th2 y, de forma específica, con aquellos linfocitos Th2 activados por péptidos derivados del mismo antígeno que les han sido presentados por las células dendríticas; con ello, se incrementa también la expresión de CXCR5 en los linfocitos Th2 activados facilitando su migración hacia el centro germinal ^{1, 19, 33}. La migración, tanto de los linfocitos B como de los linfocitos T, desde zonas opuestas, favorece su encuentro con la puesta en marcha de la respuesta inmune humoral, con la correspondiente expansión y diferenciación de los linfocitos B específicos de antígeno ^{1, 19} (Figura 2).

Como consecuencia de los estímulos recibidos, los linfocitos B activados incrementan su capacidad de presentación antigénica, sobreexpresando moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) junto con moléculas coestimuladoras de linfocitos T ^{1, 19}. Así, la interacción entre ambas células se favorece a través de la unión de CD40 y CD80/CD86 de los linfocitos B a sus ligandos CD154 (CD40L) y CD28, respectivamente, en los linfocitos T ^{4, 34}. Este contacto activo entre células B y T, junto con las citocinas liberadas por estas últimas [p.ej. IL-4, interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- β e IL-5], inducen la expresión y activación de la enzima AID (deaminasa de citidina inducible por activación, comúnmente conocida como deaminasa) ³⁴⁻³⁷, que tiene un papel clave en el proceso de hipermutación somática de los genes

de las Ig y, en concreto, sobre las secuencias que codifican para las regiones determinantes de complementariedad (CDR), generando un cambio (incremento o disminución) en la afinidad del receptor de célula B (BCR) por el antígeno^{2, 4, 14, 17, 18, 25, 37}. Así mismo, la interacción B-T promueve el cambio del isotipo de cadena pesada de la Ig (IgH) en parte de estas células^{2, 4, 14, 31}, con lo que se termina por definir la función efectora específica de los anticuerpos que se producirán posteriormente, sustituyendo la región constante de la cadena pesada de la IgM por la de la IgG1-4, IgA1-2 o IgE^{2, 36, 37}. Posteriormente, se produce una selección clonal (positiva) preferencial de aquellos linfocitos B que expresen un receptor BCR de alta afinidad por antígeno^{14, 31}, con la diferenciación final a CP productora de anticuerpos o a célula B de memoria^{4, 17}.

Los linfocitos B de memoria (específicos de antígeno) recién generados, tienen capacidad de persistir durante décadas incluso en ausencia del antígeno^{11, 14, 38}. Por el contrario, las CP recién producidas deben migrar por vía sanguínea a los nichos de supervivencia de CP, para mantener en el tiempo la secreción de anticuerpos^{11, 31}. Esta migración se ve favorecida por el cambio de expresión de receptores de quimiocinas durante el proceso de diferenciación, asociado a la pérdida de expresión de CXCR5 y CCR7^{8, 11}, y la ganancia de CXCR4^{2, 6, 11, 14, 19, 25}, CXCR6¹¹ y/o CXCR3⁸, receptores que facilitan la salida de los plasmablastos recién formados hacia MO, atraídos por la concentración progresivamente más elevada de sus correspondientes ligandos CXCL12 (para CXCR4)^{2, 8, 11, 14, 25} y CXCL16 (para CXCR6)¹¹, producidos por parte de las células del estroma medular o, en su caso, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (ligandos de CXCR3) provenientes de tejidos inflamados⁸.

A lo largo de todo este proceso, gran parte de las CP generadas mueren por apoptosis espontánea o inducida por Fas (CD95)⁵, al no alcanzar un nicho de supervivencia (habitualmente en MO)^{5, 11, 17, 19} en los (tres a siete) días siguientes a su producción⁸. Estos hallazgos indican que la longevidad de las CP no es una característica intrínseca de las mismas^{11, 27} sino que, depende de factores del microambiente tisular (p.ej. medular)^{8, 17, 19}, entre los que se incluyen la señalización mediada por algunas citocinas, por moléculas derivadas de las células del estroma y por algunas células del sistema hematopoyético¹³. Hoy se sabe que, entre otros factores, tienen especial relevancia en la inducción de la supervivencia de las CP, moléculas involucradas en su adhesión al estroma medular, como las integrinas LFA-1 (CD11a) y VLA-4 (CD49d)¹⁴, el receptor de ácido hialurónico CD44^{14, 19} y las interleucinas IL-6^{11, 13, 19, 25}, IL-4, IL-5 e IL-10^{14, 25}, además de la quimiocina CXCL12 (o SDF-1)^{14, 19}, el TNF- α ¹⁴, el factor estimulante de colonias granulo-

monocíticas (GM-CSF) y el factor transformante del crecimiento (TGF) α y β ¹⁹. Todos ellos, contribuyen al mantenimiento de las CP dentro del nicho (medular) y, por consiguiente, a su supervivencia a largo plazo (CP de vida larga).

Cuando posteriormente ocurre un segundo contacto con el antígeno que desencadene una respuesta inmune secundaria T-dependiente^{2, 8, 11, 25, 31}, junto con la activación de nuevos linfocitos B naïve, se reactivarían los linfocitos B de memoria con capacidad de diferenciación a CP^{3, 7, 11}. Este fenómeno, además de retroalimentar la reserva de linfocitos B de memoria específicos del antígeno con la posibilidad de sufrir un nuevo cambio de isotipo o de subclase de Ig (por ejemplo, desde células B IgG1 e IgA1 a IgG2, IgG4 o IgA2),⁹ conduciría a la producción de CP con capacidad de competir por los nichos de supervivencia y, ante la nueva exposición antigénica, incrementar así la concentración sérica de anticuerpos específicos^{3, 26}.

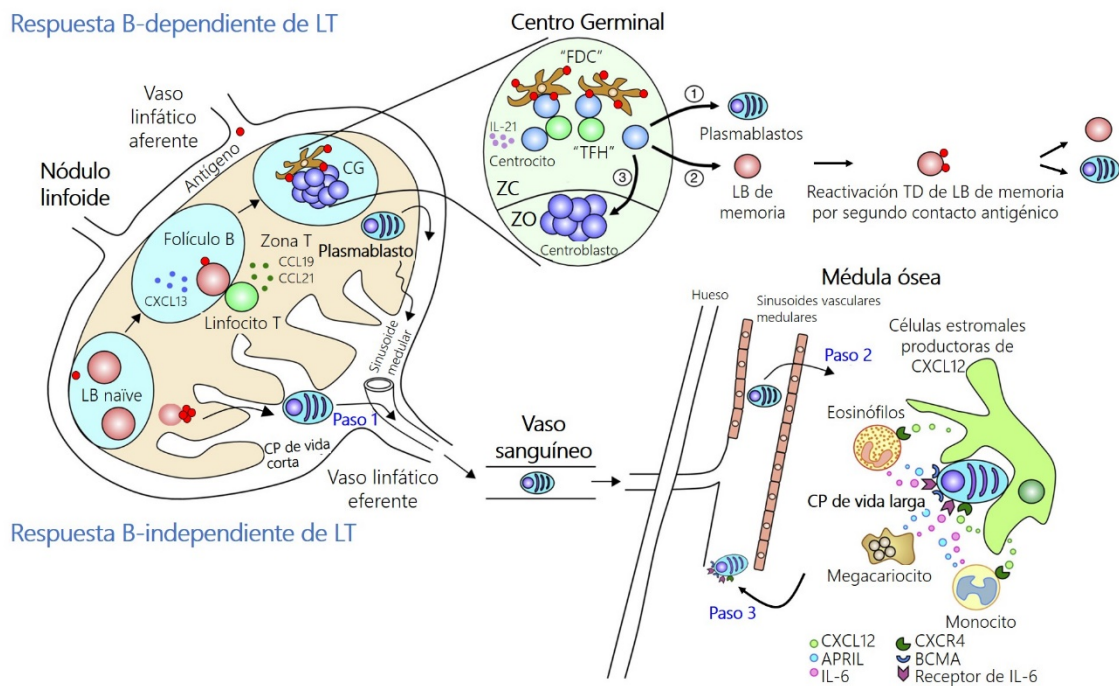


Figura 2. Representación esquemática de las distintas vías de producción y diferenciación de las células plasmáticas. Una vez que el antígeno entra al ganglio linfático, los linfocitos B naïve residentes en el espacio extra-folicular se diferencian a CP de vida corta (respuesta T-independiente). Aquellas células B que entran en proliferación en colaboración con los linfocitos T (respuesta T-dependiente), forman el centro germinal que incluye una zona oscura (ZO) altamente proliferativa donde se localizan los centroblastos y otra área conocida como zona clara (ZC) que contiene los centrocitocitos que se diferenciarán a: i) plasmablastos, ii) linfocitos B de memoria o iii) centrocitocitos que retornarán al área proliferativa para continuar con la reacción del centro germinal. Así mismo, la reactivación de los linfocitos B de memoria por un segundo contacto antigénico resultaría en la diferenciación hacia nuevos plasmablastos y células B de memoria. Una vez que el gradiente de citocinas favorece la salida de las CP recién formadas, estas migran a través de la sangre periférica hacia nichos de supervivencia en MO y otros tejidos (Paso 1). El anclaje de la CP al estroma medular, facilitado por los factores solubles secretados por las células del microambiente, favorece la supervivencia y longevidad de las CP encargadas de la producción y mantenimiento de los niveles de anticuerpos en plasma (Paso 2). La competición por el nicho medular podría generar a su vez, una recirculación de CP de vida larga, desde la MO hacia sangre periférica, donde finalmente morirían por apoptosis en caso de no alcanzar otro nicho de supervivencia (Paso 3). CP, célula plasmática; LB, linfocito B; LT, linfocito T; FDC, célula dendrítica folicular; TFH, linfocito T folicular; TD, respuesta T-dependiente. *Modificado de Kometani et al*³⁹.

1.1.2 Respuesta B independiente de linfocitos T

Habitualmente, los linfocitos B requieren de la colaboración de las células T para responder de forma eficiente frente al antígeno¹⁹. Sin embargo, en algunas circunstancias pueden inducirse respuestas B en ausencia de colaboración por parte de los linfocitos T CD4⁺^{19,29}. Estas respuestas B independientes de células T, ocurren cuando existe una estimulación prolongada e intensa de las células B⁴⁰ y están frecuentemente mediadas por moléculas no proteicas^{1,33} y antígenos multivalentes presentes en concentraciones elevadas^{19,29,40} capaces de unirse al BCR^{11,33}, al correceptor CD21/CD80/CD19 o a receptores tipo "toll" (TLR)^{19,25}, induciendo una proliferación potente de las células B estimuladas y su diferenciación a plasmablastos de vida corta con capacidad de secretar (rápidamente) anticuerpos de baja afinidad de tipo IgM^{1,19,25} (Figura 2).

Así, los antígenos implicados en la respuesta B independiente de linfocitos T, se clasifican habitualmente en dos tipos según su estructura y composición¹⁹. Por un lado, pueden ser antígenos de naturaleza lipopolisacáridica, denominados antígenos de tipo 1, presentes en la práctica totalidad de bacterias (en su mayoría gram-negativas),¹⁹ así como en ácidos nucleicos o glicolípidos¹ de virus y hongos⁴⁰, que tienen la capacidad de inducir una activación policlonal de linfocitos B naïve y de memoria localizados fuera de los folículos linfoides, en los límites entre la zona T y la pulpa roja en el bazo¹⁷, mediante su unión a TLR-4¹⁹ y CD21¹. Por otro lado, los antígenos de tipo 2, constituidos fundamentalmente por polisacáridos de la pared de bacterias encapsuladas⁴⁰ como el *Streptococcus pneumoniae*¹⁹, inducen principalmente la activación de linfocitos B de la zona marginal y de las células B-1 localizadas en mucosa¹, mediada por (la agregación del) BCR¹⁹ y su posterior diferenciación a CP secretora de IgM y, en mucho menor grado, de IgG2^{16,34}, tras expresión de AID¹⁷. Además, estos antígenos de tipo-2 podrían activar otras células secretoras de citocinas, capaces de contribuir a la diferenciación de los linfocitos B ya activados¹⁹.

Las CP (mono o poli) reactivas generadas mediante estas respuestas T-independientes, habitualmente no sufren cambio de isotipo, produciendo anticuerpos de tipo IgM¹⁹, en ausencia de memoria y sin generar, por lo tanto, protección a largo plazo¹¹. No obstante, este tipo de respuestas B son importantes a la hora de mediar una defensa rápida e inmediata, y contribuir al mantenimiento de una adecuada homeostasis tisular (p.ej. al unirse a autoantígenos inducidos durante procesos de isquemia o aterosclerosis)³³. Como consecuencia de la ausencia de interacción y colaboración con las células T, las CP de vida corta generadas en las respuestas B

T-independientes, muestran tasas bajas de hipermutación somática y de maduración de afinidad por el antígeno^{1,17}, siendo capaces de sobrevivir durante varios días a semanas, dependiendo de su interacción con BAFF y de la disponibilidad de este factor de diferenciación en el ambiente¹⁹.

1.2 Fenotipo de la célula plasmática

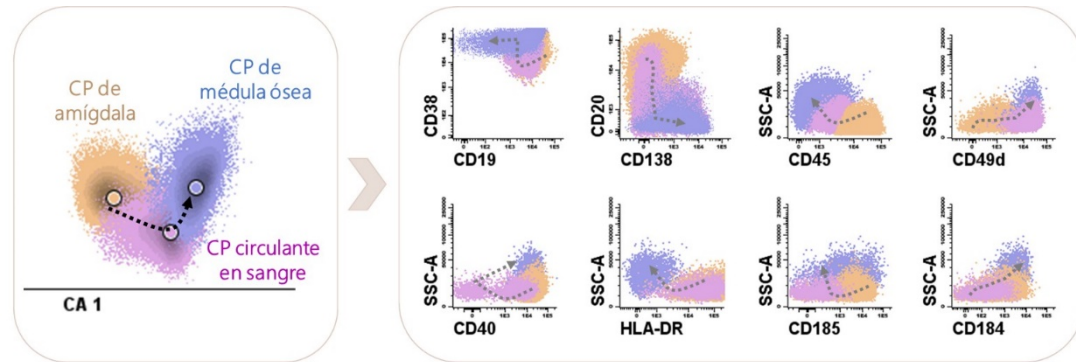
Los cambios en los patrones de expresión de proteínas que ocurren durante la diferenciación del linfocito B a CP, y dentro de éstas, desde los plasmablastos localizados en tejidos linfoides (como la amígdala), a los plasmablastos que circulan en sangre periférica y a las CP que han alcanzado ya la MO, hacen que el fenotipo de las CP sea muy distinto del que muestran los linfocitos B naïve y de memoria, pero a la vez relativamente variable y heterogéneo entre distintos tejidos^{5,12,41} (Figura 3).

En las últimas décadas, el empleo de técnicas como la inmunofluorescencia⁴² y la citometría de flujo, ha permitido definir con precisión los perfiles fenotípicos de las CP a lo largo de su maduración, desde los órganos linfoides secundarios, a sangre periférica y de ésta, a MO^{4,43-47}. Así, se sabe que la diferenciación a CP se asocia a la pérdida de marcadores pan-B como CD20, CD22 y CD24, sobreexpresión de CD38⁴¹ y CD27 como impronta de las fases finales de la reacción centro germinal^{4,48}, positividad para sindecano-1 (CD138) característica del compromiso B a CP^{49,50}, junto a niveles constantes de CD81⁵¹ y un cociente kappa (κ)/ lambda (λ) medio de $\approx 1,3$ ⁴³.

A nivel tisular, las CP características de los órganos linfoides secundarios como la amígdala, muestran un fenotipo globalmente más inmaduro (plasmablasto), conservando aún la expresión de marcadores de célula B como CD19⁺, CD20^{débil}, CD22⁺, CD45⁺ y HLADR⁺⁵, junto con la expresión de moléculas de adhesión que favorecen su localización en el tejido linfoide (CD11a⁺ CD21⁺ CD31⁺ y CD49d^{débil})⁵, en ausencia de expresión de CD138 (negativo/débil)⁵ y con un perfil pro-apoptótico reflejado por niveles de expresión débil de CD95 y Bcl-2⁵.

En contraposición, las CP detectables en sangre de adultos sanos muestran un fenotipo de transición entre los plasmablastos de los órganos linfoides secundarios y las CP de MO⁵, representando estas células, CP recién formadas que migran desde los órganos linfoides secundarios a sangre en búsqueda de nichos de supervivencia⁵⁰. Así, las CP circulantes en sangre muestran expresión débil pero homogénea de CD19 y CD45, en ausencia de CD56 y CD117⁵²,

junto con niveles elevados de CD38 (aunque inferiores a los observados en MO) ⁵ y expresión heterogénea de HLADR ⁵², CD20 y CD138 ^{4, 5, 52}. Así mismo, muestran un incremento en la positividad de CD62L ^{5, 50} y CD95 ²⁸, mayor expresión de marcadores de proliferación celular ²⁸ (Ki67⁺ heterogéneo) ⁵², junto a una reactividad débil de Ig de superficie ⁵³.



Marcadores	Plasmablastos de amígdala	Células plasmáticas circulantes	Células plasmáticas de médula ósea
Activación	CD9 ⁺ , CD10 ^{débil} , CD27 ^{débil} , CD28 ^{-/débil} , CD37 ^{débil} , CD38 ⁺ , CD39 ⁺ , CD43 ⁺ , CD45 ⁺ , CD45RO ⁻ , CD45RA ⁺ , CD45RB ⁺ , CD52 ^{débil} , CD53 ⁺ , CD63 ⁺ , CD71 ^{débil} , CD200 ⁻ , CD361 ⁺⁺	CD9 ^{-/débil} , CD10 ^{-/débil} , CD27 ⁺ , CD28 ^{-/débil} , CD37 ⁻ , CD38 ⁺ , CD39 ⁺ , CD43 ⁺ , CD45 ^{débil} , CD45RO ⁻ , CD45RA ⁺ , CD45RB ^{-/+} , CD53 ⁻ , CD63 ⁻ , CD71 ⁻ , CD200 ⁻ , CD361 ⁺⁺	CD9 ⁺ , CD10 ^{-/débil} , CD27 ⁺⁺ , CD28 ^{-/débil} , CD37 ⁻ , CD38 ⁺⁺ , CD39 ⁻ , CD43 ⁺ , CD45 ^{+/-} , CD45RO ^{+/-} , CD45RA ⁺ , CD45RB ⁻ , CD52 ⁻ , CD53 ⁻ , CD63 ^{débil} , CD71 ⁻ , CD200 ^{-/débil} , CD361 ⁺⁺
Adhesión	CD11a ⁺ , CD18 ^{débil} , CD31 ^{débil} , CD44 ⁺ , CD47 ⁺ , CD49d ^{débil} , CD49f ⁻ , CD49e ⁻ , CD50 ⁺ , CD54 ⁺ , CD56 ⁻ , CD62L ⁻ , CD81 ⁺ , CD82 ⁺ , CD97 ^{débil} , CD98 ⁺ , CD99 ⁺ , CD100 ^{débil} , CD106 ⁻ , CD138 ⁻ , CD329 ^{débil} , CD362 ^{-/+} , CD363 ⁻	CD11a ^{-/débil} , CD18 ⁻ , CD31 ⁺ , CD44 ⁺ , CD47 ⁺ , CD49d ⁺ , CD49f ^{débil} , CD49e ⁻ , CD50 ^{-/débil} , CD54 ^{+/-} , CD56 ⁻ , CD62L ^{+/-} , CD81 ⁺ , CD82 ⁺ , CD97 ^{débil} , CD98 ⁺ , CD99 ⁺ , CD100 ⁻ , CD106 ⁻ , CD138 ^{+/-} , CD329 ⁺ , CD362 ⁺⁺ , CD363 ^{+/-}	CD11a ^{-/débil} , CD18 ⁻ , CD31 ⁺⁺ , CD44 ⁺ , CD47 ⁺ , CD49d ⁺⁺ , CD49f ⁺ , CD49e ^{+/-} , CD50 ⁻ , CD54 ⁺ , CD56 ^{+/-} , CD62L ⁻ , CD81 ⁺ , CD82 ⁺ , CD97 ^{débil} , CD98 ⁺ , CD99 ⁺ , CD100 ⁻ , CD106 ⁺⁺ , CD138 ⁺ , CD362 ⁺ , CD363 ⁻
Señalización del BCR	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD21 ⁺ , CD22 ⁺ , CD79a ⁺ , CD79b ^{débil} , HLADR ⁺⁺	CD19 ^{débil} , CD20 ^{+/-} , CD21 ^{+/-} , CD22 ^{-/débil} , CD79a ^{+/-} , CD79b ⁻ , HLADR ^{+/-}	CD19 ^{+/-} , CD20 ^{-/débil} , CD21 ^{-/débil} , CD22 ⁻ , CD79a ⁺ , CD79b ⁻ , HLADR ⁻
Receptores de quimiocinas	CD184 ^{débil} , CD185 ^{-/+} , CD196 ^{-/+}	CD184 ^{-/+} , CD185 ^{-/+} , CD196 ⁻	CD184 ^{-/+} , CD185 ^{-/débil} , CD196 ⁻
Receptores del complemento	CD35 ^{-/débil} , CD46 ⁺ , CD55 ⁺ , CD58 ⁺ , CD59 ⁺	CD35 ^{-/débil} , CD55 ⁺ , CD58 ⁺ , CD59 ⁺	CD35 ^{+/-} , CD46 ⁻ , CD55 ⁺ , CD58 ⁺ , CD59 ⁺
Moléculas co-estimuladoras	CD32 ^{débil} , CD40 ⁻ , CD72 ^{débil} , CD74 ^{débil} , CD80 ⁻ , CD85 ^{débil} , CD86 ^{débil} , CD126 ^{débil} , CD130 ⁻ , CD210a ⁺ , CD272 ^{-/débil} , CD305 ⁻ , CD307a ⁻	CD32 ⁺ , CD40 ^{débil} , CD72 ⁻ , CD74 ⁻ , CD80 ^{débil} , CD85 ^{j+} , CD86 ⁺ , CD126 ⁺ , CD130 ^{débil} , CD210a ⁺ , CD272 ⁺ , CD305 ^{+/-} , CD307a ^{débil}	CD32 ⁻ , CD40 ⁺ , CD72 ⁻ , CD74 ⁻ , CD80 ⁻ , CD85 ^{j+} , CD86 ^{débil} , CD126 ⁻ , CD130 ^{débil} , CD210a ^{débil} , CD272 ^{débil} , CD305 ⁻ , CD307a ⁻
Receptores de la familia SLAM	CD48 ^{débil} , CD84 ^{-/débil} , CD150 ^{débil} , CD229 ⁺⁺ , CD319 ^{+/-} , CD352 ⁺⁺	CD48 ⁺⁺ , CD84 ^{-/+} , CD150 ⁺ , CD229 ⁺ , CD319 ^{+/-} , CD352 ⁺⁺	CD48 ⁺ , CD84 ⁻ , CD150 ⁺ , CD229 ⁺ , CD319 ⁻ , CD352 ⁺
Supervivencia	CD95 ^{débil} , CD257 ^{+/-} , CD261 ⁻ , CD262 ⁻ , CD268 ⁺ , CD269 ^{-/débil} , CD270 ^{débil} , CD274 ⁺ , CD357 ⁻ , CD358 ⁻ , Bcl2 ⁻	CD95 ⁺ , CD257 ^{+/-} , CD261 ⁻ , CD262 ⁻ , CD268 ⁺ , CD269 ^{débil} , CD270 ⁺ , CD274 ⁺ , CD357 ^{débil} , CD358 ⁻ , Bcl2 ^{débil}	CD95 ⁻ , CD257 ⁺ , CD261 ⁻ , CD262 ^{débil} , CD268 ⁺ , CD269 ⁻ , CD270 ^{débil} , CD274 ⁻ , CD357 ⁻ , CD358 ^{débil} , Bcl2 ⁺
Proliferación y producción de Ig	Ki67 ^{+/-} , Vs38c ^{-/+} , smlg ⁺ , cylgH ⁻	Ki67 ^{+/-} , Vs38c ^{+/-} , smlg ^{+/-} , cylgH ^{+/-}	Ki67 ^{-/débil} , Vs38c ⁺ , smlg ^{-/débil} , cylgH ⁺⁺

Figura 3. Representación esquemática del patrón inmunofenotipo observado durante la diferenciación de la CP desde los órganos linfoides secundarios hacia MO, pasando por sangre periférica. En el panel superior se muestra el fenotipo de las distintas poblaciones de CP de acuerdo con su localización tisular y grado de maduración, mediante análisis de componentes principales (CA) y diagramas convencionales de puntos de citometría de flujo. En el panel inferior, se detallan los perfiles fenotípicos diferenciales de CP en distintos estadios madurativos. Sm, superficie de la membrana citoplasmática; cy, intracitoplasmático (del inglés *cytoplasmic*); het, heterogéneo.

Finalmente, las CP de MO adquieren un fenotipo más maduro ¹⁹, mostrando expresión heterogénea de CD19, CD45 ^{4, 54}, HLADR ⁵ y CD56 ^{41, 55}, asociada a una marcada positividad para CD138 ^{5, 19, 56}. Este fenotipo variable, permite dividir las CP normales de MO en 3 compartimentos

madurativos, según la expresión de CD19 y CD56: una población más inmadura CD19⁺CD56⁻ (proveniente de sangre periférica), CP intermedias CD19⁻CD56⁻ en transición hacia el fenotipo más maduro, definido por la ausencia de expresión de CD19 con positividad para CD56 (CD19⁻CD56⁺)^{4, 57}. Estas diferencias fenotípicas se relacionan a su vez, con cambios paralelos en la expresión de otros marcadores, como la disminución progresiva de la positividad para CD45 (CD45^{-/+})⁵⁸. Además, las CP normales de MO muestran pérdida de expresión de marcadores B como CD20, CD21, CD22⁴⁸, HLADR⁵⁹ e Ig de superficie⁶⁰, junto a un patrón de expresión de moléculas de adhesión que les permite anclarse al microambiente medular (CD11a⁻, CD31⁺⁺, CD49d⁺⁺⁵ CD38⁺⁺^{57, 61} y CD117⁻^{43, 57, 62}), así como un fenotipo anti-apoptótico caracterizado por negatividad para CD95 y niveles elevados de Bcl-2 a nivel citoplasmático^{5, 63}, asociado a una baja tasa proliferativa (Ki67^{-/débil})^{59, 63}. Este fenotipo, junto con la expresión de cantidades elevadas de Ig a nivel intracitoplasmático⁵² y la positividad fuerte para Vs38c⁵, confiere a las CP de MO un fenotipo de CP de vida larga, productora y secretora de anticuerpos^{5, 19, 49, 57}.

1.3 Función de la célula plasmática

La CP tiene como función principal la síntesis y secreción de grandes cantidades de anticuerpos^{11, 19, 33, 64}. Por ello, la CP muestra características morfológicas, bioquímicas, estructurales⁵ y moleculares³⁴ que reflejan su compromiso hacia la síntesis proteica (Ig), con un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollados (hipertrofiado), asociado a un incremento de la expresión de los factores de transcripción Blimp-1¹⁹, XBP1¹⁸ e IRF4⁶⁵. En este sentido, una vez que el linfocito B se activa y comienza el proceso de diferenciación a CP, se produce una regulación negativa de la expresión de factores de transcripción asociados a la célula B (principalmente de aquellos que están bajo la influencia de PAX5), asociada a la expresión ahora de factores de transcripción relacionados con la diferenciación a CP (Blimp-1, XBP1 e IRF4). Esto se relaciona con un compromiso elevado (>70%) del transcriptoma de la CP hacia la síntesis de cadenas pesadas y ligeras de Ig, reflejado a su vez, en la activación de la vía UPR que induce acumulación de proteínas en el lumen del retículo endoplasmático y desencadena la expansión del aparato secretor de la CP. Ante la gran demanda energética que sufre la CP para ejercer su función secretora (ya que el 90% de la glucosa celular es usada en el proceso de glicosilación de anticuerpos), se produce una adaptación metabólica

de la propia CP, con sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 en su superficie celular⁶⁵.

A nivel postranscripcional, la diferenciación de un linfocito B a CP conlleva un cambio en el patrón de producción de Ig de membrana hacia sus variantes solubles¹, asociado a la producción de anticuerpos responsables de mediar mecanismos de protección inmune frente a microorganismos^{2, 11, 13} extracelulares^{1, 33} a través de: i) la neutralización del patógeno o de sus productos tóxicos¹; ii) la opsonización del antígeno con posterior captura por parte de células fagocíticas, como granulocitos neutrófilos y células del sistema monocito/macrófago; además de inducir, iii) la activación de la vía clásica del complemento; y iv) la citotoxicidad dependiente de anticuerpos; v) junto a la capacidad de mediar la desgranulación por parte de células del sistema inmune innato como el mastocito y granulocito eosinófilo¹.

En la práctica, la función específica particular de cada tipo de anticuerpo depende de su isotipo y, en concreto, de la región C-terminal de la cadena pesada de la Ig que define los nueve subtipos principales de Ig: IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 e IgE^{1, 33, 34, 36}. Los anticuerpos de tipo IgM en su forma pentamérica más abundante, activan las proteínas del sistema del complemento¹⁶. Por su parte, el isotipo IgD ha sido asociado con respuesta a procesos infecciosos a nivel de tracto respiratorio superior⁴ y con la modulación de la activación de los basófilos⁶⁶. En cuanto a los anticuerpos de tipo IgG, representan en su conjunto moléculas multifuncionales que, además de tener capacidad de opsonización de patógenos y de sus componentes moleculares (principalmente IgG1 e IgG3)^{16, 33}, activan el complemento (IgG3 sobre todo³³ aunque con menor eficiencia que la IgM¹⁷), y tienen un papel preponderante en la inducción de citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediante su unión a los receptores FcγRI-III CD64, CD32 y CD16 de las células fagocíticas (p.ej. macrófagos y granulocitos neutrófilos) y de las células *Natural Killer* (NK)¹ (principalmente la IgG1 e IgG3³³). Además, hoy día se sabe que ambos isotipos de IgA (IgA1 e IgA2) ejercen su acción de forma preferente en la piel y mucosas del tracto respiratorio^{1, 16, 67} y en el lumen de la mucosa gastrointestinal, actuando frente a patógenos localizados en esos tejidos^{1, 15, 16, 68}. Finalmente, la IgE actuaría de forma preferente en la respuesta inmune frente a parásitos y en reacciones de hipersensibilidad mediante su unión al receptor Fc de alta afinidad específico de esta Ig (FcεRI), expresado de forma constitutiva en granulocitos basófilos¹⁶ y en mastocitos, al igual que tras la activación de otras células del sistema inmune como los granulocitos eosinófilos^{1, 33}. Estructuralmente, cada molécula de anticuerpo, además de

dos copias de la cadena pesada, tiene dos copias idénticas de cadena ligera κ o λ ³⁷, cuya distribución dentro del conjunto de linfocitos B normales de sangre periférica se sitúa en una proporción de alrededor de 55% / 45%¹.

La cinética de distribución de las CP a lo largo de la vida es muy variable. Hasta la fecha, no se han detectado CP normales circulantes en sangre de cordón umbilical en el momento del nacimiento, incluso cuando se han empleado técnicas de citometría de flujo de elevada sensibilidad⁹. Posteriormente, el número de CP se incrementa exponencialmente en sangre durante los primeros días, semanas y meses de vida, debido al contacto continuo con nuevos antígenos tras el nacimiento, tanto a nivel respiratorio como gastrointestinal, alcanzándose los niveles más elevados de CP en sangre entre el año y los dos años de vida^{9,10}. A partir de este momento, el número de CP comienza a disminuir progresivamente en la circulación sanguínea hasta la edad adulta. No obstante, cabe resaltar que la distribución en sangre de las CP circulantes muestra un perfil distinto según el isotipo y subclase de Ig. Así, para las CP IgM⁺ se alcanzan los niveles más elevados en sangre entre los 6-18 meses de vida, momento en el que muestran también su pico máximo las CP circulantes IgG3⁺, IgG1⁺ e IgA1⁺. Por el contrario, las CP IgG2⁺, IgG4⁺ e IgA2⁺, muestran sus niveles más elevados más tarde, entre el primer y segundo año de vida⁹.

Ante las variaciones observadas en la tasa de producción de CP en cada sujeto a lo largo de la vida, resulta comprensible que de la misma manera oscilen también a lo largo de la vida, los niveles globales de anticuerpos en plasma, así como sus distintos isotipos y subclases^{9,69}. En este sentido, cabe señalar que, los niveles de anticuerpos solubles no solo dependen del número de linfocitos B activados por antígenos y del número de CP circulantes generadas, sino también de la extensión de la proliferación de los linfocitos B activados, de su tasa de diferenciación hacia CP de vida larga con capacidad secretora de anticuerpos⁷, de la cantidad de anticuerpos secretados por cada CP y de su vida media⁹.

A nivel sérico, se conoce que, aunque una parte significativa de los títulos de Ig podría provenir de las CP de vida corta que son generadas continuamente tras contacto antigénico^{3,8,64}, la producción de anticuerpos sostenida en el tiempo se debe a las CP de vida larga^{11,31} localizadas en los nichos (especializados) de supervivencia, principalmente en MO^{10,11} y en la lámina propia del intestino^{1,15,68}. Dado que gran parte de la IgA e IgM producidas se liberan a las secreciones externas⁷⁰, los anticuerpos de tipo IgG son los más abundantes en la circulación

(plasma), seguido de los niveles de IgA (probablemente la Ig producida diariamente en mayor cantidad) e IgM, mientras que la concentración sérica de IgD, y particularmente de IgE, es mínima en adultos sanos^{9, 26}.

2. Neoplasias de células plasmáticas

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) define las neoplasias de CP como un grupo de neoplasias de células B maduras⁷¹⁻⁷³ caracterizadas por la expansión y acumulación de CP clonales en MO⁷⁴, detectándose además (en algunos casos) CP tumorales en la circulación sanguínea o en tejidos extramedulares⁷⁵, que pueden incluso predominar sobre las de MO⁷³. Así, en términos generales, las neoplasias de CP engloban un amplio abanico de enfermedades entre las que merece destacar la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), el mieloma múltiple quiescente o asintomático (MMQ), el mieloma activo (mieloma múltiple; MM) y la leucemia de células plasmáticas (LCP). Además, bajo la denominación de neoplasias de CP localizadas, se incluyen otras entidades como el plasmocitoma solitario (de hueso o extraóseo), junto a los síndromes por depósito de Ig en tejidos, que incluyen la amiloidosis por depósito de cadenas ligeras y la enfermedad sistémica por depósito de Ig monoclonales (de cadenas pesadas y ligeras), así como los síndromes asociados a neoplasias de CP con manifestaciones paraneoplásicas (tipo el síndrome POEMS o, el recientemente identificado^{76, 77}, síndrome TEMPI)⁷³. Además de estas neoplasias de CP, se conocen otras enfermedades que involucran la presencia de CP clonales, como el linfoma linfoplasmocítico IgM del tipo macroglobulinemia de Waldenström, o el linfoma linfoplasmocítico IgG o IgA. No obstante, estas últimas entidades, se incluyen dentro de las neoplasias (leucemias/linfomas) de células B maduras/periféricas al presentar un predominio habitualmente de linfocitos B clonales, simultáneamente con la presencia de CP clonales⁷¹⁻⁷³.

De forma característica, las CP tumorales de pacientes con neoplasias de CP, secretan una proteína única⁷⁸ denominada paraproteína, proteína-M o componente monoclonal (CM), la cual es detectable en suero y/u orina en la gran mayoría de los casos⁷². Tanto el depósito o acumulación de esta proteína monoclonal y de las CP tumorales en MO, como el exceso de citocinas liberadas por parte del tumor o del estroma tumoral, son responsables del daño orgánico atribuible a estas neoplasias, especialmente en sus variantes malignas⁷⁵.

Desde el punto de vista ontogénico, aunque actualmente no se conoce con precisión la contrapartida normal de la célula tumoral ancestral de la CP clonal, es posible que en la mayoría de las neoplasias de CP esta célula ancestral se corresponda con la contrapartida neoplásica de una CP de vida larga post centro germinal ⁷⁹, con cambio de isotipo e hipermutación somática ⁷². Así, hoy se postula que precisamente a nivel de la maduración/diferenciación B post centro germinal ⁷⁵, podrían ocurrir las traslocaciones cromosómicas (específicas) que involucran al gen *IGH* -p.ej. t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) y t(14;16)(q32;q23)-. Estas traslocaciones, junto con la inestabilidad cromosómica generadora de aneuploidía del ácido desoxirribonucleico -ADN- (en forma de hiperdiploidía), constituirían los eventos oncogénicos primarios de las neoplasias de CP. Las traslocaciones cromosómicas que afectan al gen *IGH*, activan oncogenes como *CCND1* (ciclina-D1), *FGFR3* (abreviado del inglés, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-3), *MMSET* (abreviado del inglés, dominio SET del mieloma múltiple), *MAF*, *MAFB* y *CCND3*, capaces de alterar la regulación normal del ciclo celular de la célula tumoral y favorecer su expansión y supervivencia en MO ^{75, 80, 81}. Posteriormente, la aparición de mutaciones adicionales en los genes *K-RAS*, *N-RAS*, *BRAF*, *FAM46C*, *DIS3*, *TP53* entre otras alteraciones (menos frecuentes), con afectación de las vías de señalización celular de NFκβ, PI3K y AKT, unidas a anomalías epigenéticas (por hipo- o hipermetilación del ADN), consolidaría la instauración en la célula tumoral de los eventos oncogénicos secundarios responsables de la inmortalización celular y de la progresión clínica ^{75, 81}, desde formas benignas y asintomáticas (como la GMSI y el MMQ) a las variantes malignas y más agresivas de la enfermedad (MM y LCP) ^{82, 83} (Figura 4).

En la actualidad se sabe que la aparición de las alteraciones genéticas primarias características de las gammapatías monoclonales y otras enfermedades de CP, modificarían el crecimiento y comportamiento de las CP clonales, su supervivencia e interacción con el microambiente medular, contribuyendo a incrementar su capacidad de diseminación extramedular y su resistencia a los tratamientos citotóxicos ^{74, 84}. Precisamente, la existencia de una interacción anómala entre las CP tumorales y el microambiente de MO, se ha sugerido podría constituir un mecanismo clave en la progresión maligna de la enfermedad, desde estadios asintomáticos como la GMSI y el MMQ, hasta las formas malignas de la enfermedad, como el MM y la LCP. Esta alteración se asociaría con una pérdida de la capacidad de control del crecimiento tumoral por parte de las células del sistema inmune, con el deterioro de la función efectora de linfocitos T y células NK, la supresión de la producción de citocinas antitumorales y/o el aumento de células reguladoras T y/o

mieloides^{85,86}. A su vez, el aumento de la masa tumoral, junto con la actividad funcional alterada de las CP clonales, el depósito de CM y las nuevas interacciones generadas con el micro-medioambiente tumoral, desembocarían en i) la afectación funcional del hueso (e hipercalcemia) reflejo del desequilibrio funcional entre la actividad de los osteoblastos y la de los osteoclastos^{74,84,87,88}, ii) la inducción de un ambiente pro-angiogénico que alteraría la estructura de los vasos sanguíneos del nicho medular^{74,89} iii) la aparición de anemia y/o iv) daño tubular renal, con la consiguiente aparición de insuficiencia renal^{74,84}.

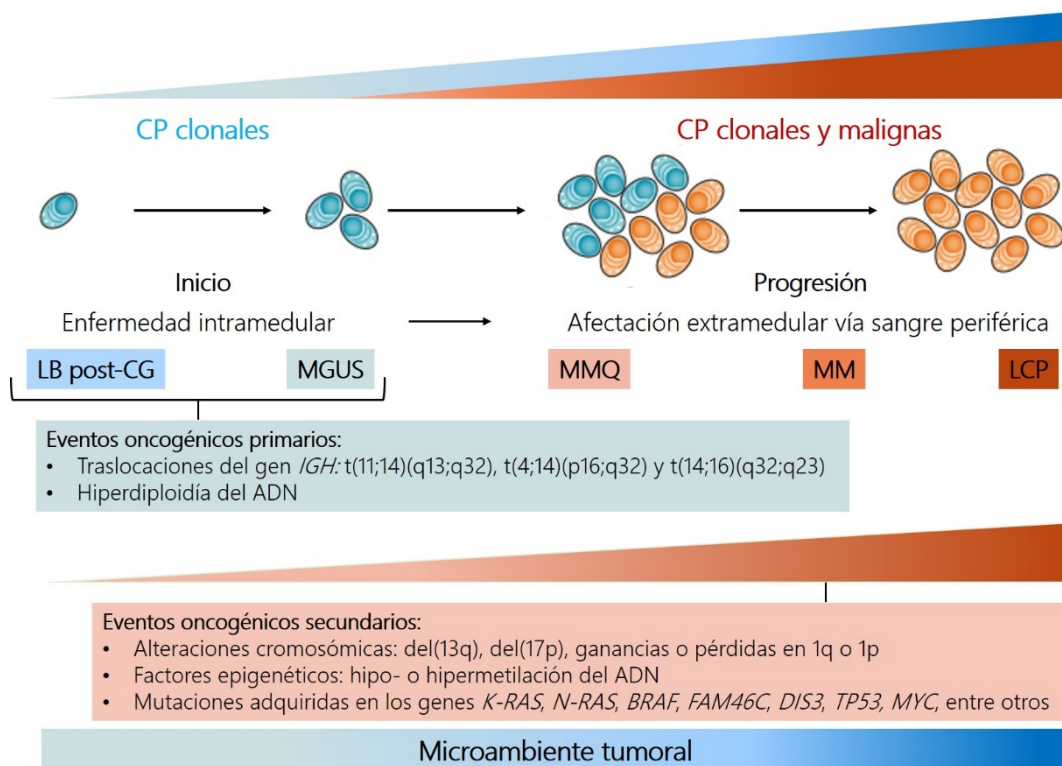


Figura 4. Mecanismos genéticos implicados en la oncogénesis y transformación maligna de la CP tumoral en las gammopatías monoclonales. La CP tumoral de pacientes con neoplasias de CP, muestra una gran heterogeneidad genética con alteraciones recurrentes que se acumulan de forma secuencial desde los estadios tempranos de la enfermedad, como la GMSI y el MMQ, hasta las formas sintomáticas y más agresivas de la misma, como el MM y la LCP, afectando de forma progresiva la capacidad de diferenciación, proliferación y supervivencia de las CP tumorales y favoreciendo su expansión, acumulación y diseminación dentro y fuera de la MO. LB, linfocito B; CG, centro germinal; CP, célula plasmática. Modificado de Kumar et al, y Fonseca et al.^{75,80}

2.1 Criterios diagnósticos

La GMSI constituye la neoplasia de CP más común⁹⁰, aumentando su prevalencia a medida que avanza la edad, desde un 3,2% en sujetos mayores 50 años a un 5,3% entre los que superan los 70 años⁹¹. Se trata de una entidad más frecuente en varones⁹² de raza negra⁹³ con una mediana de edad al diagnóstico situada alrededor de los 72 años⁹².

Debido a que cursa de forma asintomática, el diagnóstico de la GMSI constituye habitualmente un hallazgo casual, al detectarse la presencia de CM en un análisis de rutina^{94,95}. La confirmación diagnóstica requiere de un CM sérico <30g/L, asociado a una baja infiltración de MO por (<10%) de CP, con niveles mínimos de paraproteína en orina, y ausencia de signos de afectación funcional de órganos y tejidos, traducida de forma específica en la ausencia de lesiones líticas en hueso, hipercalcemia, insuficiencia renal o anemia^{90,96} (Tabla 1). En la GMSI, el CM IgG constituye el tipo de Ig más frecuente (~70%), seguida de la IgM (15%) y la IgA (12%), mientras que 3% de los casos presentan más de una paraproteína (biclonal)^{91,97} y un 0,8% muestran un CM asociado a la expresión únicamente de cadenas ligeras de Ig⁹⁸. Al igual que ocurre con las CP normales, se observa un predominio de tumores con cadenas ligeras κ (~60%) sobre los que presentan cadenas ligeras λ (~40%)⁹¹. Además, alrededor de una cuarta parte de las GMSI muestran una disminución de la concentración de al menos una de las Ig residuales (policlonales) en suero⁹¹, lo que podría explicar (al menos en parte) la inmunodeficiencia subyacente que sufren estos pacientes y su mayor riesgo (el doble) de sufrir infecciones, comparado con sujetos sanos de la misma edad⁹⁹. Aunque la mayoría de los pacientes con GMSI presentan un curso clínico estable y un comportamiento clínico benigno, alrededor de ~1%/año muestran progresión a formas más avanzadas de la enfermedad, especialmente a MMQ y MM⁹².

La amiloidosis de cadenas ligeras constituye un tipo de enfermedad por depósito causada por una neoplasia de CP o (en menor frecuencia) por una neoplasia linfoplasmocítica, en la que la célula tumoral secreta cadenas ligeras de Ig κ o λ que se depositan (en fragmentos o intactas) en forma de "hoja β -plegada" en órganos y/o tejidos causando disfunción orgánica^{73, 100, 101}. Su incidencia es relativamente baja (1 caso por 100.000 habitantes) y afecta principalmente a adultos >40 años (>95% de los casos) con una edad media al diagnóstico de ~64 años⁷³. Las características clínicas de los pacientes que presentan amiloidosis de cadenas ligeras, dependen del órgano afectado e incluyen depósito miocárdico con insuficiencia cardíaca o arritmias, síndrome nefrótico, disfunción hepática, alteraciones gastrointestinales o neuropatía periférica¹⁰⁰. Para su diagnóstico se requiere: i) la detección de la proteína amiloide bien en biopsia de grasa abdominal subcutánea, en MO o en el órgano afectado, mediante coloración de rojo Congo, junto con ii) la presencia de un cociente alterado entre las cadenas ligeras de Ig libres (CLL) en suero y iii) la identificación de CM sérico (o en orina) por inmunofijación, que suele estar en torno a una concentración media de 14 g/L y ser de tipo IgG/lambda en la mayoría (70%) de los casos

⁷³ (Tabla 1). A nivel molecular, más de la mitad (61%) de los pacientes con amiloidosis presenta un perfil citogenético asociado a la traslocación t(11;14) ¹⁰⁰ y, en menor medida, a la deleción parcial del brazo largo del cromosoma 13 (del13q14) o la ganancia del brazo largo del cromosoma 1 (+1q21) ⁷³. Hoy sabemos que en prácticamente todos los pacientes con amiloidosis de cadenas ligeras primarias, existen CP clonales en MO, aunque en cantidades similares o (incluso) inferiores a las detectadas en sujetos diagnosticados de GMSI ^{102, 103}.

El mieloma múltiple quiescente o asintomático (MMQ) representa una entidad biológicamente heterogénea ¹⁰⁴, con un comportamiento clínico y biológico intermedio entre la GMSI y el MM ⁷⁸. Para su diagnóstico se requiere la presencia de CM sérico $\geq 30\text{g/L}$ (o $\geq 500\text{mg}$ de paraproteína en orina de 24 horas) y/o una proporción de CP en MO $\geq 10\%$ y $< 60\%$, en ausencia de signos clínicos de enfermedad sintomática que definen el MM o la amiloidosis ⁹⁶ (Tabla 1). En conjunto, el MMQ representa en torno al 6% de las neoplasias de CP ⁹⁰, siendo más frecuente en varones, con una mediana de edad de 64 años ¹⁰⁵. En gran parte de estos pacientes se observa inmunoparesia (52% ¹⁰⁶- 83% ¹⁰⁵), reflejada por la reducción de los niveles séricos de las Ig residuales policlonales. Aunque en el momento del diagnóstico los pacientes con MMQ se encuentren por definición asintomáticos, una importante proporción (10%/año) termina desarrollando enfermedad sintomática (es decir, MM) ¹⁰⁵.

El MM representa 1,8% de todos los tumores malignos, siendo la segunda neoplasia hematológica maligna más frecuente responsable de casi 13.000 muertes al año ¹⁰⁷. Su epidemiología es similar a la del resto de enfermedades de CP, detectándose de forma predominante en varones de raza negra ⁷⁵, con una mediana de edad al diagnóstico de 70 años ^{72, 73}. Al tratarse de una entidad clínica y biológicamente heterogénea ⁷⁵, para el diagnóstico del MM se requiere de una combinación de marcadores clínicos, bioquímicos, histopatológicos y radiológicos ¹⁰⁸. Así, en la gran mayoría de los pacientes ($\approx 97\%$) ⁷⁵ se detecta un CM significativamente alto en suero ($> 30\text{g/L}$) ¹⁰⁸, frecuentemente de isotipo IgG (50% de los casos), seguido de IgA (20%) y de la expresión única de cadenas ligeras κ o λ (20%); en los demás ($< 10\%$), se detecta CM de tipo IgD, IgE, IgM o biclonal ⁷³. Por definición, para el diagnóstico del MM, los pacientes deben tener infiltración de $\geq 10\%$ de CP en MO y/o presencia de uno o más plasmocitomas óseos o extramedulares (confirmado mediante biopsia), asociado a una afectación funcional subyacente de la MO, del hueso y/o del riñón, manifestada en al menos uno de los cuatro criterios CRAB que definen el MM sintomático ^{84, 96}: i) hipercalcemia ($> 11\text{ mg/dL}$); ii)

insuficiencia renal (reflejado en una disminución de la depuración de creatinina por debajo de 40mL/min o valores de creatinina sérica >2 mg/dL); iii) anemia (con niveles de hemoglobina inferiores a 100 g/L); y/o iv) lesiones óseas detectadas mediante rayos X o tomografía axial computarizada (con o sin emisión de positrones)⁹⁶ (Tabla 1).

En el año 2014, el Grupo Internacional de Trabajo en Mieloma (IMWG, siglas del inglés *International Myeloma Working Group*), estableció criterios diagnósticos adicionales para pacientes con MM que no presentan signos CRAB al diagnóstico. Así, según el IMWG, para el diagnóstico del MM en ausencia de criterios CRAB, se requiere la presencia de al menos uno de los siguientes marcadores de malignidad⁹⁶: i) infiltración de MO con >60% de CP con restricción de expresión de las cadenas ligeras de Ig κ/λ mediante técnicas de citometría de flujo, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia; ii) existencia de un cociente ≥ 100 entre CLL en suero, en favor de la cadena ligera producida por la célula tumoral; y iii) presencia de >1 lesión focal con diámetro mínimo de 5 mm, evidenciada mediante resonancia magnética nuclear⁹⁶ (Tabla 1).

En un pequeño porcentaje de casos ($\approx 3\%$), aunque se observan hallazgos clínicos, biológicos y radiológicos compatibles con MM, no se detecta la presencia de CM sérico⁷⁵. Así, en este grupo de pacientes, las CP mielomatosas pueden secretar una pequeña cantidad de Ig completa, sólo cadena ligera, o ser no secretoras^{72, 75}, siendo importante la evaluación de la actividad tumoral a través de la medición de la proteína de Bence-Jones por electroforesis e inmunofijación en orina de 24 horas⁷⁹, junto con el análisis de las CLL y su cociente en suero, además de la demostración de la naturaleza clonal/aberrante de las CP tumorales presentes en MO^{75, 108}. Así mismo, al igual que en los pacientes con MMQ, en el MM es frecuente observar un descenso significativo de los niveles de Ig normales residuales^{72, 109}, junto a un deterioro general del sistema inmune propio de la enfermedad^{110, 111}, constituyendo las infecciones recurrentes una de las complicaciones más frecuentes^{84, 112-115} y la primera causa de mortalidad precoz entre los pacientes con MM^{114, 116}.

Algunos autores sugieren que, entre los pacientes con MM, existe un grupo de enfermos en los que podría manifestarse una variante biológica^{117, 118} poco frecuente^{119, 120}, denominada MM macrofocal¹²¹, que se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones focales⁹⁶ en ausencia de infiltración importante de MO por CP (<10%)^{117, 118}, asociándose esta variante con un comportamiento clínico distinto y menos agresivo de la enfermedad^{119, 120}. Así, los pacientes con MM macrofocal suelen presentar niveles más elevados de hemoglobina¹¹⁷⁻¹¹⁹, junto con cifras séricas inferiores de β_2 -microglobulina^{117, 119}, calcio, lactato deshidrogenasa (LDH) y otros

parámetros relacionados con la función renal ^{118, 119}, acercándose su comportamiento clínico al del plasmocitoma solitario.

Tabla 1: Clasificación diagnóstica de las gammopatías monoclonales y otras neoplasias de CP según los criterios del Grupo Internacional de Trabajo en mieloma (IMWG) ⁹⁶.

Neoplasia	Concentración de CM	% de CP en MO	Daño orgánico atribuible a la neoplasia de CP	Presencia de >1 marcador de malignidad	Presencia de proteína amiloide
Plasmocitoma solitario	<30g/L	Ausencia o <10%	No	No	No
GMSI	<30g/L	<10%	No	No	No
MMQ	≥30g/L (o ≥500mg/24h en orina)	≥10% - <60%	No	No	No
MM	≥30g/L	≥10%	Sí. ≥1 criterio CRAB ^(a) : hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y/o lesiones óseas ^(b)	Sí. En ausencia de criterios CRAB: >60% de CP tumorales en MO, cociente sérico entre CLL ≥100 ^(c) , >1 LF con diámetro ≥5 mm ^(b)	Solo en caso de progresión desde amiloidosis
Amiloidosis de cadenas ligeras	<30g/L	<10%	Sí, según el órgano/tejido afectado ^(d) .	No	Sí, en biopsia de grasa abdominal subcutánea, MO o tejido afectado ^(e) .

(a)Aumento de los niveles de calcio sérico >11mg/dL, insuficiencia renal definida por niveles de depuración de creatinina <40mL/min o creatinina sérica >2 mg/dL, y anemia según una concentración de hemoglobina <100g/L; (b)Lesiones óseas detectadas mediante rayos X, CT o PET-CT; (c)Cociente de CLL en suero entre la cadena ligera de la Ig clonal vs. la normal; (d)Afectación orgánica con compromiso cardíaco, renal, hepático o por neuropatía periférica; (e)Proteína amiloide de cadenas ligeras identificada mediante coloración rojo Congo y confirmada mediante espectrometría de masas o microscopía electrónica.

CLL, cadenas ligeras libres; CM, componente monoclonal; CP, célula plasmática; CT, tomografía axial computarizada; GMSI, gammapatía monoclonal de significado incierto; LF, lesión focal; MMQ; MM quiescente; MM, mieloma múltiple; MO, médula ósea; PET, tomografía de emisión de positrones.

La leucemia de CP (LCP) se define como una entidad rara y agresiva ¹²² caracterizada por la acumulación maligna de CP en sangre periférica, con recuentos absolutos superiores a 2×10^9 CP/ μ L, que habitualmente suponen >20% de todos los leucocitos circulantes en sangre ¹²³. La LCP puede originarse *de novo* (LCP primaria; constituyendo el 60%-70% de los casos), o ser consecuencia de la leucemización que ocurre en el 1% de los pacientes diagnosticados con MM (LCP secundaria; 30%-40% de los casos) ^{124, 125}. En la LCP, la edad media al diagnóstico suele ser inferior a la de otras neoplasias de CP, rondando los 62 años ¹²⁶, con una frecuencia ligeramente

superior en mujeres caucásicas ¹²⁴. Desde el punto de vista clínico, los pacientes con LCP habitualmente presentan anemia severa, trombocitopenia ¹²⁷ y un compromiso extenso por CP tumorales en MO, siendo también frecuente (23%) la infiltración neoplásica de tejidos extramedulares ¹²⁸, como hígado o bazo, y el derrame tumoral en cavidades corporales o en líquido cefalorraquídeo, mientras que las lesiones líticas óseas suelen ser menos comunes ⁷³. Además, los pacientes con LCP pueden presentar otras alteraciones bioquímicas que incluyen niveles séricos elevados de LDH, β 2-microglobulina y calcio, además de hipoalbuminemia y leucocitosis ^{127, 129}. A nivel molecular, las CP tumorales de las LCP suelen expresar un cariotipo complejo con presencia de delección parcial del cromosoma 13 y 17 -del(13q) y del(17p), respectivamente-, ganancias o pérdidas parciales del cromosoma 1, y/o traslocaciones que involucran el gen *IGH*, como la t(11;14) y la t(14;16) ¹²⁷.

El plasmocitoma solitario es una entidad rara ($\leq 5\%$ de las neoplasias de CP) ¹³⁰, definida por la presencia de una masa tumoral compuesta por CP clonales ¹³¹, en ausencia de afectación de otros órganos y tejidos. Desde el punto de vista demográfico, el plasmocitoma solitario es más común en varones mayores de 55 años ^{72, 73} y su incidencia se incrementa progresivamente con la edad, siendo un 30% superior en la raza negra ¹³². Para su diagnóstico son clave las técnicas de imagen como la resonancia magnética ^{133, 134} o la tomografía axial computarizada por emisión de positrones (PET-TC, por sus siglas del inglés *positron emission tomography combined with computerized tomography*) ⁸⁸. Según la localización del tumor, actualmente se distinguen dos entidades: i) el plasmocitoma óseo solitario, que habitualmente afecta zonas del esqueleto axial como las vértebras y el cráneo; y ii) el plasmocitoma extraóseo que compromete tejidos blandos de la cabeza y cuello, como las cavidades nasales y nasofaríngeas ¹³². El diagnóstico definitivo se establece mediante el análisis de muestras de biopsia ^{72, 130} o aspirado con aguja fina ¹³⁴ de la lesión, al demostrarse en ellas la presencia de infiltración por CP clonales, con escasa (<10%) o nula afectación de MO ⁹⁶. Aunque es frecuente que los pacientes con plasmocitoma solitario manifiesten dolor local ¹³⁰ o sintomatología derivada de la compresión de las estructuras (órganos o tejidos) del área afectada ¹³⁴, habitualmente no presentan daño orgánico atribuible al deterioro sistémico por el tumor, como ocurre en el MM, cursando de forma característica sin anemia, lesiones líticas óseas, hipercalcemia o insuficiencia renal ⁹⁶. Así mismo, habitualmente muestran ausencia o niveles bajos de proteína-M en suero y/u orina ^{72, 121}, especialmente en el caso de pacientes con plasmocitomas extraóseos ^{130, 135}, siendo el deterioro de la respuesta inmune de

tipo humoral un hallazgo poco característico de la enfermedad (<5% de los pacientes muestran inmunoparesia) independientemente de la localización del tumor ¹³⁵. Esto se traduce en una marcada variabilidad en las tasas de progresión clínica a MM de los pacientes con plasmocitomas óseos, que oscila en los primeros 3 años tras el diagnóstico, entre el 10% y 60%, dependiendo entre otros parámetros, de la edad, tamaño del plasmocitoma y nivel de infiltración de MO por CP tumorales ⁷³. Por el contrario, la transformación maligna de los plasmocitomas extraóseos suele ser relativamente infrecuente (<15%/año) ⁷³.

2.2 Estratificación pronóstica de los pacientes con neoplasias de células plasmáticas

Tal como hemos adelantado en el apartado anterior de esta introducción, la clasificación diagnóstica de las neoplasias de CP permite en principio distinguir entre pacientes que requieren tratamiento (p.ej. MM y LCP) y aquellos en los que la enfermedad tiene un curso clínico estable en ausencia de una intervención terapéutica (p.ej. GMSI) ⁹⁶. Sin embargo, el comportamiento clínico y evolutivo dentro de cada uno de los distintos subtipos diagnósticos de neoplasias de CP es heterogéneo, condicionando, por lo tanto, un pronóstico variable a nivel individual. Hoy se sabe que tal heterogeneidad pronóstica dentro de cada entidad clínica, está relacionada, entre otros factores, con i) la carga tumoral al diagnóstico ^{97, 105} y ii) las características genéticas de la célula tumoral ¹³⁶, junto a iii) parámetros asociados con el metabolismo óseo o iv) la presencia de CP en la circulación sanguínea ¹³⁷.

2.2.1 Estratificación pronóstica de pacientes con distintos subtipos de neoplasias de células plasmáticas

La GMSI es en general, una enfermedad de curso clínico indolente con bajo riesgo de transformación maligna (1% al año) ⁹². Sin embargo, a largo plazo, en una proporción importante de pacientes (18% a 20 años) la enfermedad termina por progresar ⁹⁷. Hoy día se conoce la existencia de una asociación entre algunas características de la enfermedad y el pronóstico de las GMSI, habiéndose propuesto en la última década varios sistemas de estratificación pronóstica para pacientes con GMSI ^{97, 106, 138}. De ellos, merece destacar el índice pronóstico de la Clínica

Mayo, mediante el cual se estratifica a los pacientes con GMSI de acuerdo al cociente de las CLL en suero y la concentración y tipo de CM sérico detectado al diagnóstico, agrupándolos en cuatro grupos de (bajo, medio-bajo, medio-alto y alto) riesgo ^{94, 97, 138}. En paralelo, el Grupo Español de Mieloma (GEM) propuso un sistema de estratificación pronóstica para pacientes con GMSI basado en la fracción de CP fenotípicamente aberrantes en MO y la presencia o no de aneuploidía de ADN detectada mediante citometría de flujo; con ello se definen tres grupos de pacientes con bajo riesgo (2%), riesgo intermedio (10%) y alto riesgo (46%) de progresar a MM y una supervivencia libre de progresión a 5 años de >120 meses (no alcanzada en el tiempo de seguimiento), 120 y 61 meses, respectivamente ¹⁰⁶ (Tabla 2). Otros parámetros que podrían ser importantes a la hora de predecir el riesgo de progresión en pacientes con GMSI, son el grado de inmunoparesia definido por los niveles de cadena pesada y ligera de las Ig no clonales (medido por Hevylite®) ¹³⁹, las características genéticas y genómicas de las CP ^{85, 140} o la presencia de CP tumorales circulantes (CPTC) en sangre ¹⁴¹, como discutiremos más adelante en esta introducción.

Tabla 2: Principales índices pronósticos propuestos para la monitorización de pacientes con GMSI y predicción de riesgo de transformación a MM.

Índice pronóstico	Factores de riesgo	Grupos	Factores de riesgo	Riesgo de progresión/años (%)	Cálculo pronóstico en años
Rajkumar et al. ¹³⁸ (n=1148)	<ul style="list-style-type: none"> • CM diferente de IgG • CM ≥15g/L en suero • Cociente CLLs alterado (<0,26 o >1,65) 	Bajo	0	5%	20 años
		Bajo-Medio	1	21%	
		Medio-Alto	2	37%	
		Alto	3	58%	
Kyle et al. ⁹⁷ (n=1384)	<ul style="list-style-type: none"> • CM ≥15g/L en suero • Cociente CLLs alterado (<0,26 o >1,65) 	GMSI-IgM	0	19%	20 años
			1	41%	
			2	55%	
		GMSI-no IgM	0	7%	
			1	20%	
			2	30%	
Pérez-Persona et al. ¹⁰⁶ (n=276)	<ul style="list-style-type: none"> • ≥95% aCP/CPT en MO • Aneuploidía del ADN 	Bajo	0	2%	5 años
		Medio	1	10%	
		Alto	2	46%	

aCP, células plasmáticas con fenotipo aberrante; ADN; ácido desoxirribonucleico; CLLs, cadenas ligeras libres en suero; CM, componente monoclonal; CPT, células plasmáticas totales; GMSI, Gammapatía monoclonal de significado incierto; Ig, inmunoglobulina; MO, médula ósea.

Cabe señalar que, aunque en todos los sistemas de estratificación pronóstica propuestos hasta la fecha se identifica, dentro de los pacientes con GMSI, un pequeño grupo de casos con elevado riesgo de transformación maligna, no existe una concordancia absoluta entre los distintos modelos ya que estos no identifican exactamente los mismos pacientes como los que tienen alto riesgo de progresión a MM. Estos hallazgos indican la necesidad de establecer nuevos sistemas de estratificación pronóstica para los pacientes con GMSI, en el que se analicen simultáneamente todos los factores pronósticos identificados hasta la fecha, incluida la presencia de CPTC en sangre.

De forma similar a la GMSI, hoy se sabe también que el MMQ es una enfermedad con un pronóstico variable, asociado a un riesgo de transformación maligna de alrededor del 10%/año durante los primeros 5 años posteriores al diagnóstico ¹⁰⁵. Así, inicialmente se identificaron grupos de riesgo entre pacientes con MMQ de acuerdo con la cantidad de CM sérico, el porcentaje de CP en MO ¹⁰⁵, el grado de inmunoparesia ¹⁰⁶ y/o el cociente de CLL κ/λ en suero ^{142, 143}, asociándose los diferentes grupos establecidos de esta forma, con marcadas diferencias en las tasas de transformación a MM, que van desde un riesgo de progresión bajo (4%-25%), a medio, (43%-51%) y alto (69%-82%) ^{105, 106, 142, 143}. En paralelo, otros autores distinguen entre dos tipos de MMQ: el denominado MMQ "*evolving*" y el "*no-evolving*" ¹⁴⁴. En el MMQ de tipo "*evolving*", en los que previamente se había diagnosticado una GMSI, se observa que en dos controles consecutivos existe un incremento constante ($\geq 10\%$) de la proteína-M (generalmente del isotipo IgA) ^{144, 145} o una disminución gradual ($\geq 0,5\text{g/dL}$) de los valores de hemoglobina ¹⁴⁶, asociado a una rápida tasa de progresión a MM sintomático ¹⁴⁵ (≤ 1 año) ¹⁴⁴. Por el contrario, el MMQ con patrón "*no-evolving*" es más frecuente ¹⁴⁴ y engloba pacientes con CM estable (en suero u orina) hasta el momento de la progresión, que ocurre más tarde ¹⁴⁵. La combinación de patrones ("*evolving*" vs. "*no-evolving*"), con el porcentaje de CP fenotípicamente aberrantes en MO ¹⁴⁷, o de este último parámetro con la presencia o ausencia de inmunoparesia ¹⁰⁶, definen grupos de pacientes con MMQ con notables diferencias pronósticas, permitiendo así identificar de forma temprana aquellos pacientes que se beneficiarían de un tratamiento precoz ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ (Tabla 3).

Tabla 3: Índices pronósticos más relevantes propuestos para la estratificación pronóstica y monitorización de pacientes con MMQ.

Índice pronóstico	Factores de riesgo	Grupos	Factores de riesgo	Riesgo de progresión/años (%)	Cálculo de riesgo en años
Kyle et al. ¹⁰⁵ (n=276)	<ul style="list-style-type: none"> • CM \geq30g/L en suero • \geq10% de CP en MO 	Bajo	CM \geq 30g/L & <10%CP	15%	5 años
		Medio	CM<30g/L & \geq 10%CP	43%	
		Alto	CM \geq 30g/L & \geq 10%CP	69%	
Pérez-Persona et al. ¹⁰⁶ (n=106)	<ul style="list-style-type: none"> • \geq95% aCP/CPT en MO • Inmunoparesia 	Bajo	0	4%	5 años
		Medio	1	46%	
		Alto	2	72%	
Dispenzieri et al. ¹⁴² (n=273)	<ul style="list-style-type: none"> • CM \geq30g/L en suero • \geq10% de CP en MO • Cociente CLLs alterado (<0,125 o >8) 	Bajo	0	25%	5 años
		Medio	1	51%	
		Alto	\geq 2	76%	
Pérez-Persona et al. ¹⁴⁷ (n=61)	<ul style="list-style-type: none"> • \geq95% aCP/CPT en MO • Patrón "evolving" del CM 	Bajo	0	0%	3 años
		Medio	1	12%	
		Alto	2	46%	
Lakshman et al. ¹⁴³ (n=417)	<ul style="list-style-type: none"> • CM \geq20g/L en suero • \geq20% de CP en MO • Cociente CLLs >20 	Bajo	0	23%	5 años
		Medio	1	47%	
		Alto	\geq 2	82%	

aCP, células plasmáticas con fenotipo aberrante; CLLs, cadenas ligeras libres en suero; CM, componente monoclonal; CP, célula plasmática; CPT, células plasmáticas totales; MMQ, mieloma múltiple quiescente o asintomático; MO, médula ósea.

Comparado con la GMSI y el MMQ, los sistemas de estratificación pronóstica establecidos para pacientes con plasmocitoma, son mucho más limitados y recientes¹²¹. Aun así, en ellos también tiene especial relevancia la carga tumoral¹²¹, la afectación orgánica¹⁵¹ y la respuesta al tratamiento,⁸⁸ como factores pronósticos más importantes dentro de esta entidad. Sin embargo, debido a que son entidades muy poco frecuentes, la mayoría de los estudios recogidos en la literatura cuentan con un número limitado de casos, lo cual dificulta la validación de los algoritmos propuestos¹³⁵. Pese a estas limitaciones, se han definido como factores de riesgo de progresión de plasmocitoma solitario a MM y menor supervivencia, la presencia de inmunoparesia^{135, 152}, los niveles de la proteína-M en suero¹⁵¹, la presencia de CP tumorales en MO (tanto por biopsia^{96, 151} como por citometría de flujo^{153, 154}) y el hallazgo de cadenas ligeras en orina por inmunofijación¹⁵³.

Respecto a los pacientes con amiloidosis, el factor pronóstico determinante lo constituye la extensión del daño cardíaco^{73, 100}. Además de la demostración de alteraciones en las pruebas funcionales y de imagen, el hallazgo de niveles séricos elevados de troponina-T cardíaca (cTnT, del inglés *cardiac troponin T*) y del propéptido N-terminal del péptido natriurético (NT-ProBNP,

del inglés *N-terminal propeptide*), representan marcadores relativamente rápidos, fáciles de obtener y de gran utilidad a la hora de evaluar el nivel de compromiso cardíaco, asociándose su incremento con un pronóstico más adverso en estos pacientes. Recientemente, se ha incorporado la determinación de la diferencia entre la concentración sérica de la cadena ligera de la Ig clonal/afectada *vs.* la normal/residual (dCLL), como variable pronóstica a considerar en la monitorización de los pacientes con amiloidosis. De esta manera, la combinación de los niveles séricos de cTnT, NT-ProBNP y dCLL entre sí, permitiría identificar 4 grupos de riesgo con marcadas diferencias pronósticas, reflejadas en unas tasas de supervivencia media de 94,1 meses, 40,3 meses, 14 meses y 5,8 meses, respectivamente ^{100, 155}. En contraposición con lo que ocurre en el MM, la presencia de la t(11;14) en amiloidosis, se asocia con un perfil citogenético de alto riesgo, con impacto negativo en la supervivencia libre de progresión y en la respuesta a los protocolos de tratamiento basados en inhibidores del proteasoma, como el bortezomib ¹⁰⁰. Así mismo, se ha descrito que la presencia de >10% de CP en MO ¹⁵⁶, una marcada inmunoparesia (con supresión de todas las Ig normales/residuales) ¹⁵⁷ y concentraciones elevadas de β 2-microglobulina o de ácido úrico ⁷³, constituirían factores pronósticos adversos adicionales en estos pacientes.

En general, el MM activo se considera una neoplasia maligna de CP que requiere de tratamiento anti-tumoral para conseguir una respuesta lo más profunda posible que pueda condicionar una supervivencia más prolongada, mejorando también su calidad de vida ^{74, 79}. No obstante, el pronóstico de los pacientes con MM es heterogéneo, producto de las diferencias en la biología y la masa tumoral, así como en la edad y estado clínico del enfermo al diagnóstico ¹⁰⁸. Por este motivo, se han propuesto sistemas predictivos que permiten clasificar a los pacientes con MM de acuerdo con su riesgo pronóstico. Inicialmente, se identificaron factores pronósticos adversos con valor predictivo independiente, como las concentraciones bajas de hemoglobina, la presencia de (numerosas) lesiones óseas, las concentraciones elevadas de calcio sérico y de CM en suero y orina, conformando su combinación, el primer intento de clasificación pronóstica del MM de "Durie-Salmon" ¹⁵⁸. A partir de entonces, se han identificado otras variables con impacto pronóstico en el MM. De ellas, cabe destacar los niveles elevados de β 2-microglobulina ¹⁵⁹ y disminuidos de albúmina, ¹⁶⁰ incluidos posteriormente en el sistema de estratificación (pronóstica) internacional (ISS), tras su validación en una amplia serie de pacientes de distintos países ¹⁶¹. El pronóstico heterogéneo de los pacientes incluidos en cada estadio ISS, unido al valor predictivo adicional de algunas alteraciones citogenéticas ^{80, 162} y de los niveles de LDH en suero

^{163, 164}, llevaron a la revisión del sistema de estratificación pronóstica internacional (R-ISS), en el que junto con las variables del ISS clásico, se incorporan nuevos factores predictivos como los niveles de la enzima LDH en suero y la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo, incluidas la t(4;14)(p16;q32), la t(14;16)(q32;q23) y la del(17p) ¹³⁶ (Tabla 4).

Desde entonces, se han identificado nuevos factores pronósticos dentro del MM, con valor predictivo independiente de los parámetros incluidos en el R-ISS, entre los que se incluyen la concentración de cadena pesada y ligera de Ig libres producidas por las CP tumorales, los niveles de Ig normales/residuales y de sus cocientes obtenidos mediante el ensayo Hevylite® ^{165, 166} o el número de CPTC en sangre ¹⁶⁷⁻¹⁷², aunque hasta la fecha, no se han incluido ninguno de estos parámetros en los sistemas de estratificación pronóstica de los pacientes con MM.

Tabla 4: Clasificaciones y criterios pronósticos empleados para la estratificación de riesgo en pacientes con MM.

Índice pronóstico	Factores de riesgo	Estadio	Factores de riesgo	Supervivencia media (meses)
Durie & Salmon ¹⁵⁸ (n=105)	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de Hb <85g/L • Calcio sérico \geq12mg/dL • Lesiones óseas extensas • CM \geq20g/L en suero 	IA	0	191
		IIA	1	54
		IIB		11
		IIIA		\geq 2
		IIIB	5	
→ Subclasificación (Estadio A o B) según la presencia de fracaso renal reflejado en valores de creatinina sérica \geq 2mg/dL				
ISS ¹⁶¹ (n=10.755)	<ul style="list-style-type: none"> • β2-microglobulina sérica (>3,5mg/L y <5mg/L) • Albúmina sérica <3,5g/dL 	I	0	62
		II	\geq 1	44
		III	β 2-microglobulina sérica \geq 5mg/L	29
R-ISS ¹³⁶ (n=3.060)	<ul style="list-style-type: none"> • ISS-3 • LDH sérica aumentada • Citogenética de alto riesgo por FISH* 	I	0	No alcanzado
		II	1 o 2	83
		III	3	43

*Citogenética del alto riesgo definida por presencia de t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23) o delección(17p). CM, componente monoclonal; FISH, hibridación fluorescente *in situ*; Hb, hemoglobina; ISS, sistema de estratificación pronóstica internacional; LDH, lactato deshidrogenasa; MM, mieloma múltiple; R-ISS, sistema de estratificación pronóstica internacional revisado.

2.2.2 Otros factores pronósticos

Durante el diseño de los sistemas de estratificación pronóstica internacional (es decir, ISS y R-ISS) para el MM, se confirmó el valor predictivo de otras variables que no mostraron influencia directa (e independiente) en los análisis de supervivencia de estos pacientes. Así, aunque los niveles de β 2-microglobulina y albúmina sérica dominaron como factores pronósticos

independientes a la hora de diseñar la clasificación ISS, otros parámetros como un bajo recuento de plaquetas ($<130.000/\mu\text{L}$), y niveles elevados de creatinina en suero ($>4\text{mg/dL}$), mostraron también un impacto negativo en la supervivencia global de los pacientes con MM. Por el contrario, la edad al diagnóstico (≥ 65 años), la concentración de hemoglobina ($<100\text{g/L}$), los niveles de calcio ($>10\text{mg/dL}$) y de LDH sérica (por encima del valor de referencia), o el porcentaje de infiltración de MO por CP ($\geq 33\%$), no mostraron valor pronóstico independiente adicional, respecto a los parámetros incluidos en la escala de riesgo ISS ¹⁶¹. De manera similar, al diseñar la estratificación de riesgo según R-ISS, además de la incorporación de los niveles de LDH y del perfil citogenético de la CP tumoral a las variables del ISS, se confirmó la desventaja pronóstica asociada a edad mayor de 65 años ¹³⁶.

Además, en los últimos años se han identificado otros factores predictivos del comportamiento clínico y evolutivo de la GMSI, el MMQ y/o el MM, de los que merece destacar las variables asociadas al metabolismo óseo, las alteraciones genéticas y la presencia y número de CPTC en sangre, tal como se describirá en los siguientes apartados de la introducción de esta memoria de tesis doctoral.

2.2.2.a- Parámetros pronósticos asociados al metabolismo óseo

Ya desde las formas más tempranas de gammapatía monoclonal, como la GMSI y el MMQ, se detectan alteraciones en la homeostasis del hueso, asociadas habitualmente a un incremento de la reabsorción ósea (por mayor actividad de los osteoclastos y altos niveles de la proteína derivada de los macrófagos $1-\alpha$) ¹⁷³. Aunque por definición los pacientes con GMSI no presentan lesiones óseas como tal ⁹⁶, sí pueden mostrar ya algunas alteraciones metabólicas que podrían favorecer en el futuro su aparición, junto a un mayor riesgo de fracturas patológicas ⁸⁵ y osteoporosis por alteración de la arquitectura esquelética ¹⁷³. A su vez, los pacientes con MMQ sí podrían presentar lesiones focales en una única localización, dentro o fuera del esqueleto axial ¹⁷⁴, asociándose un aumento progresivo de su diámetro ($\geq 1\text{cm}$) ¹⁷⁵ o la detección de un patrón difuso de infiltración medular mediante resonancia magnética ^{174, 175}, con una rápida progresión y transformación maligna a MM. Así mismo, el incremento en la captación focal o la evidencia de lesiones osteolíticas mediante técnicas como el PET-CT, identificaría también a un subgrupo de MMQ de

peor pronóstico, con un elevado (75%) riesgo de transformación maligna en los dos años siguientes al diagnóstico ¹⁷⁶.

En pacientes con plasmocitoma solitario, hoy se conoce que la localización del tumor constituye un factor predictivo del futuro comportamiento clínico de la enfermedad ¹⁵¹. Así, los pacientes con plasmocitomas óseos tienen un riesgo más elevado de progresión (50%-60%) entre 2 y 4 años tras el diagnóstico ¹²¹, frente a los plasmocitomas extraóseos que presentan una menor tasa de progresión (<15%) ¹³². Además, en el plasmocitoma solitario, influyen también en la progresión del tumor, un mayor tamaño del mismo ¹⁵¹ y la presencia de osteopenia ^{132, 152}.

Dado que la afectación ósea constituye una de las principales causas de morbilidad en enfermos con MM ^{87, 88}, tal como sería de esperar, esta constituye también un factor pronóstico adverso, incluido en el sistema de clasificación propuesto inicialmente por *Durie y Salmon* en 1975 ¹⁵⁸. Además, la existencia de afectación extramedular, tiene un impacto negativo tanto sobre la supervivencia libre de progresión como sobre la supervivencia global de los pacientes con MM ^{166, 177, 178}, principalmente entre aquellos que no son candidatos a tratamientos intensivos seguidos de trasplante ^{179, 180}, asociándose a i) un cuadro clínico más agresivo, ii) mayor heterogeneidad genética a nivel intraclonal y iii) resistencia al tratamiento ¹³¹. Una excepción la constituirían los pacientes con MM que presentan un patrón macrofocal con escasa infiltración medular, quienes en general constituyen una variante de MM con un mejor curso evolutivo de la enfermedad ¹¹⁷⁻¹²⁰.

2.2.2.b- Alteraciones genómicas y pronóstico en gammapatías monoclonales

El MM constituye una enfermedad muy heterogénea desde el punto de vista genético y molecular ^{75, 85}, asociándose algunos perfiles concretos de alteración genética con subgrupos de pacientes con distinto comportamiento clínico ^{80, 136, 181}. Con el empleo temprano de técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) sobre núcleos interfásicos de muestras enriquecidas en CP ¹⁸², se demostró la existencia de dos perfiles citogenéticos recurrentes y claramente distintos en las gammapatías monoclonales ¹⁰⁸. Así, mientras que casi la mitad (45%) ⁷³ de los pacientes presentan múltiples ganancias cromosómicas (hiperdiploidía) asociadas a un mejor pronóstico de la enfermedad ^{75, 80}, en la mayoría (55%-70%) ⁷³ de los casos predomina la presencia de

alteraciones cromosómicas estructurales, en las que ocurren reordenamientos que afectan al gen de la cadena pesada de las Ig (*IGH*), como la t(11;14)(q13;q32), la t(4;14)(p16;q32), la t(14;16)(q32;q23) y la t(14;20)(q32;q11) y/o deleción del brazo largo del cromosoma 13 -del(13q)- (50% de los casos)¹⁴⁰, encontrándose en una minoría de pacientes (15%) otras deleciones que afectan de forma preferente al cromosoma 17 -del(17p)-¹⁸³. Algunas de estas alteraciones estructurales -t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23) o deleción(17p)- están incluidas dentro de los criterios de riesgo de la clasificación R-ISS¹³⁶, y junto con la alteración del cromosoma 1 (ya sea por amplificación de la región 1q o por pérdida de 1p), se asocian con formas más agresivas de la enfermedad y una supervivencia significativamente acortada^{74, 75, 80}. La gran excepción sería la t(11;14)(q13;q32), considerada como una alteración asociada a riesgo estándar⁸⁰.

Desde el punto de vista genómico, se han detectado también importantes asociaciones entre la activación constitutiva de la vía NF- κ B (presente en cerca de la mitad de los pacientes con MM) y las mutaciones de los genes *K-RAS*, *N-RAS*⁷⁵ y *BRAF*, que afectan la vía de señalización de ERK⁸³, originando perfiles de expresión génica específicos^{80, 181, 184} que, junto a la presencia de alteraciones epigenéticas (entre las que se incluyen cambios en el patrón de metilación del ADN y perfiles de reordenamiento de la estructura de la cromatina), y la desregulación de la expresión de micro-RNA⁷⁵, se asocian con un pronóstico más desfavorable de la enfermedad⁸⁰.

Los perfiles de alteración genética asociados al pronóstico del MM, se observan también en pacientes con GMSI y MMQ^{82, 140}. Así, las GMSI y los MMQ que presentan hiperdiploidía (\approx 40% en GMSI y \approx 60% en MMQ)¹⁴⁰ suelen mostrar un curso clínico más indolente. Por el contrario, entre los casos que no presentan hiperdiploidía, pero muestran traslocaciones cromosómicas primarias⁷⁴ en las que se incluyen reordenamientos que involucran al gen *IGH*¹⁴⁰ (15%-25% de los casos)⁷³, como la t(4;14), t(6;14), t(14;16) y t(14;20)¹⁸⁵, junto con la presencia de alteraciones cromosómicas secundarias⁷⁴ como del(13), del(17p)¹⁴⁰, ganancias o pérdidas en 1q o 1p¹⁸⁵ (en el caso del MMQ)¹⁸⁶, muestran mayor riesgo de transformación maligna a MM. De forma similar, la presencia de mutaciones activadoras de los genes *K-RAS*, *N-RAS* y *MYC*, aunque se detectan con una frecuencia significativamente inferior entre pacientes con GMSI respecto al MM⁷³, se asocian también con un riesgo más elevado de progresar a sus formas activas¹⁴⁰.

2.2.2.c- Células plasmáticas tumorales circulantes en neoplasias de células plasmáticas

Desde hace varias décadas se ha descrito la presencia de células plasmáticas tumorales circulantes (CPTC) en sangre periférica de pacientes con neoplasias de CP al diagnóstico, asociándose este hallazgo con un pronóstico adverso entre los afectados con GMSI¹⁴¹, MMQ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ y MM activo¹⁶⁷⁻¹⁷². Cabe señalar que esta asociación es, además, independiente de la edad y del riesgo citogenético de cada paciente¹⁹⁰⁻¹⁹², así como de la metodología empleada para la identificación de las CPTC, que van desde herramientas clásicas poco sensibles como las técnicas de citología y microscopia (inmuno) fluorescente convencional^{141, 187, 188, 193}, hasta métodos de mayor sensibilidad basados en técnicas cuantitativas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sondas alelo-específicas (ASO-qPCR)^{194, 195}, la citometría de flujo convencional^{168, 189, 196} o las técnicas de secuenciación masiva (NGS, siglas del inglés *"next generation sequencing"*)¹⁹⁷.

En el siguiente apartado de la introducción de esta tesis doctoral, revisaremos en más detalle las ventajas y limitaciones de las diferentes técnicas disponibles actualmente para la identificación de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP, así como el significado clínico-biológico y el valor pronóstico asociado con la presencia de éstas en la circulación sanguínea.

2.3 Células plasmáticas tumorales circulantes en pacientes con neoplasias de células plasmáticas

2.3.1 Técnicas disponibles para el rastreo de CPTC en sangre periférica

A lo largo de las últimas décadas se han empleado diferentes métodos (con una sensibilidad variable) para la detección de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP (Figura 5).

La citología convencional fue la primera técnica usada (en combinación con el recuento de leucocitos mediante contador hematológico) para la identificación y cuantificación de CP en portas de sangre periférica de pacientes diagnosticados (o con elevada sospecha) de alguna gammapatía monoclonal, constituyendo aún a día de hoy, el método más utilizado para el diagnóstico diferencial entre MM y LCP^{126, 129}. Mediante esta aproximación, se detecta la presencia de proporciones variables de CP en un pequeño grupo de pacientes con MM (17%)¹⁷¹, aunque existen importantes limitaciones a la hora de poder discriminar de forma precisa entre plasmablastos normales/reactivos y CPTC^{198, 199}. Debido a estas desventajas, algunos autores

empezaron a utilizar técnicas inmunohistoquímicas con el fin de comprobar la existencia de expresión restringida de las cadenas ligeras κ o λ en las CP identificadas por su aspecto morfológico, incrementando así la especificidad de la citología convencional ^{141, 200}. Precisamente la necesidad de una mayor precisión (sensibilidad y especificidad) a la hora de identificar y contar el número de CPTC presentes en sangre de pacientes con neoplasias de CP, ha hecho que se ensayaran nuevas aproximaciones metodológicas con este fin, como la citometría de flujo convencional ^{168, 172, 201}, y las técnicas moleculares de ASO-qPCR ^{195, 200} y de secuenciación masiva ¹⁹⁷. A continuación, describiremos de forma resumida, aunque más detallada, las ventajas y limitaciones de cada uno de estos métodos dirigidos a la identificación y cuantificación de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP.

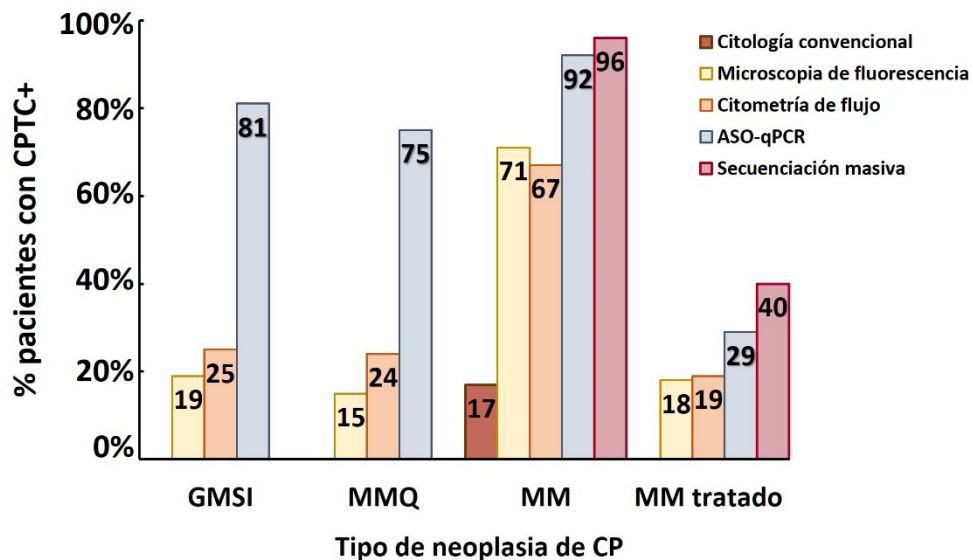


Figura 5. Frecuencia de pacientes con distintas neoplasias de CP estudiadas al diagnóstico y tras tratamiento que presentan CPTC en sangre distribuida de acuerdo con los métodos disponibles y empleados para su detección ^{141, 171, 188, 189, 195, 197, 200-204}.

2.3.1.a- Detección de CP en láminas de sangre periférica mediante citología convencional

Las tinciones clásicas de Wright-Giemsa y May-GrunWald-Giemsa son técnicas sencillas, económicas y accesibles en la práctica totalidad de los laboratorios de diagnóstico clínico-hematológico para la identificación y recuento de CP, mostrando una sensibilidad (nivel de detección) $\geq 1\%$ (es decir, 10^{-2}) sobre el total de leucocitos presentes en sangre ^{129, 171}.

En general, la identificación de CP en sangre por citología convencional se ha asociado repetidamente con enfermedad más agresiva y una tasa más elevada de proliferación de las CP

¹²⁹. Este comportamiento clínico y biológico se observa en la LCP ^{126, 129} y en una pequeña proporción de pacientes con MM que muestran una masa tumoral elevada ($\geq 5\%$ de CP) en sangre, asociada a una supervivencia global significativamente acortada respecto a la de los pacientes con MM que muestran niveles más bajos ($< 5\%$ de CP) o indetectables de CP en la circulación sanguínea, con medianas de supervivencia de 1,1 vs. 4,1 años, respectivamente ^{126, 171}. Hoy se conoce que $\approx 14\%$ de los MM presentan $\geq 2\%$ CP en sangre cuando se emplean técnicas de citología, basada en tinción con Wright–Giemsa, representando la presencia de CP por encima de este punto de corte un factor de pronóstico adverso asociado con periodos significativamente más cortos hasta la progresión, en contraposición con lo que ocurre en pacientes que no presentan CP mediante citología: mediana de supervivencia libre de progresión de 17 vs. 24 meses, respectivamente), asociada a una reducción de la supervivencia global en ≈ 20 meses ¹⁷⁰. Estos resultados demuestran que la citología convencional es una técnica sencilla, rápida, y aplicable de forma universal para la detección de (altos recuentos de) CP en sangre de pacientes con LCP y de aquellos MM que muestran un comportamiento que se acerca al de la LCP (p.ej. pacientes que muestran leucocitosis y elevados niveles séricos de LDH) ¹²⁹. Sin embargo, su utilidad es mucho más limitada en el caso de la GMSI y el MMQ, debido a la baja proporción de CP tumorales circulantes que habitualmente presentan estos pacientes en sangre. En este sentido, la ausencia de CP por citología, debe ser interpretada con cautela debido a la sensibilidad limitada que presenta esta técnica.

2.3.1.b- Detección de CPTC mediante microscopía de fluorescencia

Durante décadas, el uso de técnicas de inmunofluorescencia para el análisis mediante microscopía de fluorescencia de la presencia y número de CPTC en sangre de pacientes con gammopatías monoclonales, se ha basado en el reconocimiento de los patrones de distribución de la expresión de cadenas ligeras κ y λ (clonal vs. normal) sobre células mononucleares aisladas de la sangre mediante gradiente de densidad o sistemas de purificación inmunomagnética ^{187, 188, 200}. Con ello, se ha mejorado la sensibilidad de la citología convencional en más de una década logarítmica, alcanzando a detectar 1 CPTC entre 10.000 células mononucleares totales (sensibilidad de $< 10^{-4}$) ¹⁶⁷.

Desde el punto de vista clínico, la presencia de CPTC por microscopía de fluorescencia se relaciona con enfermedad diseminada ¹⁹³, al detectarse en 19% ¹⁴¹ a 29% ²⁰⁰ de los pacientes con GMSI, entre 25% ¹⁸⁷ y 50% ¹⁸⁸ de los MMQ y en el $\approx 70\%$ de los MM al diagnóstico ²⁰⁰. Además, un recuento más elevado de CPTC ($\geq 4\%$) entre pacientes con MM, se ha asociado con tasas de supervivencia significativamente más cortas (2,4 vs. 4,5 años para aquellos pacientes con niveles inferiores o indetectables de CPTC) ¹⁶⁷. De forma similar, los pacientes con MMQ que presentan CPTC detectables en sangre muestran también una reducción del tiempo hasta progresión a MM, respecto a los que no muestran niveles detectables de CPTC (mediana de supervivencia de 9 vs. 30 meses, respectivamente) ¹⁸⁷. Tales diferencias en el comportamiento pronóstico, se hacen aún más evidentes al restringir el análisis a pacientes con MMQ que muestran números elevados de CPTC en sangre ($> 5 \times 10^6$ CPTC/L o $> 5\%$ CPTC del total de células mononucleadas), en los que la mediana de supervivencia hasta la progresión se reduce en 45 meses, respecto a la observada en pacientes con niveles más bajos (o ausencia) de CPTC en sangre ¹⁸⁸. Este valor pronóstico desfavorable relacionado con la presencia de niveles elevados de CPTC mediante microscopía de fluorescencia, se ha confirmado también en pacientes con GMSI, en los que la presencia de células tumorales en la circulación sanguínea, se ha asociado con una supervivencia libre de progresión significativamente acortada (mediana de 138 meses vs. no alcanzada entre pacientes con GMSI que no presentan CPTC en sangre) ¹⁴¹.

Recientemente, la empresa *Menarini-Silicon Biosystems* (Castel Maggiore, Italia) ha desarrollado una nueva plataforma tecnológica denominada CELLSEARCH[®], para el rastreo y cuantificación de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP ²⁰⁵. Este sistema de detección de CPTC, está basado en la identificación de células mediante la aplicación técnica de inmunofluorescencia sobre muestras de sangre previamente enriquecidas de forma específica en CP ²⁰⁶. Estudios preliminares demuestran que CELLSEARCH[®] permite detectar la presencia de CPTC al diagnóstico en $> 85\%$ de los pacientes con GMSI, MMQ y MM, incrementando así de forma importante la sensibilidad alcanzada con las técnicas de inmunofluorescencia convencionales. Los primeros trabajos referidos en la literatura con esta técnica, sugieren que podría tratarse de una aproximación metodológica que proporciona información de utilidad pronóstica adicional para aquellos pacientes con MM que han alcanzado una respuesta completa (RC) con el tratamiento, dado que la presencia de números absolutos elevados de CPTC en sangre (≥ 100 CPTC/4mL o ≥ 25 CPTC /mL) se asocia a un mayor riesgo de progresión respecto al

observado en aquellos pacientes que muestran niveles más bajos o indetectables de estas células en la circulación sanguínea²⁰⁵.

Aun teniendo en consideración todo lo anteriormente expuesto, las técnicas de microscopía de fluorescencia siguen presentando importantes desventajas que reducen su uso extendido en la práctica clínica^{168, 207}. Entre otras limitaciones, cabe señalar i) la necesidad de equipamiento, como el microscopio de fluorescencia o CELLSEARCH®, que habitualmente no se encuentra disponible en los laboratorios de diagnóstico onco-hematológico, ii) su nivel de sensibilidad relativamente limitado, iii) el empleo de protocolos de preparación de muestras laboriosos y que consumen mucho tiempo, junto con iv) el uso de muestras previamente enriquecidas mediante procedimientos de separación celular (p.ej. gradiente de densidad), que pueden generar pérdidas selectivas de algunas poblaciones celulares, afectando de forma específica la recuperación de CPTC y la precisión de su recuento, a la vez que descartan información sobre gran parte de las demás células hematopoyéticas normales/residuales presentes en la muestra^{208, 209}.

2.3.1.c- Detección de CPTC mediante citometría de flujo

La citometría de flujo constituye una herramienta sencilla, rápida (<4 horas), asequible y disponible en (prácticamente) todos los laboratorios de diagnóstico onco-hematológico. Por este motivo, las técnicas de inmunofenotipado mediante citometría de flujo, han sido ampliamente empleadas para la identificación, caracterización y cuantificación de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP^{168, 201, 207}. Sin embargo, la ausencia de procedimientos estandarizados, de combinaciones de anticuerpos universalmente aceptadas, junto con la adquisición de información sobre un número variable de células por muestra, han influido de forma negativa en la sensibilidad alcanzada por las técnicas de citometría de flujo convencional, a la hora de detectar CPTC en sangre de pacientes con gammapatías monoclonales. Si a estas limitaciones técnicas, añadimos la necesidad de procesar muestras frescas (máximo 24-48 horas después de la extracción) y el carácter eminentemente subjetivo del análisis de los datos de citometría, es fácil entender que, además de una sensibilidad variable, las técnicas de citometría de flujo convencional tienen también una reproducibilidad limitada, lo cual ha ido en deterioro de la aplicación masiva de esta técnica a nivel diagnóstico para la detección de CPTC. Pese a todo ello, la detección de CPTC en sangre mediante citometría de flujo convencional ha demostrado tener

importantes implicaciones clínicas y pronósticas en pacientes con MM estudiados, tanto al diagnóstico como tras tratamiento, siendo menos numerosos los estudios entre pacientes con GMSI y MMQ ^{168, 191, 201}.

Las primeras investigaciones en las que se empleó citometría de flujo para la detección de CPTC, estuvieron basadas en paneles reducidos de 3 anticuerpos (CD45, CD38 y $\text{cylg}\kappa$ o $\text{cylg}\lambda$) y demostraron la presencia de CPTC en 25% de los pacientes con GMSI, con una mediana (rango) de 0,3% (0,06%-0,97%) CPTC entre las células mononucleares presentes en la circulación sanguínea ²⁰⁰. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser confirmados posteriormente por otros autores que, al emplear técnicas más sensibles basadas en citometría de flujo de 7-fluorescencias y análisis de $\geq 10^6$ células totales, demostraron ausencia (<0,0035%) de CPTC en la gran mayoría (93%) de pacientes con GMSI ¹⁹¹.

De forma similar, en los pocos trabajos en los que se ha investigado la presencia de CPTC por citometría de flujo en sangre de pacientes con MMQ, se observan marcadas diferencias en la frecuencia de casos positivos, lo cual probablemente depende de la estrategia inmunofenotípica concreta empleada por cada grupo de investigación. Así, la aplicación de una combinación sencilla de marcadores en 3-fluorescencias en un grupo muy reducido de pacientes con MMQ, mostró la presencia de CPTC en 3/8 (37,5%) pacientes estudiados ²⁰⁰. A su vez, el estudio de una serie más extensa de 100 pacientes con MMQ al diagnóstico, basado en el análisis de un panel más amplio de 6 marcadores (CD45, CD19, CD38, CD138, $\text{cylg}\kappa$ y $\text{cylg}\lambda$) y ≈ 150.000 leucocitos/muestra, mostró presencia de CPTC en solo 24% de los pacientes ¹⁸⁹. Aun así, en este estudio la detección de CP tumorales en la circulación periférica se asoció con una rápida tasa de progresión desde MMQ a MM, en contraposición con lo observado en pacientes que no mostraban CPTC en sangre (mediana de supervivencia libre de progresión a MM de 10 meses *vs.* no alcanzada, respectivamente) ¹⁸⁹.

A diferencia de lo que ocurre en la GMSI y el MMQ, en la actualidad existe un mayor número de estudios en los que se ha investigado, mediante citometría de flujo, la frecuencia e implicaciones clínicas de la presencia de CPTC en sangre de pacientes con MM, tanto al diagnóstico como tras tratamiento. Así, se sabe que entre 50% y 75% de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico muestran CPTC en sangre ^{168, 169, 172, 200, 201}, oscilando su mediana entre 2,5 y 3 CPTC/ μL ^{172, 201}. Sin embargo, llama la atención que la frecuencia de CPTC mediante citometría

de flujo varía de acuerdo con el número y tipo de marcadores utilizados en el panel de anticuerpos ^{169, 172, 200, 201}, el número de células analizadas ^{169, 172, 201} y el tipo de procedimiento seguido en la preparación de la muestra ^{169, 172, 200, 201}. De esta manera, la tasa de positividad para CPTC en pacientes con MM se incrementa $\approx 1,4$ veces cuando se han empleado técnicas basadas en el estudio de muestras de sangre lisada de hematíes ¹⁷², respecto a los métodos en los que se analizan células mononucleares previamente aisladas mediante gradiente de densidad ^{169, 201}, lo que posiblemente es debido a una pérdida selectiva de CPTC durante el proceso de separación celular ²⁰⁸.

Desde el punto de vista predictivo, el hallazgo de recuentos elevados de CPTC en sangre de pacientes con MM estudiados al diagnóstico mediante citometría de flujo, se ha asociado de forma sistemática con un pronóstico más adverso ^{191, 201}. En este sentido, la presencia de $\geq 0,0035\%$ CPTC en sangre de pacientes con MM de nuevo diagnóstico se ha demostrado que tendría un impacto negativo en las tasas de progresión (65% vs. 34%) y de supervivencia global a los 3 años (52% vs. 90%) de estos pacientes, respecto a los que muestran niveles menores o indetectables de CPTC, independientemente del tipo de tratamiento al que se someta al paciente o de la presencia o no de alteraciones citogenéticas de alto riesgo definidas según el R-ISS ¹⁹¹. Así mismo, los pacientes con MM que muestran cifras de CPTC $\geq 400/150.000$ células mononucleares, muestran una supervivencia global significativamente más corta que la de aquellos pacientes que presentan niveles inferiores de estas células en circulación periférica (mediana de 32 meses vs. no alcanzada) ¹⁶⁹. De acuerdo con estos hallazgos, un estudio reciente demuestra que la presencia de ≥ 5 CPTC/ μL en sangre de pacientes con MM al diagnóstico, se asocia con un tiempo hasta la progresión y una supervivencia global significativamente más cortas que las de los demás pacientes. Debido a estas diferencias pronósticas, los autores sugieren que la presencia de ≥ 5 CPTC/ μL al diagnóstico en pacientes con MM en estadio R-ISS I y R-ISS II, podría conferirles un riesgo pronóstico adverso, similar al observado en los casos en los que la enfermedad al diagnóstico se encuentra ya en estadios más avanzados (R-ISS III) ²⁰¹.

2.3.1.d- Detección de CPTC mediante técnicas moleculares (ASO-qPCR y secuenciación masiva)

Aunque las técnicas moleculares estrictamente no detectan de forma directa células tumorales, la cuantificación de alteraciones genéticas específicas del tumor, como el reordenamiento concreto del gen *IGH-V(D)J* que presentan las CPTC y su contrapartida medular, se han empleado con mucha frecuencia para evaluar la masa tumoral presente en la sangre de cada paciente^{194, 197, 210}. Este enfoque difiere del asociado a las técnicas que miden el componente-M (como la inmunofijación o espectrometría de masas)^{137, 211} debido a que los niveles séricos de la proteína monoclonal dependen, además de otros factores, i) del número de CPTC presentes en la muestra, ii) la masa tumoral existente en otros tejidos (como la MO), iii) la gran variabilidad en la concentración de proteína-M que cada CP tumoral de cada paciente puede llegar a producir, iv) la vida media de la Ig producida por la célula tumoral y, por lo tanto, v) el tiempo durante el que la Ig clonal permanece detectable en la circulación²¹².

Hasta el momento, la mayoría de las técnicas moleculares empleadas para la detección de CPTC en sangre, se han centrado en el estudio de pacientes con MM, ya sea al diagnóstico o tras tratamiento²¹³. De todas las herramientas moleculares, las técnicas de ASO-qPCR^{194, 195, 210} y, en menor medida, la secuenciación masiva, han sido con mucho, las más empleadas^{197, 204}. Las técnicas de ASO-qPCR permiten detectar y cuantificar CPTC en sangre de forma muy sensible ($<10^{-5}$) y específica, basándose en la identificación del reordenamiento específico del gen *IGH* (sobre la región determinante de complementariedad 3 -CDR3-) de las CP tumorales de cada paciente^{194, 210}. Así, mediante ASO-qPCR se ha demostrado la presencia de CPTC en sangre en 67%²¹⁰ a 93%^{194, 195} de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico, con recuentos de CPTC que oscilan entre 0,001% y 1% del total de leucocitos¹⁹⁴. Desde el punto de vista pronóstico, la detección de CPTC mediante ASO-qPCR se ha asociado en estos pacientes, a un pronóstico adverso, reflejado en un acortamiento significativo de la supervivencia libre de progresión respecto a los casos que muestran ausencia de estas células tumorales en la circulación sanguínea (mediana de supervivencia libre de progresión de 26 vs. 66 meses, respectivamente)²¹⁰.

Aunque en conjunto, las diferentes técnicas moleculares disponibles en la actualidad tienen como ventaja que no requieren de muestras de sangre fresca, al basarse en el estudio de ácidos nucleicos (es decir, ADN y/o ARN) congelados procedentes de los leucocitos de sangre, hoy se

les reconoce una menor aplicabilidad (entre 42% y 95%)²¹³⁻²¹⁵ respecto a la descrita para las técnicas de citometría de flujo ($\approx 100\%$). Además, las técnicas moleculares requieren de la disponibilidad de una muestra basal que contenga un elevado porcentaje de CP tumorales (correspondiente con el momento del diagnóstico o de la recaída) para identificar de forma específica los reordenamientos del gen de *IGH* propios de cada paciente^{215, 216}, ya sea sobre la muestra total o, más habitualmente, tras realizar procedimientos de enriquecimiento previo de la muestra mediante purificación de células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad, o purificación de CP CD138⁺ mediante métodos inmunomagnéticos o de citometría de flujo²¹³.

Las técnicas de secuenciación masiva (NGS) constituyen una herramienta molecular más sensible ($<10^{-6}$) y aplicable (88%-95%) que la ASO-qPCR^{213, 215, 216}. Así, mediante la identificación de reordenamientos clonales de V(D)J del gen *IGH* a partir del análisis de muestras de ADN mediante NGS, se ha demostrado la presencia de las secuencias *IGH* de las CPTC en 71%²⁰⁴ y 78%¹⁹⁷ de pacientes con MM de forma previa al tratamiento, mientras que esta proporción disminuye al 40% una vez que se inicia la terapia²⁰⁴. Algunos autores han sugerido incluso que, esta frecuencia podría llegar a alcanzar el 96% de pacientes con MM de nuevo diagnóstico, cuando se emplea para su detección ARN (en vez de ADN)¹⁹⁷. En cualquier caso, hasta la fecha el uso de NGS para el análisis de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP, ha estado especialmente dirigido a la caracterización molecular de las alteraciones genéticas/genómicas presentes en las células tumorales purificadas y su posible implicación en el comportamiento fisiopatológico de la enfermedad^{205, 217-220}. En este sentido, un estudio reciente basado en la secuenciación del ARN a nivel de célula única, ha demostrado que la sobreexpresión de los genes *CENPF* y *LGALS1* en muestras de sangre de pacientes con MM, se asocia con un acortamiento de la supervivencia libre de enfermedad en estos pacientes²¹⁸.

Pese a las ventajas antes descritas, hasta la fecha, la aplicación de las técnicas de ASO-qPCR²⁰⁰ y de secuenciación masiva²¹⁷ para la detección de CPTC en pacientes con GMSI, MMQ u otras neoplasias de CP ha sido prácticamente nula y, por lo tanto, su posible impacto clínico y pronóstico continúa siendo en gran medida desconocido.

2.3.2. Características biológicas de las CPTC y su relevancia en la fisiopatología de las neoplasias de células plasmáticas

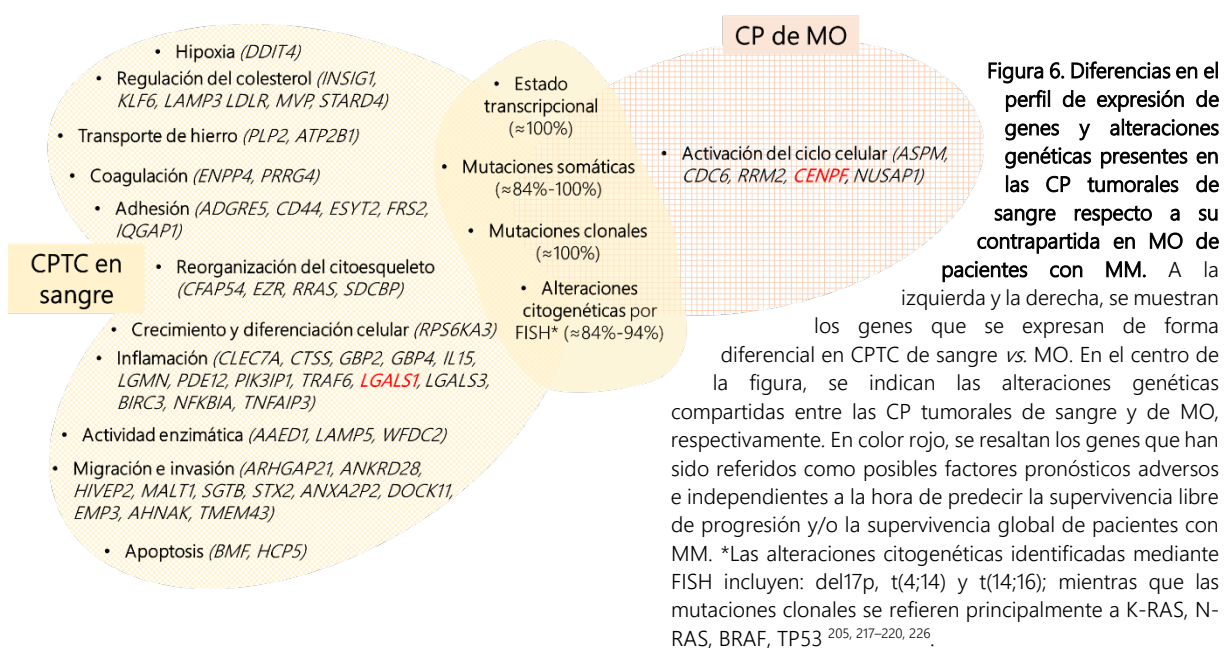
Hasta la fecha, el significado biológico y el impacto fisiopatológico de la presencia de CPTC en pacientes con GMSI, MM u otras neoplasias de CP, sigue siendo en gran medida desconocido^{89, 141, 190, 221}. No obstante, desde hace décadas se considera que las CPTC reflejan una biología particular del tumor¹⁶⁸, ejerciendo como un marcador (directo pero independiente) de la masa tumoral en general^{169, 172, 197, 222}. Así, desde hace tiempo se ha descrito la existencia de una asociación entre la presencia (y recuentos elevados) de CPTC en sangre y niveles más elevados de infiltración tumoral en MO en pacientes con GMSI, MM, LCP y otras neoplasias de CP, lo cual sugiere que las CPTC podrían representar una subpoblación de CP funcionalmente singular, pero derivada de las CP tumorales de MO^{141, 168, 187}. Sin embargo, la asociación descrita por algunos autores entre los niveles de CP tumorales en sangre y MO no ha sido confirmada por otros investigadores^{168, 194, 210} o, al menos, no se ha podido demostrar la existencia de una correlación directa lineal entre los niveles de CP tumorales presentes en ambos compartimentos tisulares²²². Además, en la actualidad se sabe que las CPTC, aunque constituyen una subpoblación clonal (un subclon) de las CP del tumor presentes en MO, muestran características de mayor inmadurez fenotípica y un perfil de célula (más) quiescente^{223, 224}.

De acuerdo con estos hallazgos, hoy se cree que las CPTC podrían representar un subgrupo de células tumorales que han emigrado a sangre como consecuencia de su forma particular de interaccionar con el microambiente medular, la evasión de la respuesta inmune²²¹ y los niveles de hipoxia particularmente elevados en la MO de pacientes con neoplasias de CP²²⁵. En este sentido, la salida a la circulación sanguínea de las CP tumorales de MO, podría estar favorecida por factores como i) concentraciones elevadas del factor de crecimiento endotelial (VEGF, siglas del inglés *vascular endothelial growth factor*) a raíz del ambiente hipóxico medular, y que promueve la angiogénesis local y el crecimiento tumoral⁸⁹, ii) la pérdida de expresión de moléculas de adhesión^{168, 225} como CD56, CD138, CD81 y CD117, integrinas como CD11a, CD11c, CD29, CD49d y CD49e, y marcadores de activación como CD38 y CD28, asociada a niveles inferiores de expresión de estas proteínas en las CP tumorales de sangre *vs.* su contrapartida de MO^{5, 223}, y iii) el incremento de los niveles del receptor de quimiocina CXCR4²²⁵, asociado con iv)

cambios cíclicos ajustados al ritmo circadiano, en sus niveles séricos y en los de su ligando SDF1 (siglas del inglés, *stromal cell-derived factor 1*)²²³.

Varios estudios demuestran que las CPTC tienen un perfil inmunofenotípico más inmaduro respecto a su contrapartida medular²²³, asociado a i) expresión de niveles inferiores de moléculas relacionadas con la síntesis proteica, como Vs38c (marcador asociado al retículo endoplásmico),⁵ y de Ig citoplasmáticas, junto con una ii) reducción en su tasa proliferativa, medida tanto mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) como a través de la cuantificación de ADN con DRAQ5.5 (siglas del inglés, *deep red anthraquinone 5.5*)^{223, 224}, y iii) una mayor capacidad de migración y iv) autorrenovación *in vitro*²²³.

Desde el punto de vista genómico, las CPTC (purificadas) de la mayoría de los pacientes con MM reproducen el patrón de mutaciones somáticas observado en las células tumorales de MO, pero con niveles relativamente elevados de heterogeneidad (sub)clonal^{217, 226}. Así, las CPTC sobreexpresan genes (y muestran mutaciones o alteraciones genéticas en genes) asociados con mayor resistencia a fármacos²²⁶, hipoxia (como el *DDIT4*), migración celular (*CFAP54* o *EZR*), invasión tisular (*EMP3* o *AHNAK*), adhesión celular (*CD44*, *LGALS1* o *IQGAP1*), inflamación (*BIRC3* o *TNFAIP3*) y metástasis (*AGR2*, *DDX5*, *MALAT1*, *TMED2* o *TPT1*), junto con alteraciones en genes responsables de activar el ciclo celular (*CENPF* o *CDC6*)²¹⁸ (Figura 6). Además, la presencia de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP se ha asociado con perfiles citogenéticos específicos, entre los que se incluyen la t(4;14)^{169, 170, 203}, del13q¹⁷⁰, del17p y t(14;16)²⁰¹.



2.4 Tratamiento

Actualmente, ante el diagnóstico de GMSI se opta de forma sistemática por la monitorización/observación periódica del paciente ⁹⁰, en ausencia de tratamiento ⁹⁵, aunque algunos estudios recomiendan el uso de bifosfonatos en aquellos casos con GMSI que presentan osteoporosis, con el fin de disminuir el riesgo de fracturas ¹⁷³, aunque no es algo que se utilice de forma sistemática en la práctica clínica. Inicialmente, la primera visita de seguimiento de pacientes con GMSI suele realizarse a los tres meses del diagnóstico. A partir de ahí, si la enfermedad permanece estable (tanto el CM en suero ⁹⁰ y/u orina ⁹⁵ como el cociente de CLL sérico ²²⁷), la monitorización periódica se establece de forma anual o bianual. Sin embargo, estos pacientes pueden desarrollar de forma silente alteraciones funcionales debidas a, por ejemplo, daño renal reflejado en microalbuminuria, incremento de la creatinina sérica y compromiso de la tasa de filtración glomerular ²²⁸. En este sentido, ante cualquier cambio en los niveles de estos parámetros ⁹⁵ o el hallazgo (inexplicable) de anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia, o dolor (por lesión) óseo ⁹⁰ durante el seguimiento, estaría indicada la realización de un aspirado de MO y/o técnicas de imagen para la evaluación de la posible presencia de lesiones en el hueso, así como, cuando estén disponibles, estudio (cito)genético y de detección de CPTC ⁹⁰.

En términos generales, las pautas establecidas para el seguimiento de la GMSI se aplican también a pacientes con MMQ (dada su condición asintomática), favoreciéndose un seguimiento estrecho de los mismos, en ausencia de intervención terapéutica ^{79, 229, 230}. No obstante, en los últimos años se recomienda que en aquellos casos que muestran un riesgo inminente de progresión a MM, se realice un control clínico y biológico más estrecho (con una periodicidad de cada 2 o 3 meses) ^{143, 175}, o que incluso sean (preferentemente) tratados dentro de ensayos clínicos, al haberse demostrado un efecto clínico beneficioso con el tratamiento precoz, capaz de alargar el tiempo hasta la progresión, incrementar la supervivencia global ^{105, 231} y mejorar la calidad de vida de estos pacientes ²³².

Durante el periodo de monitorización de la enfermedad, el diagnóstico de progresión desde MMQ a MM suele realizarse con relativa frecuencia al constatar el desarrollo de anemia (41% ¹⁴³- 52% ¹⁴⁴) o lesiones osteolíticas (33% ¹⁴³- 40% ¹⁴⁴), mientras que tan sólo $\leq 4\%$ de los casos presentan signos y síntomas de insuficiencia renal, enfermedad extramedular o hipercalcemia ^{143, 144}. En este contexto, en el año 2013 el Grupo Español de Mieloma (GEM) fue pionero en sugerir

¹⁴⁹ y, tras un seguimiento prolongado, demostrar ¹⁴⁸, que la intervención terapéutica temprana en pacientes con MMQ de alto riesgo supone un beneficio para estos pacientes. Esto se basó en la demostración de que la administración de un tratamiento de inducción en el que se combinaba lenalidomida y dexametasona (Rd), seguido de un tratamiento de mantenimiento con dosis bajas de lenalidomida, retrasa la progresión de MMQ a MM activo e incrementa de forma muy significativa la supervivencia global de los pacientes tratados frente a la de los pacientes con MMQ no tratados ^{148, 149}. Estos resultados alentadores, han servido como punto de partida para la evaluación de otras estrategias de tratamiento precoz en el MMQ, basadas en la triada carfilzomib-lenalidomida-dexametasona (KRd) seguida de mantenimiento con lenalidomida ^{233, 234}. En este sentido, un estudio piloto basado en la administración de la triada KRd en pacientes con MMQ de alto riesgo, mostró un beneficio clínico asociado con tasas elevadas de muy buena respuesta parcial y RC, según los criterios del Grupo Internacional de Trabajo en Mieloma (IMWG) ¹³⁷, vinculado al incremento en la tasa de negatividad para enfermedad mínima residual (EMR) en MO ²³³ y un alargamiento tanto de la supervivencia libre de progresión como de la supervivencia global de estos pacientes ²³⁴. Sin embargo, estos resultados se basaron en el estudio de una serie muy limitada de casos, seleccionados de forma no aleatoria, y que carecían de un grupo de referencia no tratado ^{233, 234}. En este sentido, un ensayo clínico más reciente demuestra la eficacia de la administración de lenalidomida en pacientes con MMQ con riesgo medio-alto de progresión, asociándose la respuesta al tratamiento con tasas de supervivencia libre de progresión significativamente más prolongadas (25% más de casos a los 3 años de monitorización), cuando se compara con el grupo de MMQ que no recibieron el medicamento ¹⁵⁰. En paralelo, se está evaluando también el posible beneficio clínico de la administración de anticuerpos monoclonales anti-CD38 como parte del tratamiento precoz en el MMQ, tanto en monoterapia como en combinación con lenalidomida y dexametasona ²³². Pese a todos estos resultados prometedores, el tratamiento precoz de pacientes con MMQ representa todavía un área en el que sigue abierto un importante debate clínico, mientras se continúan evaluando los posibles efectos beneficiosos y tóxicos a largo plazo de los nuevos fármacos y sus combinaciones, y se trabaja intensamente en una mejor definición de los subgrupos de riesgo que más se beneficiarían de un tratamiento sistemático ^{232, 235, 236}.

En el plasmocitoma solitario, la radioterapia local constituye la herramienta terapéutica más eficaz, proporcionando elevadas tasas de respuesta y supervivencia ^{132, 135, 237}. Tras el inicio del

tratamiento, se recomienda un seguimiento del paciente cada 6 meses para demostrar la radiosensibilidad (*vs.* resistencia) del tumor, reflejado en una reducción (o no) de la proteína-M en suero (cuando estuviese presente al diagnóstico)^{121, 132}, y sobre todo, en una disminución del tamaño del tumor evaluada mediante técnicas de imagen como la resonancia magnética^{133, 134}. Aunque la combinación de la radioterapia con otros tratamientos adyuvantes podría contribuir a disminuir o, al menos retrasar en parte la evolución a MM¹⁵¹, la mayoría de los estudios coinciden en que no se ha demostrado hasta la fecha un beneficio adicional de esta estrategia que justifique su implementación en el esquema terapéutico habitual de estos enfermos¹³⁵. Generalmente al progresar, los pacientes con plasmocitoma suelen mostrar un incremento de la proteína-M, y/o la aparición de nuevas lesiones óseas, que pueden presentar incluso un fenotipo macrofocal por técnicas de imagen¹²¹.

El MM constituye junto con la LCP¹²⁹, uno de los subtipos diagnósticos de neoplasias de CP que de forma sistemática requieren de tratamiento sistémico con el fin de aumentar la esperanza y calidad de vida de los pacientes^{74, 79}. Aunque hoy día el MM sigue considerándose una neoplasia incurable^{88, 238}, que representa el 2,1% de todas las muertes por cáncer al año¹⁰⁷, en las últimas dos décadas ha mejorado notablemente la calidad de vida y la supervivencia de estos pacientes con el desarrollo y aplicación de una amplia batería de nuevos fármacos más efectivos frente a la enfermedad²³⁹⁻²⁴⁵. En este avance terapéutico han sido claves, una mejor comprensión de la biología de la célula tumoral y del papel del microambiente tumoral como base para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el diseño de fármacos (y combinaciones de fármacos) dirigidos de forma específica frente a las mismas^{84, 246}. Entre otros medicamentos, merece destacar los inhibidores del proteasoma (p.ej. bortezomib, carfilzomib e ixazomib)^{245, 247}, fármacos inmunomoduladores (p.ej. talidomida²⁴⁸, lenalidomida^{249, 250} y pomalidomida²⁵¹), anticuerpos monoclonales (p.ej. anti-CD38 como Daratumumab^{241, 242, 252, 253} o anti-SLAMF7/CD319 como Elotuzumab^{254, 255}) y los inhibidores de las histonas deacetilasas (p.ej. Panobinostat²⁵⁶), capaces de superar la resistencia a la quimioterapia convencional y prolongar la supervivencia de los pacientes con MM^{241, 244, 246, 257}.

La disponibilidad de esta amplia batería de nuevos fármacos, además de la quimioterapia convencional, ha supuesto importantes cambios en el manejo terapéutico del MM. Así, en términos generales, los esquemas terapéuticos actuales a aplicar en el MM se definen dependiendo de la edad del paciente²⁵⁸ y sus comorbilidades⁷⁴, basándose en varios ciclos de

tratamiento dirigidos a alcanzar RC. En pacientes candidatos a trasplante (habitualmente aquellos menores de 65 o 70 años ^{258, 259}), los ciclos de inducción incluyen combinaciones de dos, tres o hasta cuatro tipos de fármacos con principios activos distintos ^{257, 259}, seguidos del trasplante de progenitores hematopoyéticos, tratamiento de consolidación y de mantenimiento, hasta la recaída ^{183, 238}. A su vez, en pacientes mayores de 70 años que no son candidatos a recibir un trasplante ^{258, 259}, se emplean combinaciones que incluyen desde agentes alquilantes y corticoides tradicionales, a agentes inmunomoduladores, inhibidores del proteasoma ^{242, 249} y anticuerpos monoclonales (como los anticuerpos anti-CD38) ²⁴², administrándose durante periodos de 12-18 meses, a los que le sigue terapia de mantenimiento cuya duración variaría según la presencia o ausencia de alteraciones (cito)genéticas de alto riesgo -p.ej. t(14;16); t(14;20) y del17p- del tumor ¹⁸³. Con ello, al igual que ha ocurrido en pacientes más jóvenes, en los enfermos con MM >65 años se han logrado mayores tasas de respuesta, incluso en casos con enfermedad extramedular, al introducir estrategias terapéuticas que incorporan nuevos fármacos, como los inhibidores del proteasoma o anticuerpos monoclonales, que ayudan a controlar la enfermedad, incluso en ausencia de trasplante de progenitores hematopoyéticos ^{179, 180}. A las nuevas herramientas terapéuticas ya disponibles, es previsible se sumen otros medicamentos o nuevas combinaciones de fármacos ^{236, 257} que están actualmente en fase de ensayo clínico, como nuevos anticuerpos monoclonales como Isatuximab (anti-CD38) ^{260, 261}, Venetoclax (inhibidor de la proteína antiapoptótica BCL-2) ^{236, 262}, Selinexor -inhibidor del transportador nuclear selectivo exportina-1 (XPO1)- ²⁶³, anticuerpos monoclonales conjugados o biespecíficos y la terapia celular personalizada con células CAR-T (del inglés, *chimeric antigen receptor*) ^{238, 264} frente a proteínas presentes en la superficie de las CP como BCMA, CD19, CD138 y SLAMF7/CD319 ^{236, 265, 266}.

Aunque todos estos avances en el tratamiento del MM tienen como objetivo erradicar la enfermedad, la respuesta alcanzada en los distintos grupos de pacientes sigue siendo muy variable ²⁶⁷, obligando a una monitorización estrecha de la misma que permita evaluar de manera precoz la sensibilidad vs. la resistencia al tratamiento administrado ²⁶⁸.

2.5 Criterios clásicos de respuesta al tratamiento

Tradicionalmente, la respuesta al tratamiento en el MM se ha basado en la ausencia de síntomas atribuibles a la propia enfermedad (según los criterios CRAB) y a la disminución y

desaparición del CM en suero u orina, detectado mediante electroforesis de proteínas e inmunofijación, junto con la reducción de la infiltración medular, reflejo de un descenso significativo de la masa tumoral ^{269, 270}. Además, se ha propuesto emplear la determinación del cociente de CLL en suero, como criterio adicional a la hora de identificar dentro de los pacientes con MM que ya han alcanzado RC, un subgrupo que presentaría mejor respuesta y pronóstico ²⁷¹. En esta línea, se ha mantenido la importancia de evaluar, además del porcentaje de CP en muestras (aspirado/biopsia) de MO a través de tinciones histológicas clásicas ²⁷², la existencia de infiltración extramedular mediante técnicas de imagen, aspecto particularmente relevante si se tiene en cuenta que el MM suele distribuirse de forma heterogénea y que, junto a la presencia/persistencia de dicho tumor a nivel extramedular, conllevarían a generar resultados falsos negativos, si solo se evaluase la MO. De esta manera, las herramientas de imagen contribuyen también de forma definitiva a la evaluación de la respuesta al tratamiento en el MM ^{273, 274}, mediante la redefinición del criterio de RC, que requiere i) la negativización del CM detectado mediante inmunofijación en suero y orina, a la vez que ii) recuentos <5% de CP en aspirados de MO, iii) con o sin normalización del cociente sérico entre las cadenas ligeras de la Ig clonal vs. residual (es decir, RC estricta o RC, respectivamente), y iv) la ausencia de plasmocitomas mediante técnicas de imagen (resonancia magnética o PET-CT) ¹³⁷. Muchos estudios han demostrado la existencia de una asociación estrecha en pacientes con MM, entre la calidad de la respuesta alcanzada al tratamiento, y la tasa de supervivencia libre de progresión y supervivencia global alcanzada, independientemente de haber recibido ^{269, 270, 275, 276} o no ²⁷⁷ trasplante de progenitores hematopoyéticos. No obstante, el beneficio pronóstico descrito para aquellos que alcanzan RC (estricta o no) sigue siendo limitado y muy variable entre distintos pacientes, dependiendo (en parte), del tipo de tratamiento recibido, la edad del paciente y la biología propia de la enfermedad ^{181, 269, 278}. Por este motivo, se considera necesario emplear técnicas más sensibles capaces de detectar enfermedad residual en niveles inferiores a los que alcanzan la inmunofijación o la citología convencional, para poder identificar dentro de los pacientes que hayan alcanzado RC, aquellos que siguen teniendo niveles (más) elevados de enfermedad mínima residual (EMR) y que por tanto tienen mayor probabilidad de recaer antes, incluso durante el primer año de seguimiento ²⁷⁹.

2.6 Monitorización de la enfermedad mínima residual tras tratamiento

Con el uso extendido de una batería creciente de nuevos fármacos y sus combinaciones en el tratamiento del MM, se ha incrementado de forma sustancial la tasa de RC obtenidas y la calidad de las mismas ²³⁶. Dicho avance ha obligado al desarrollo e implementación de nuevas herramientas y estrategias más sensibles a la hora de evaluar la eficacia del tratamiento, que faciliten la monitorización individualizada de la respuesta alcanzada en cada paciente ^{215, 278}. Si bien la calidad de la respuesta es un factor pronóstico independiente ^{270, 271, 275-277, 280}, numerosos estudios han puesto de manifiesto a lo largo de las últimas décadas que la mejoría pronóstica de los pacientes que alcanzan RC, en realidad se debe a aquellos que alcanzan RC con niveles más bajos (indetectables) de tumor resistente a la terapia ²⁸¹⁻²⁸³, es decir, con EMR negativa. Esto es debido a que los pacientes en RC con EMR⁺ muestran tasas de supervivencia superponibles a las de aquellos casos que solo alcanzan respuesta parcial ²⁸⁴. Por todo ello, hoy se reconoce que la detección de EMR en MO de pacientes con MM que alcanzan RC con el tratamiento, probablemente constituya el factor pronóstico individual de mayor valor predictivo en el momento de evaluar la calidad de la respuesta al tratamiento alcanzada y predecir la evolución de la enfermedad ^{213, 284, 285}.

Dada la relevancia clínica y pronóstica de la monitorización de EMR en el MM, en las últimas décadas se han diseñado y validado diferentes estrategias dirigidas a detectar pequeñas cantidades de CP tumorales residuales en MO de pacientes con MM, que van desde la citometría de flujo convencional, a la ASO-qPCR (dirigida a la detección de los reordenamientos *IGH* específicos del tumor) y, más recientemente, la NGS ²¹⁶. A todas ellas habría que sumar las técnicas de imagen, particularmente relevantes en pacientes con MM (u otras neoplasias de CP) que presentan ya al diagnóstico (o *de novo* en la recaída) infiltración y lesión extramedular, ya sea nivel óseo o de tejidos blandos ^{215, 286}.

2.6.1 Técnicas de monitorización de EMR en médula ósea de pacientes con MM tras tratamiento

2.6.1.a- Detección de EMR mediante citometría de flujo convencional

De todas las metodologías disponibles para la monitorización de la EMR en MO de pacientes tratados con MM, la citometría de flujo multiparamétrica constituye la técnica con mayor aplicabilidad (90%-100%)^{213, 215} y con una sensibilidad relativamente elevada (10^{-4})^{284, 287} (Tabla 5). Diferentes estudios han demostrado que, esta técnica permite identificar CP tumorales residuales en MO de una importante proporción de pacientes con MM que han alcanzado RC tras ser sometidos a distintos esquemas terapéuticos, que contemplen^{284, 285, 288-290} o no^{290, 291} la realización de trasplante de progenitores hematopoyéticos. Así, la detección de EMR negativa en MO tras tratamiento por citometría de flujo multiparamétrica, ha demostrado ser una variable pronóstica independiente en el MM, que confiere una mayor tasa de supervivencia a largo plazo, tanto en términos de supervivencia libre de progresión como de supervivencia global, mejorando sustancialmente el valor predictivo de los criterios convencionales de respuesta clínica (p.ej. de la RC)^{284, 285, 290, 291}.

El beneficio pronóstico asociado a la constatación de la ausencia de EMR en MO mediante citometría de flujo, refuerza la utilidad de la evaluación de la calidad de la respuesta en pacientes con MM en RC convencional, al asociarse con tasas de supervivencia libre de progresión de hasta el 95% a 3 años, entre aquellos pacientes que además muestran normalización del cociente de CLL en suero (RC estricta)²⁹¹. Por el contrario, la identificación de alteraciones citogenéticas de alto riesgo al diagnóstico junto con la persistencia de EMR positiva en MO al día +100 posterior al trasplante de precursores hematopoyéticos, constituye un potente factor pronóstico adverso que permite identificar aquellos pacientes con MM que presentan un alto riesgo de recaída temprana, incluso después de haber alcanzado RC²⁹².

A nivel práctico, la citometría de flujo constituye una técnica disponible en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico onco-hematológico de todo el mundo, que permite i) identificar y caracterizar tanto CP normales como tumorales, distinguiendo entre ambos tipos de CP según las diferencias que muestran entre ellas respecto a los patrones de expresión de proteínas concretas, ii) cuantificar niveles mínimos (10^{-4}) de infiltración tumoral^{284, 287}, iii) de forma rápida (<4 horas), y iv) en prácticamente todos los pacientes con MM²⁹³. En este sentido, el

conocimiento de las características e inmunofenotipo de la CP tumoral es fundamental a la hora de poder emplear esta técnica para la monitorización de EMR.

Fenotipo de la CP tumoral en pacientes con neoplasias de células plasmáticas

Aunque el origen de la CP tumoral de pacientes con neoplasias de CP no está bien establecido⁷³, se considera que en estas neoplasias, la célula tumoral ancestral podría ser una CP de vida larga que muestra ya hipermutación somática en los genes *IGH*, habitualmente con cambio de isotipo y dependencia del microambiente medular⁷⁹. Sin embargo, en contraste con las CP normales, estas CP tumorales presentan alteraciones genéticas que le confieren importantes diferencias fenotípicas y funcionales^{43, 294} que hacen, entre otras consecuencias, que adquieran capacidad de autorrenovación junto a una tasa proliferativa relativamente baja^{79, 224, 295}.

Aunque no existe un fenotipo único para la CP tumoral de las gammapatías monoclonales^{43, 208}, mediante citometría de flujo se han descrito patrones fenotípicos aberrantes recurrentes asociados a la pérdida, ganancia o sobreexpresión de distintas proteínas, respecto a lo observado en CP normales^{43, 288, 296}. Así, las CP patológicas de pacientes con neoplasias de CP presentan de forma característica positividad elevada para CD138^{208, 297} y habitualmente carecen de expresión de marcadores pan-B como CD19^{293, 298} (>95% de los casos)^{208, 293}, CD20, CD22 e Ig de superficie^{293, 298}, de forma similar a lo observado en CP normales de vida larga de (por ejemplo) MO⁴. Por el contrario, a diferencia de estas últimas, las CP tumorales generalmente muestran restricción de cadena ligera de las Ig^{43, 293} (97% de los casos)⁷⁵, niveles inferiores de CD38^{298, 299} (80%)²⁹³, CD45^{60, 300} (72%-80%)^{293, 301} y CD27 (40%-50%)²⁰⁸, junto a sobreexpresión de CD56 (60%-75%)^{208, 293}. Además, pueden mostrar reactividad para CD117^{43, 300}, lo que favorece el anclaje de las CP tumorales al nicho medular limitando su diseminación sistémica y confiriendo un mejor pronóstico a los pacientes con CP CD117⁺²⁰⁹, así como positividad para CD28⁴³, asociada a la presencia de la t(4;16), delección de p53³⁰² y a una mayor tasa de progresión tumoral⁵⁶. Al igual que su contrapartida normal³⁰³, las CP tumorales de MO muestran además expresión intensa y uniforme de SLAMF7 (CD319)^{303, 304}, son positivas (con baja intensidad) para el receptor de supervivencia BCMA^{266, 305, 306} y para el marcador intracelular Vs38c^{307, 308}, que reconoce la proteína p63 del retículo endoplásmico rugoso e identifica a aquellas células B con compromiso medular más avanzado y con capacidad de síntesis y secreción de niveles elevados de proteínas

(es decir, Ig) ³⁰⁹. Lo mismo ocurre con la expresión de otros marcadores, como las moléculas de adhesión CD229 y CD54 que se detectan de forma similar en CP normales y tumorales de MO ³⁰³.

Aunque en general no se conoce con precisión el significado de las alteraciones fenotípicas presentes en las CP tumorales de pacientes con neoplasias de CP ²⁰⁸, se sabe que determinados perfiles fenotípicos se asocian con distinto pronóstico de la enfermedad. Así, mediante la aplicación de técnicas de citometría de flujo se reconoce que la expresión de marcadores como CD28 ⁵⁶, CD19 ³⁰² y CD81 ⁵¹ en las CP tumorales del MM se asocia con peor pronóstico, tanto en lo que se refiere a la supervivencia libre de progresión, como a la supervivencia global de los pacientes. En este sentido, recientemente se ha sugerido que la presencia de un perfil fenotípico definido por doble positividad para CD19 y CD81 (CD19⁺/CD81⁺) en pacientes con MM, se asociaría con un estadio de mayor inmadurez tumoral y un pronóstico adverso, independientemente de otras características de la enfermedad ³¹⁰. A su vez, la combinación de este patrón fenotípico con baja expresión de CD38 (CD19⁺CD81⁺CD38^{débil}), constituye un potente factor pronóstico al definir un subgrupo de pacientes con MM que presenta tasas de supervivencia libre de progresión significativamente inferiores a las de aquellos pacientes cuyas CP tumorales muestran otros perfiles fenotípicos de expresión proteica ⁶¹. De forma similar, la ausencia de expresión de CD117 a nivel de la membrana de la CP tumoral de MO, se asocia con un pronóstico desfavorable entre pacientes con neoplasias de CP, al relacionarse con la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo, como la t(4;14) y la del(13q) ³⁰², junto con menores recuentos de CP normales en MO ²⁰⁹. Además, este fenotipo CD117⁻ es particularmente frecuente en pacientes con MM (70%) y MMQ (55%), mientras que es poco habitual en los estadios más tempranos (pre malignos) de la enfermedad, como la GMSI (28%) ²⁰⁹.

Recientemente, se ha reconocido también que la sobreexpresión de CD45 en CP tumorales de MO en pacientes con MM al diagnóstico o tras tratamiento, podría constituir un factor pronóstico adverso al asociarse a tasas de supervivencia global significativamente más cortas (respecto a los casos CD45⁻), probablemente debido a un incremento de la capacidad proliferativa de las CP tumorales CD45⁺ ³⁰¹. Del mismo modo, algunos autores han relacionado también la pérdida de expresión de CD56 con un peor curso clínico en pacientes con MM, debido a la ventaja que podrían adquirir las CP tumorales para diseminar la enfermedad a nivel extramedular ^{294, 311}, tal como ocurre en la LCP, en la que las CP tumorales muestran ausencia de expresión de CD56

en >80% de los casos ⁷³. Otros marcadores cuya expresión se ha sugerido podría tener impacto pronóstico en el MM y otras neoplasias de CP, incluyen: i) CD99, cuya expresión en CP patológicas de tumores extramedulares se asocia con tasas de supervivencia más prolongadas ³¹²; ii) positividad para CD20, asociada a la presencia de la t(11;14) tanto en la LCP como en el MM ^{73, 313}, se relaciona con un pronóstico favorable en esta última enfermedad ⁷³; mientras que iii) sigue sin confirmarse el posible impacto pronóstico de la expresión de CD200 en CP tumorales de MO de pacientes con MM ^{297, 314, 315}.

Además del impacto pronóstico asociado al perfil fenotípico que presentan las CP tumorales, algunos autores han sugerido que la presencia de >5% de CP normales (residuales) del total de CP de MO mediante citometría de flujo, observada en la gran mayoría (>98%) de pacientes con GMSI al diagnóstico ¹⁰⁶, se asociaría también a una menor probabilidad de progresión a MM ²⁰⁸ y a un pronóstico favorable en pacientes tratados con MM ²⁹⁸.

Ante la gran heterogeneidad fenotípica de las CP tumorales de pacientes con neoplasias de CP, especialmente en el MM, se hace necesario para su detección universal combinar un número relativamente grande de marcadores que permita asegurar la identificación de los fenotipos aberrantes presentes en las CP tumorales de todos los pacientes, independientemente del perfil inmunofenotípico concreto que éstas presenten en MO, de la combinación concreta de marcadores empleados con este fin y del conocimiento y experiencia del analista para distinguir entre las CP normales y patológicas que puedan coexistir en MO tras tratamiento ²¹⁵. A la subjetividad inherente a la interpretación analítica realizada por cada experto, hay que sumar la ausencia de protocolos estandarizados ^{316, 317} y de paneles de marcadores de consenso ²⁹⁷, junto a la evaluación de un número (variable pero) limitado de células de MO ³¹⁷, incluso cuando se siguen las recomendaciones de los expertos ³¹⁸, lo que en conjunto limita la sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas convencionales de detección de EMR mediante citometría de flujo (Tabla 5).

2.6.1.b- Detección de EMR mediante técnicas moleculares

Junto con la citometría de flujo, las técnicas de ASO-qPCR, constituyen la herramienta metodológica que más se ha utilizado para la monitorización de EMR en pacientes con MM. Aunque desde el punto de vista predictivo, la detección de EMR mediante ASO-qPCR ha

demostrado un importante impacto pronóstico en la supervivencia libre de progresión de pacientes con MM tratados con fármacos de nueva generación^{283, 319, 320}, en niveles equiparables a la EMR detectada por citometría de flujo ($>10^{-5}$), esta técnica se asocia de forma sistemática con una aplicabilidad bastante más limitada (42%-75%)^{214, 319, 321}. Esto es debido, en gran medida, a que el análisis de EMR mediante técnicas de ASO-qPCR se fundamenta en la identificación de los reordenamientos V(D)J del gen de la cadena pesada de las Ig (*IGHV-J*, *IGHD-J*) y/o, en menor medida, también de las cadenas ligeras de las Ig específicos de la CP tumoral, en muestras de ADN de pacientes con MM tras tratamiento²¹⁴. Habitualmente, estos reordenamientos de los genes *IGH*, *IGK* e *IGL* muestran huella de la hipermutación somática sufrida por la CP tumoral a nivel del centro germinal de los órganos linfoides secundarios, con cambios que, de forma aleatoria, dificultan la unión de los oligonucleótidos (sondas) empleados para su amplificación y detección³²². Además, aunque las técnicas de ASO-qPCR cuentan con suficiente estandarización, son métodos más laboriosos y complejos, cuyo resultado depende de i) un diseño eficaz de las sondas (cebadores) a emplear, ii) la calidad de la muestra y iii) el conocimiento previo del reordenamiento específico del gen (p.ej. del gen *IGH*) de cada paciente (detectable en una muestra obtenida al diagnóstico o recaída con masa tumoral $\geq 5\%$)³²³, aspectos que influyen significativamente en el uso más limitado de esta técnica, respecto a la citometría de flujo convencional^{214, 319, 321} (Tabla 5).

Las técnicas moleculares (más recientes) de secuenciación masiva (NGS), superan en gran parte las limitaciones descritas anteriormente de la ASO-qPCR para la monitorización de EMR en pacientes con MM de forma posterior al inicio del tratamiento³²³, alcanzando niveles de aplicabilidad similares ($>90\%$) a los observados con las técnicas de citometría de flujo convencional, pero con mayor sensibilidad (10^{-5} - 10^{-6})^{213, 321, 324} (Tabla 5). Generalmente, estas técnicas se basan en la disponibilidad de ADN genómico para la identificación de los reordenamientos completos (VDJ) e incompletos (VJ) del gen *IGH* y del locus κ (*IGK*) mediante un panel de sondas (cebadores) de consenso, cuyos productos, una vez amplificados, se secuencian para la identificación de la(s) secuencia(s) clonotípica(s) de las CP tumorales presentes en la muestra³²³. Hoy se sabe que la ausencia de EMR mediante NGS (niveles de EMR en MO $<10^{-5}$ - 10^{-6}), constituye uno de los factores pronósticos más potentes a la hora de monitorizar la respuesta al tratamiento en pacientes tratados con MM, asociándose con tasas de supervivencia libre de progresión y supervivencia global significativamente más prolongadas, especialmente

entre aquellos casos que han alcanzado RC, independientemente de la edad del paciente, la calidad de la respuesta (según los criterios convencionales)¹³⁷, el tipo de tratamiento recibido y el momento de estudio (p.ej. tras tratamiento de inducción o trasplante de precursores hematopoyéticos)^{321, 323}. Sin embargo, la mayoría de las técnicas de secuenciación se basan en el uso de plataformas comerciales que no están disponibles en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico onco-hematológico y requieren del análisis de resultados por parte de un experto²¹³. Además, aunque en menor medida que lo descrito para las técnicas de ASO-qPCR, persiste el impacto negativo de la hipermutación somática que afecta a los genes de las Ig de la CP tumoral en la aplicabilidad de la técnica²¹³, en ausencia de estandarización y validación multicéntrica de la misma²¹⁶ (Tabla 5).

Tabla 5. Características diferenciales entre las técnicas convencionales empleadas actualmente para la monitorización de EMR en MO de pacientes tratados con MM

	ASO-qPCR	Citometría de flujo	Secuenciación masiva
Aplicabilidad	42%-75%	≈100%	>90%
Sensibilidad	>10 ⁻⁵	≈10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁶
Estandarización	Sí	No	En desarrollo
Disponibilidad en laboratorios clínicos	Media	Alta	Limitada
Rapidez de ejecución	Baja (>5 días)	Alta (<4 horas)	Baja (>7 días)
Muestra basal*	Sí	No	Sí
Muestra extraída recientemente	No	Sí (<48 horas)	No
Información sobre la celularidad global de la muestra	No	Sí	No

* Con una proporción de CP tumorales ≥5% de CP. ASO-qPCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa basada en el uso de sondas alelo-específicas.

2.6.2 Monitorización de EMR en sangre periférica de pacientes con MM

Al constituir una herramienta mínimamente invasiva, desde hace algunos años se ha evaluado la posible utilidad de las técnicas de biopsia líquida para la detección de la persistencia o aparición de CPTC en sangre de pacientes tratados con MM³²⁵. Así, se han empleado, tanto la citometría de flujo multiparamétrica^{203, 326, 327} como las técnicas moleculares de ASO-PCR^{195, 210} o secuenciación masiva^{204, 328}, para investigar la presencia de EMR (en forma de CP tumorales circulantes³²⁵ o ADN libre circulante³²⁹) en pacientes con MM, una vez iniciado el tratamiento.

En este sentido, los estudios basados en citometría de flujo multiparamétrica han demostrado la presencia, incluso con recuentos elevados, de CPTC en la sangre periférica de pacientes con MM una vez iniciado el tratamiento, asociándose la presencia de CPTC con peor respuesta al tratamiento y un pronóstico desfavorable^{203, 326, 327, 330}. Mediante estas técnicas inmunofenotípicas basadas en paneles de marcadores combinados en ≥ 6 -fluorescencias, se ha detectado presencia de CPTC en 18,7% y 19,3% de los pacientes con MM en el momento de la movilización de progenitores hematopoyéticos para trasplante autólogo^{203, 326, 327}. En concreto, estos mismos estudios refieren que una vez alcanzada la RC con diferentes esquemas de tratamiento, el porcentaje de pacientes con MM que presentan CPTC en sangre variaría entre 0%^{222, 330, 331} y 14%^{203, 326, 327} de los casos, dependiendo de la combinación específica de anticuerpos empleada (p.ej. en 3²²² o 6³³¹ fluorescencias), del número de células analizadas³²⁶ y del tipo de procedimiento empleado para la preparación de la muestra (p.ej. separación de células mononucleares²⁰³ o lisis de hematíes seguida de tinción directa de la muestra de sangre^{222, 327}). Por el contrario, el hallazgo de CPTC en sangre de pacientes con MM en el momento de la recaída es significativamente más frecuente, detectándose su presencia en casi dos tercios de estos casos ($\approx 64\%$)³³⁰. Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de CPTC por citometría de flujo en pacientes con MM tras tratamiento, constituye, de forma sistemática, un importante factor de riesgo, independientemente del esquema terapéutico administrado y de la calidad de la respuesta alcanzada frente al mismo^{203, 326, 327, 330}.

De forma similar, al aplicar técnicas moleculares (p.ej. ASO-qPCR), la frecuencia de enfermedad detectable en sangre de pacientes con MM una vez iniciado el tratamiento varía de acuerdo con la calidad de la respuesta clínica alcanzada, oscilando entre 24% en los casos estudiados en RC¹⁹⁵ hasta 73% de los que se encuentran en progresión/recaída²¹⁰. En cualquier caso, la presencia de enfermedad en sangre mediante ASO-qPCR a los 3 meses del trasplante, se ha asociado a tasas de supervivencia libre de progresión y de supervivencia global significativamente más cortas que las observadas entre los pacientes en los que no se detecta su presencia²¹⁰.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el pronóstico adverso de la presencia/persistencia de CPTC, es independiente de la técnica empleada para su detección, de la edad del paciente, del perfil citogenético de las CP tumorales y de la calidad de la respuesta alcanzada al tratamiento^{326, 330}. Además, la detección y cuantificación de CPTC en sangre periférica, constituye un método mínimamente invasivo que permite una monitorización más frecuente de los pacientes con MM,

una vez iniciado el tratamiento ^{192, 210, 222}, no viéndose afectados los resultados por la (posible) distribución heterogénea del tumor, o por la existencia de niveles variables de hemodilución de la muestra, como ocurre con la MO ³²⁵.

En paralelo a las técnicas de citometría de flujo y biología molecular, en los últimos años se han desarrollado técnicas de espectrometría de masa dirigidas a la identificación (con elevada sensibilidad) de la proteína-M secretada por las CP tumorales de pacientes con MM, y su monitorización a lo largo del curso de la enfermedad, una vez se ha iniciado el tratamiento. Así, se ha demostrado que la aplicación de estos procedimientos permite identificar niveles mínimos (0,05 y 0,00001 g/dL) de proteína monoclonal en suero, incrementando de forma muy significativa (>100 veces más) la sensibilidad frente a las técnicas clásicas de inmunofijación ^{211, 332}. Este método se basa en el principio de que cada Ig (normal y/o clonal) tiene una secuencia de aminoácidos específica que le confiere una masa concreta, diferente de otras Ig. La mayor sensibilidad alcanzada, respecto a la inmunofijación, facilita el rastreo del componente-M de forma específica (y mínimamente invasiva) en cualquier momento de la evolución de la enfermedad, indicando su presencia tras tratamiento, la persistencia de CP tumorales (ya sea a nivel de MO o incluso a nivel extramedular) ²¹¹. Además, permite resolver de forma eficiente los falsos positivos observados en pacientes que han recibido tratamiento con anticuerpos monoclonales ³³³. Según estudios preliminares referidos en la bibliografía, todo ello se traduce en una importante correlación con los estudios de EMR en MO por citometría de flujo de alta sensibilidad (10 colores), obviando la necesidad de realizar un aspirado medular ³³⁴. Sin embargo, la vida media de las Ig y el tiempo transcurrido hasta su aclaramiento, requiere de cierta cautela en la interpretación de los resultados, especialmente en muestras de suero obtenidas durante el tratamiento o inmediatamente después de que éste haya finalizado ²¹¹. Ante las ventajas que ofrece esta nueva tecnología y teniendo en cuenta las limitaciones referidas anteriormente, algunos autores han propuesto evaluar secuencialmente la concentración sérica del CM mediante la técnica de espectrometría de masas, al demostrarse que un único punto positivo tras tratamiento no confiere por sí solo significado pronóstico ³³⁴, mientras que niveles constantes de proteína monoclonal en estudios secuenciales se asociarían con una reducción significativa en la tasa de supervivencia libre de progresión de estos pacientes ³³⁵. A pesar de lo anteriormente expuesto, la técnica de espectrometría de masas no está disponible comercialmente lo que impide su aplicación inmediata de forma generalizada para la monitorización de pacientes con neoplasias de CP ^{211, 332}.

2.6.3 Monitorización de enfermedad residual extramedular en el MM

Uno de los principales retos en la monitorización de EMR en pacientes con MM, se centra en la evaluación de la respuesta al tratamiento a nivel extramedular, especialmente en aquellos pacientes que al diagnóstico muestran infiltración tumoral fuera de MO ²¹⁵. Ante esta situación, se recomienda complementar el estudio de EMR con pruebas de imágenes suficientemente sensibles que permitan redefinir la respuesta clínica, en caso de no observarse enfermedad en MO mediante técnicas sensibles de EMR ^{215, 286}. Así, la persistencia de focos positivos de captación mediante PET-CT ^{273, 336} o de un patrón de infiltración medular difuso por resonancia magnética ^{274, 336, 337} en pacientes con MM que han recibido altas dosis de tratamiento, reflejaría la presencia/persistencia de enfermedad residual, asociándose con un acortamiento del tiempo hasta la recaída ²⁸⁶. Así mismo, el resultado de los estudios de EMR mediante técnicas de imagen, no parecen verse influenciados por la posible existencia de una distribución heterogénea del tumor ²⁶⁷. No obstante, debe tenerse en cuenta que algunos contrastes (p.ej. fluoro-deoxiglucosa) empleados en las técnicas de PET-CT, pueden generar imágenes poco específicas al coexistir procesos inflamatorios o infecciosos a la par que la neoplasia de CP, pudiendo dar lugar a falsos negativos o falsos positivos ³³⁶.

**-HIPÓTESIS DE TRABAJO Y
OBJETIVOS-**

Las neoplasias de células plasmáticas (CP) constituyen un grupo de enfermedades con un comportamiento clínico variable, asociado a un pronóstico heterogéneo^{74, 84, 90, 95, 104, 105, 130, 151}. En ellas se incluyen desde tumores localizados, como el plasmocitoma solitario, hasta enfermedades diseminadas con compromiso sistémico asociado a un comportamiento clínico heterogéneo, que van desde la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), la amiloidosis por depósito de cadenas ligeras y el mieloma múltiple quiescente (MMQ), al mieloma múltiple activo (MM) y la leucemia de células plasmáticas (LCP)^{72, 96}.

En la actualidad, el diagnóstico de las neoplasias de CP se fundamenta en la detección de CP clonales y/o de sus productos (componente monoclonal en suero u orina) en presencia o no de sintomatología típica de la enfermedad⁹⁶. En este sentido, para la clasificación diagnóstica de estas entidades se tiene en cuenta el grado de compromiso tisular de la médula ósea (MO) y la sangre periférica por CP tumorales, la cantidad de componente monoclonal secretado por éstas a la circulación sanguínea, junto con la existencia de afectación funcional de la MO (es decir, anemia), del hueso (niveles de calcio sérico y/o presencia de lesiones óseas), del riñón, y la posible existencia de depósito tisular de cadenas ligeras^{96, 126}. No obstante, hoy día se reconoce que, dentro de cada subgrupo diagnóstico de gammapatía monoclonal, sigue existiendo una importante heterogeneidad clínica y evolutiva^{97, 126, 135, 232, 235, 338}. Así, mientras la gran mayoría de las GMSI y en menor proporción también de los MMQ, cursan con un comportamiento clínico estable y benigno, existe una proporción significativa de casos en los que la enfermedad sufre transformación maligna (p.ej. a MM) con una tasa de progresión del 1%⁹⁷ y 10%¹⁰⁵ al año, respectivamente. En contraposición, un pequeño grupo de pacientes con MM muestra un comportamiento clínico similar al de la GMSI^{339, 340}, mientras que otros casos evolucionan a LCP^{126, 170, 171}.

En los últimos años, se han identificado algunas características biológicas de las neoplasias de CP que se asocian con la heterogeneidad clínica observada, y se han elaborado sistemas de estratificación pronóstica que ayudan a identificar por un lado, aquellos pacientes con GMSI y MMQ con un elevado riesgo de progresión maligna^{97, 104}, y por otra parte, distinguir dentro de los pacientes con MM subgrupos con distinto pronóstico^{136, 201}.

De acuerdo con su comportamiento evolutivo, en la actualidad se recomienda la administración de tratamientos activos ya desde el mismo momento del diagnóstico, en las formas más agresivas (y sintomáticas) de la enfermedad como el MM y la LCP^{129, 268}, la amiloidosis

por depósito de cadenas ligeras¹⁰⁰, y más recientemente también, en el MMQ de alto riesgo^{231, 232}. En estos casos, desde hace tiempo se reconoce que la respuesta a las diferentes modalidades terapéuticas disponibles, tanto para pacientes jóvenes como para adultos de edad avanzada (>65 años), es muy variable²³⁶. Por ello, se considera fundamental realizar una evaluación periódica de la eficacia del tratamiento, asociándose de forma directa el grado de respuesta alcanzado con el pronóstico de la enfermedad¹³⁷. En este sentido, se sabe que los pacientes que alcanzan respuesta completa (RC) con desaparición del componente monoclonal en suero, e incluso normalización del cociente de cadenas ligeras κ y λ libres en plasma (RC estricta), junto a la desaparición de la captación de las lesiones óseas y de infiltración tumoral en otros tejidos, presentan un mejor pronóstico que aquellos que muestran únicamente respuesta parcial o que son refractarios al tratamiento^{270, 271, 275-277, 280, 341}. Sin embargo, entre los pacientes con MM que han alcanzado RC con los distintos esquemas de tratamiento, se sigue evidenciando un pronóstico heterogéneo, tanto en términos de supervivencia libre de progresión como de supervivencia global²⁵⁹. Dicha heterogeneidad se observa, incluso, entre aquellos casos que alcanzan RC con ausencia de enfermedad mínima residual (EMR) mediante técnicas inmunofenotípicas y/o moleculares convencionales^{213, 285, 286, 291}. Hoy se cree que al menos en parte, esto es debido, entre otros motivos, a una sensibilidad y/o aplicabilidad limitada de las técnicas convencionales de citometría de flujo de ≥ 4 colores^{215, 316} y ASO-qPCR^{214, 319} (y en menor medida también de las nuevas técnicas de secuenciación masiva) disponibles en la rutina diagnóstica^{213, 216, 323}.

Ante esta situación, cabe suponer que el desarrollo de nuevas aproximaciones metodológicas estandarizadas de citometría de flujo que, además de tener una elevada aplicabilidad, cuenten también con mayor sensibilidad, supondría un importante avance a la hora de evaluar la calidad de la respuesta al tratamiento en pacientes con MM y otras gammapatías monoclonales, facilitando una estratificación pronóstica más precisa que permitiría (re)definir la mejor estrategia terapéutica para cada paciente. Así mismo, la disponibilidad de técnicas estandarizadas de elevada sensibilidad permitiría también evaluar con mayor precisión la frecuencia con la que los pacientes con neoplasias de CP presentan células plasmáticas tumorales circulantes (CPTC) en sangre, tanto al diagnóstico como tras tratamiento.

Desde el punto de vista clínico, la presencia y número de CPTC constituye un importante factor pronóstico en pacientes con MM, tanto al diagnóstico como tras tratamiento^{168, 172, 191, 201, 327, 330}.

³³¹, siendo más limitados los estudios realizados hasta la fecha en pacientes con GMSI y MMQ ^{141, 188, 189, 200}. Sin embargo, la detección sistemática de CPTC ha estado restringida hasta el día de hoy a unos pocos centros de referencia, debido a la gran variabilidad en la frecuencia de casos positivos encontrada según el método empleado para su detección y cuantificación (p.ej. microscopía de fluorescencia vs. citometría de flujo convencional), y a la relativa complejidad de estas técnicas para poder ser adoptadas en la rutina diagnóstica. Aun así, la posibilidad de disponer de métodos de elevada sensibilidad para la detección y cuantificación de CPTC en pacientes con gammapatías monoclonales al diagnóstico, y posteriormente tras el inicio del tratamiento, abriría nuevas perspectivas en la evaluación pronóstica y la monitorización del tratamiento de pacientes con neoplasias de CP. En este sentido, la monitorización de CPTC en sangre de pacientes con MM tras tratamiento, podría proporcionar información complementaria a la derivada de los estudios ya establecidos de EMR en MO, al permitir una monitorización más estrecha de cada individuo ^{137, 216, 325}. Al tratarse de un análisis mínimamente invasivo, la investigación de la presencia de CPTC en sangre, además de permitir un seguimiento más frecuente de los pacientes que la realizada en la actualidad mediante los estudios de EMR de MO, superaría las limitaciones relacionadas con la existencia de niveles variables de hemodilución y la posible distribución heterogénea del tumor en MO, permitiendo calcular recuentos absolutos, que aportan mayor precisión a la hora de evaluar la masa tumoral en sangre ^{216, 325}.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis doctoral nos planteamos como **objetivo general**:

→ Desarrollar e implementar una nueva herramienta estandarizada de citometría de flujo de alta sensibilidad para la identificación y cuantificación de poblaciones de CP tumorales presentes en muy baja frecuencia, tanto en la sangre de pacientes con gammapatías monoclonales estudiadas al diagnóstico, como en la sangre y MO de pacientes tratados con MM, y determinar su posible utilidad pronóstica.

Para ello, hemos establecido **tres objetivos específicos**:

1. Diseñar y validar una nueva técnica estandarizada de citometría de flujo de alta sensibilidad dirigida a la detección de EMR en la MO de pacientes con MM tras tratamiento, y establecer la posible utilidad clínica de la información proporcionada respecto a la de otros métodos empleados actualmente para la detección de EMR, como la citometría de flujo convencional de 8-colores y las técnicas moleculares de secuenciación masiva.
2. Determinar la utilidad de la nueva estrategia de citometría de flujo desarrollada, para la detección y cuantificación de CPTC en sangre de pacientes con distintas neoplasias de CP en el momento del diagnóstico, y evaluar su posible impacto pronóstico.
3. Establecer el posible valor pronóstico de la detección de CPTC en sangre mediante la técnica de citometría de flujo de nueva generación desarrollada, en pacientes con MM una vez iniciado el tratamiento, y determinar su relación con la presencia/ausencia de EMR en MO y de componente monoclonal en suero.

**-MATERIALES, MÉTODOS Y
RESULTADOS-**

En esta sección se describen los grupos de pacientes analizados, así como los materiales y métodos empleados para su estudio y los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos propuestos en esta tesis doctoral. La exposición de los materiales y métodos utilizados, así como de los resultados alcanzados se recogen en este apartado en forma de tres artículos científicos originales publicados en revistas de alto impacto, los cuales estarán precedidos de un breve resumen en castellano que facilite una rápida revisión de su contenido.

ARTÍCULO 1

“Citometría de flujo de nueva generación para la detección sensible y estandarizada de enfermedad mínima residual en el mieloma múltiple”

Juan Flores-Montero^{*1}, **Luzalba Sanoja Flores^{*1}**, Bruno Paiva^{*2}, Noemí Puig³, Omar García-Sánchez³, Sebastian Böttcher⁴, Vincent H.J. van der Velden⁵, José-Juan Pérez-Morán³, María-Belén Vidriales³, Ramón García-Sanz³, Cristina Jimenez³, Marcos González³, Joaquín Martínez-López⁶, Alba Corral Mateos¹, Georgiana-Emilia Grigore⁷, Rafael Fluxá⁷, Roberia Pontes⁸, Joana Caetano⁹, Lukasz Sedek¹⁰, María-Consuelo del Cañizo³, Joan Bladé¹¹, Juan-José Lahuerta⁶, Carlos Aguilar¹², Abelardo Báñez¹³, Aránzazu García-Mateo¹⁴, Jorge Labrador¹⁵, Pilar Leoz¹, Carmen Aguilera-Sanz¹⁶, Jesús San-Miguel^{**2}, María-Victoria Mateos^{**3}, Brian Durie^{***17}, Jacques J.M. van Dongen^{***5,18} y Alberto Orfao^{***1} en nombre del Consorcio EuroFlow y de la Fundación Internacional del Mieloma.

*Estos autores han contribuido de igual manera al trabajo realizado y por tanto cada uno de ellos debe ser considerado como primer autor.

**Ambos autores han contribuido de igual manera a este trabajo y por tanto ambos deben ser considerados como penúltimo autor.

***Estos autores han contribuido de igual manera a este trabajo y por tanto cada uno de ellos debe ser considerado como último autor.

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL); Servicio General de Citometría (NUCLEUS) y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, Instituto Carlos III, Madrid, España; ²Clínica Universidad de Navarra; Centro de Investigación de Medicina Aplicada (CIMA), IDISNA, Pamplona, España (UNAV); ³Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, España (HUSAL); ⁴Segundo Departamento de Medicina, Hospital Universitario de Schleswig-Holstein, Campus de Kiel, Kiel, Alemania (UNIKIEL); ⁵Departamento de Inmunología, Erasmus MC, Centro Médico Universitario de Rotterdam, Rotterdam, Países Bajos (EMC); ⁶Servicio de Hematología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España; ⁷Cytognos SL, Salamanca, España; ⁸Servicio de Pediatría, Instituto de Pediatría y Puericultura, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Brasil; ⁹Servicio de Hematología, Instituto Português de Oncología, Lisboa, Portugal (IPOLFG); ¹⁰Departamento de Hematología y Oncología Pediátrica, Universidad Médica de Silesia en Katowice, Zabrze, Polonia (SUM); ¹¹Servicio de Hematología, Hospital Clinic I Provincial, Barcelona, España; ¹²Servicio de Hematología, Hospital General de Santa Bárbara, Soria, España; ¹³Servicio de Hematología, Complejo Asistencial de Ávila, Ávila, España; ¹⁴Servicio de Hematología, Complejo Asistencial de Segovia, Segovia, España; ¹⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, España; ¹⁷Centro del Cáncer Cedars-Sinai Samuel Oschin, Los Angeles, Estados Unidos; ¹⁸Servicio de Inmunohematología y Hemoterapia, Centro Médico Universitario de Leiden, Leiden, Países Bajos.

Leukemia (2017), 1–10

DOI: 10.1038/leu.2017.29

La información suplementaria correspondiente a este trabajo y citada en el mismo está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I y en el disco compacto disponibles al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción. La citometría de flujo constituye uno de los principales métodos empleados en la evaluación de la calidad de la respuesta al tratamiento y la monitorización de enfermedad mínima residual (EMR) en médula ósea (MO) de pacientes con mieloma múltiple (MM). Pese a sus ventajas, la detección de EMR mediante las técnicas convencionales de inmunofenotipado por citometría de flujo presenta niveles de sensibilidad inferiores a los de las técnicas moleculares y carece de estandarización.

Objetivo. En este trabajo nos hemos propuesto diseñar y estandarizar un método innovador y altamente sensible de citometría de flujo de nueva generación para la detección de EMR en MO de pacientes con MM tras tratamiento. Así mismo, validaremos la aplicabilidad, sensibilidad y especificidad de esta nueva herramienta inmunofenotípica frente a otras técnicas empleadas para el estudio de EMR, como la citometría de flujo convencional de 8-colores y herramientas moleculares de secuenciación masiva (de nueva generación) basadas en la identificación de reordenamientos del gen de las inmunoglobulinas.

Materiales y métodos. En total, estudiamos 375 muestras de MO y 10 muestras de sangre periférica procedentes de 332 pacientes con neoplasias de células plasmáticas (CP) y de 53 controles sanos, distribuidas entre las distintas etapas del trabajo. En un primer paso, diseñamos un panel de anticuerpos seleccionando los marcadores asociados a fenotipo de CP, que ofrecían mayor capacidad resolutive para la identificación y discriminación entre las CP normales *vs.* tumorales, según su perfil inmunofenotípico. En paralelo, optimizamos un nuevo protocolo de preparación y tinción de muestras con el que fuese posible incrementar el número de células a analizar, aplicando, además, estrategias informáticas que permitiesen la identificación y cuantificación automática de las poblaciones celulares presentes en MO. Finalmente, validamos el diseño global de la nueva herramienta de citometría de flujo de nueva generación frente a la técnica de citometría de flujo convencional, en una amplia cohorte de muestras de MO de pacientes con MM (n=228), de las que 110 muestras procedían de pacientes que habían alcanzado al menos muy buena respuesta parcial al tratamiento administrado. Además, en un grupo de estos casos (n=31) analizamos también la presencia *vs.* ausencia de EMR en MO respecto a la técnica de secuenciación masiva.

Resultados. El desarrollo de la nueva técnica de detección de EMR basada en citometría de flujo de nueva generación descrita en este trabajo, se apoyó en tres pilares fundamentales: i) la optimización de un panel de anticuerpos para la detección de CP tumorales, compuesto por dos

tubos de ocho colores tras cinco ciclos de diseño, evaluación y rediseño de las combinaciones testadas, ii) el establecimiento de un nuevo protocolo de preparación y tinción de muestras que permite el análisis de $\geq 10^7$ células/muestra mediante un paso inicial de lisis masiva de hematíes, y iii) el desarrollo de herramientas informáticas innovadoras para la identificación y clasificación automática de poblaciones celulares de MO, incluidas las CP normales y patológicas.

La validación del nuevo procedimiento inmunofenotípico de detección de EMR, se llevó a cabo mediante un estudio multicéntrico sobre 110 muestras de MO de pacientes con MM que habían alcanzado una (muy buena) respuesta parcial o respuesta completa (RC) al tratamiento administrado. En este sentido, la técnica de citometría de flujo de nueva generación desarrollada mostró una mayor tasa de casos con EMR positiva respecto a la detectada con la citometría de flujo convencional de 8 colores (47% vs 34%, respectivamente; $p=0,003$), al identificar la presencia de EMR en un grupo de 18 pacientes con niveles de EMR indetectable mediante citometría convencional. De forma similar, la frecuencia de casos con EMR positiva mediante citometría de flujo de nueva generación fue también superior a la detectada mediante secuenciación masiva (70% vs 52%, respectivamente; $p=0,06$). Esta mayor sensibilidad alcanzada con la técnica inmunofenotípica de EMR puesta a punto en este trabajo se tradujo, a su vez, en una supervivencia libre de progresión significativamente más prolongada para aquellos pacientes que estando en RC, no presentaron EMR en MO mediante citometría de flujo de nueva generación, frente a aquellos en los que pese a estar en RC se les detectó persistencia de CP tumorales residuales en MO (EMR positiva).

Conclusión. La nueva estrategia desarrollada en este trabajo para la detección de EMR en MO de pacientes con MM posteriormente al tratamiento, basada en citometría de flujo de nueva generación, constituye un método más sensible y estandarizado que las técnicas convencionales de citometría de flujo, superando gran parte de las limitaciones actuales de estas últimas. Además, la presencia *vs.* ausencia de EMR en MO mediante la técnica desarrollada mostró un importante impacto en la predicción de la supervivencia libre de progresión de pacientes con MM que han alcanzado una buena respuesta al tratamiento, representando así una alternativa robusta frente a los métodos disponibles en la actualidad, lista para ser implementada en la rutina diagnóstica.

ORIGINAL ARTICLE

Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma

J Flores-Montero^{1,19}, L Sanoja-Flores^{1,19}, B Paiva^{2,19}, N Puig³, O García-Sánchez³, S Böttcher⁴, VHJ van der Velden⁵, J-J Pérez-Morán³, M-B Vidriales³, R García-Sanz³, C Jimenez³, M González³, J Martínez-López⁶, A Corral-Mateos¹, G-E Grigore⁷, R Fluxá⁷, R Pontes⁸, J Caetano⁹, L Sedek¹⁰, M-C del Cañizo³, J Bladé¹¹, J-J Lahuerta⁶, C Aguilar¹², A Bárez¹³, A García-Mateo¹⁴, J Labrador¹⁵, P Leoz¹, C Aguilera-Sanz¹⁶, J San-Miguel^{2,20}, M-V Mateos^{3,20}, B Durie^{17,21}, JJM van Dongen^{5,18,21} and A Orfao^{1,21}

Flow cytometry has become a highly valuable method to monitor minimal residual disease (MRD) and evaluate the depth of complete response (CR) in bone marrow (BM) of multiple myeloma (MM) after therapy. However, current flow-MRD has lower sensitivity than molecular methods and lacks standardization. Here we report on a novel next generation flow (NGF) approach for highly sensitive and standardized MRD detection in MM. An optimized 2-tube 8-color antibody panel was constructed in five cycles of design-evaluation-redesign. In addition, a bulk-lysis procedure was established for acquisition of $\geq 10^7$ cells/sample, and novel software tools were constructed for automatic plasma cell gating. Multicenter evaluation of 110 follow-up BM from MM patients in very good partial response (VGPR) or CR showed a higher sensitivity for NGF-MRD vs conventional 8-color flow-MRD -MRD-positive rate of 47 vs 34% ($P = 0.003$). Thus, 25% of patients classified as MRD-negative by conventional 8-color flow were MRD-positive by NGF, translating into a significantly longer progression-free survival for MRD-negative vs MRD-positive CR patients by NGF (75% progression-free survival not reached vs 7 months; $P = 0.02$). This study establishes EuroFlow-based NGF as a highly sensitive, fully standardized approach for MRD detection in MM which overcomes the major limitations of conventional flow-MRD methods and is ready for implementation in routine diagnostics.

Leukemia advance online publication, 10 March 2017; doi:10.1038/leu.2017.29

INTRODUCTION

In recent years, the landscape of treatment of multiple myeloma (MM) has substantially changed^{1–4} leading to significantly increased complete response (CR) rates and survival.^{5–11} Therefore, CR has become a major goal in newly diagnosed MM, even in aged patients.^{5,12–15} Despite these advances, most CR patients will ultimately relapse.^{7,10} Consequently, better insight in depth of treatment response is required and more sensitive methods are needed for detection of minimal residual disease (MRD), particularly in cases that reached CR and stringent CR (sCR).¹⁶

Conventional 4–8-color flow cytometry,^{17–24} and to a lesser extent also allele-specific oligonucleotide quantitative PCR (ASOqPCR) and next generation sequencing (NGS),^{25–29} are progressively being used to monitor MRD in bone marrow (BM) of MM after therapy.^{16,30} These studies confirmed the relevance of

MRD measurements for identification of MM patients at higher risk of relapse.^{16,22} However, despite the greater sensitivity of the MRD approaches (vs classical CR/sCR criteria), identification among MRD[–] cases of patients that will eventually relapse vs those who are potentially cured still remains a challenge, implying that more sensitive MRD approaches are needed.^{16,31}

High sensitivity and broad applicability have both become mandatory requirements for MRD monitoring in MM.¹⁶ Early studies have shown that conventional 4–6-color flow-MRD is applicable in virtually all MM patients ($\geq 95\%$), whereas ASOqPCR and NGS have a more restricted applicability (50–90% of cases), mainly due to the high number of somatic hypermutations, which cause variable levels of primer annealing with unpredictable amplification/quantitation results.^{16,25,32–34} However, the sensitivity of conventional flow-MRD ($< 10^{-4}$) remains (systematically) lower

¹Cancer Research Center (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL); Cytometry Service (NUCLEUS) and Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain (USAL); ²Clinica Universidad de Navarra; Applied Medical Research Center (CIMA), IDISNA, Pamplona, Spain (UNAV); ³Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain (HUSAL); ⁴Second Department of Medicine, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany (UNIKIEL); ⁵Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands (EMC); ⁶Department of Hematology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁷Cytognos SL, Salamanca, Spain; ⁸Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro and Institute of Pediatrics and Childhood Care, Rio de Janeiro, Brazil; ⁹Department of Hematology, Portuguese Institute of Oncology, Lisbon, Portugal (IPOLFG); ¹⁰Department of Pediatric Hematology and Oncology, Medical University of Silesia in Katowice, Zabrze, Poland (SUM); ¹¹Department of Hematology, Hospital Clinic I Provincial, Barcelona, Spain; ¹²Department of Hematology, Hospital General de Santa Bárbara, Soria, Spain; ¹³Department of Hematology, Complejo Asistencial de Ávila, Ávila, Spain; ¹⁴Department of Hematology, Complejo Asistencial de Segovia, Segovia, Spain; ¹⁵Hematology Department, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain; ¹⁶Department of Hematology, Hospital El Bierzo, Ponferrada, Spain; ¹⁷Cedars-Sinai Samuel Oschin Cancer Center, Los Angeles, CA, USA and ¹⁸Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. Correspondence: Professor A Orfao, Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-USAL), Avda. Universidad de Coimbra S/N, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain. E-mail: orfao@usal.es

¹⁹These authors have all contributed equally to this study and should be considered as first authors.

²⁰These authors have all contributed equally to this study and both should be considered as previous-to-last authors.

²¹These authors have all contributed equally to this study and the three should be considered as last authors.

Received 18 November 2016; revised 24 December 2016; accepted 3 January 2017; accepted article preview online 20 January 2017

than that of ASOqPCR and NGS ($< 10^{-4}$ – 10^{-6}).^{25,26,29,35} More recently, several studies in MM have shown that conventional 8-color flow-MRD assays have an increased sensitivity – limit of detection (LOD) of between $< 10^{-4}$ and $< 10^{-5}$, leading to a significantly improved prediction of outcome.^{24,36} However, current flow-MRD assays and NGS still suffer from a major limitation: lack of standardization.³⁷ Actually, different markers and antibody panels, distinct numbers of cells measured, and highly variable criteria for MRD positivity are currently applied worldwide.^{38,39} Therefore, standardization efforts have been made and consensus recommendations and guidelines have been recently proposed.^{40–42} However, such consensus recommendations still rely on subjective ‘expert-shared’ knowledge and experience, and do not completely solve the lack of technical standardization, whereas prospectively validated flow-MRD approaches are still missing.³⁹

Here we report on the design of a EuroFlow-based next generation flow (NGF) approach for highly sensitive and standardized detection of MRD in MM, and the results of its validation vs a conventional 8-color flow-MRD method²⁴ and NGS. The novel NGF-MRD approach takes advantage of innovative tools and procedures recently developed by the EuroFlow Consortium for sample preparation, antibody panel construction (including choice of type of antibody and fluorochrome), and automatic identification of plasma cells (PC) against reference databases of normal and patient BM.^{43–46} Prospective validation of the whole procedure at two distinct centers confirmed its robustness and significantly greater sensitivity vs conventional 8-color flow-MRD approaches, comparable to current NGS methods, with an improved prediction of patient outcome.

SUBJECTS AND METHODS

Patients, controls and samples

A total of 375 BM and 10 peripheral blood EDTA-anticoagulated samples from 53 controls and 332 adult plasma cell disorder (PCD) patients, were studied (Supplementary Table 1) to design Version 1 of the MM-MRD antibody panel ($n=94$; 31 normal/reactive and 63 MM studied at diagnosis), to compare the performance of antibody reagents evaluated in Versions 2–5 of the NGF-MRD panel (19 BM diagnostic patient samples), to evaluate distinct sample preparation protocols ($n=10$ peripheral blood and 8 BM samples) and to validate NGF (Version 5) against conventional 8-color flow-MRD ($n=244$ consecutively recruited samples corresponding to 16 healthy donors, 66 PCD samples studied at diagnosis and 162 MM patient samples investigated during follow-up, including 110 follow-up BM samples from MM patients evaluated at \geq very good partial response (VGPR): 39 VGPR; 52 CR; and 19 sCR cases-. Twenty-one \geq VGPR BM samples and 10 additional BM samples -22/31 with very low MRD levels ($\leq 10^{-4}$) - were further used to blindly compare NGF vs NGS (Supplementary Table 1).

The study was approved by the local ethics committees and written informed consent was given by each donor according to the Declaration of Helsinki. All samples were processed at each participating center (USAL/HUSAL, UNAV, EMC, UNIKIEL, IPOLFG, SUM) within 24 h after collection.

Immunophenotypic studies for selection of plasma cell (PC)-associated markers

BM samples used to establish Version 1 (Table 1) of the MM-MRD panel were stained with the EuroFlow PCD 8-color panel for a total of 12 different markers (CD38, CD138, CD45, CD19, CD27, CD28, CD56, CD81, CD117, Cylgk, Cylgl and β 2-microglobulin), using previously described EuroFlow sample preparation protocols.^{44,45} For data analysis, events from both 8-color tubes (per sample) were merged and the values of all parameters measured per tube were mathematically calculated for the individual PC events using the merge and calculation functions of the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain).^{43–45} Subsequently, phenotypic data on normal PC (nPC) from 31 normal/reactive BM samples were merged in a reference database. PC were identified based on their unique pattern of expression of CD38, CD138, CD45 and light scatter features, following consensus recommendations.^{40–42} Principal component analysis^{44,45} of single PC events was used to compare the reference database of nPC vs

aberrant/clonal PC (aPC) from each of 63 MM BM studied at diagnosis, to identify the most discriminating markers that distinguished between (reference) nPCs and aPC from individual MM patients (Figure 1), and establish the applicability of the method. Additionally, CD200 expression was also evaluated on PC in a subset of 28 MM.

Results on the comparison between antibody reagents directed against the same marker (Supplementary Table 2), was based on their staining profiles on nPC vs aPC (vs other non-PC BM populations) as defined by median fluorescence intensity (range: 0–262,144 arbitrary units) and stain index values, as previously described⁴⁷ (Supplementary text). The EuroFlow reagent evaluation criteria⁴⁴ were used to discard or accept individual reagents: (i) increased background fluorescence; (ii) dim fluorescence of PCs vs other BM populations (CD38, CD138, Cylgk⁺ or Cylgl⁺) or the positive vs negative BM reference populations (CD19, CD27, CD56, CD45, CD81 vs CD117) and (iii) interaction with the staining pattern of other reagents.

Design and evaluation of sample preparation protocols

For the evaluation of different sample preparation protocols, eight BM and 10 peripheral blood samples were stained in parallel with the CD138-HV450 CD45-PacO CD56-PE CD5-PerCPCy5.5 CD19-PECy7 CD3-APC antibody combination under five different conditions: (i) the EuroFlow standard operating procedure (SOP) for staining of 50 μ l of sample with cell surface markers,⁴⁴ and (ii) four different ammonium chloride-based bulk-lysis procedures followed by staining of 5×10^6 cells in 100 μ l/tube (final concentration of 5×10^4 cells/ μ l), as described in detail in the Supplementary text.

Validation of the NGF MM-MRD method

Overall, 228 MM diagnostic ($n=66$) and follow-up ($n=162$) BM samples ($n=110$ in VGPR or CR/sCR) were evaluated in parallel with the NGF MRD approach vs local routine flow-MRD methods (that is, conventional 8-color flow-MRD technique).²⁴ Detailed description of these BM samples, related patient clinical data, disease status and time points at evaluation is provided in Supplementary Tables 1, 3 and 4. Briefly, conventional flow-MRD was based on staining of 300 μ l of whole BM with a single 8-color antibody combination (CD45-PacB CD138-OC515 CD38-FITC CD56-PE CD27-PerCPCy5.5 CD19-PECy7 CD117-APC CD81-APCH7), as previously described.²⁴ In turn, for the NGF approach a median volume of 1.5 ± 1.3 ml (range: 0.1–5.3 ml) was employed adding up to a median total sample volume of 1.8 ml (maximum of 5.6 ml). PC populations that coexisted in individual BM samples were identified based on a combination of the CD38, CD138, CD45 PC-associated markers and light scatter characteristics, the presence vs absence of myeloma-associated phenotypes, plus Cylg light chain restriction in case of NGF, as described elsewhere.⁴⁸ According to consensus recommendations,⁴² the limit of quantitation and the LOD of the NGF MRD method was calculated at $< 5 \times 10^{-6}$ and $< 2 \times 10^{-6}$ aPC, based on the identification of ≥ 50 and ≥ 20 aPC among 10^7 events, respectively. More detailed information about instrument conditions, data acquisition and analysis, and the specific reagents used in the present study is provided as Supplementary Material.

Automatic identification and enumeration of aPC was performed in 110 MM BM follow-up (VGPR or CR/sCR) samples using the automatic gating function of the Infinicyt software and previously described procedures,^{49,50} and the results were compared against the conventional expert-guided PC-identification/gating approach. For automatic gating, a database consisting of a subset of 14 normal BM samples stained with Version 5 of the antibody panel was constructed and used.⁵⁰

In a subset of 31 MM follow-up BM samples with low MRD levels (for example, $\leq 10^{-4}$) in which enough DNA was available, MRD was also evaluated by NGS. For this purpose, patient-specific *VDJH* rearrangements were amplified and directly sequenced from DNA extracted from diagnostic samples using the DNazol reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA) and *IGHV* family-specific primers that covered framework regions 1 (FR1) and FR2, plus a JH consensus primer, as described elsewhere.^{26,32} *VDJH* rearrangements identified at diagnosis were used as MRD-targeted sequences for subsequent follow-up samples. Follow-up DNA samples were amplified using the LymphoTrack *IGH* Assay (InVivoScribe Technologies, San Diego, CA, USA) and sequenced in an Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA). To all reactions, a known amount of DNA from the MWCL-1 cell line was added as reference control for cell enumeration. The Fastq files generated were analyzed with the LymphoTrack/MiSeq Software (InVivoScribe/Illumina). The number of MRD cells was calculated from the number of reads for the diagnostic *VDJH* target rearrangements and the number of reads of the reference rearrangement;

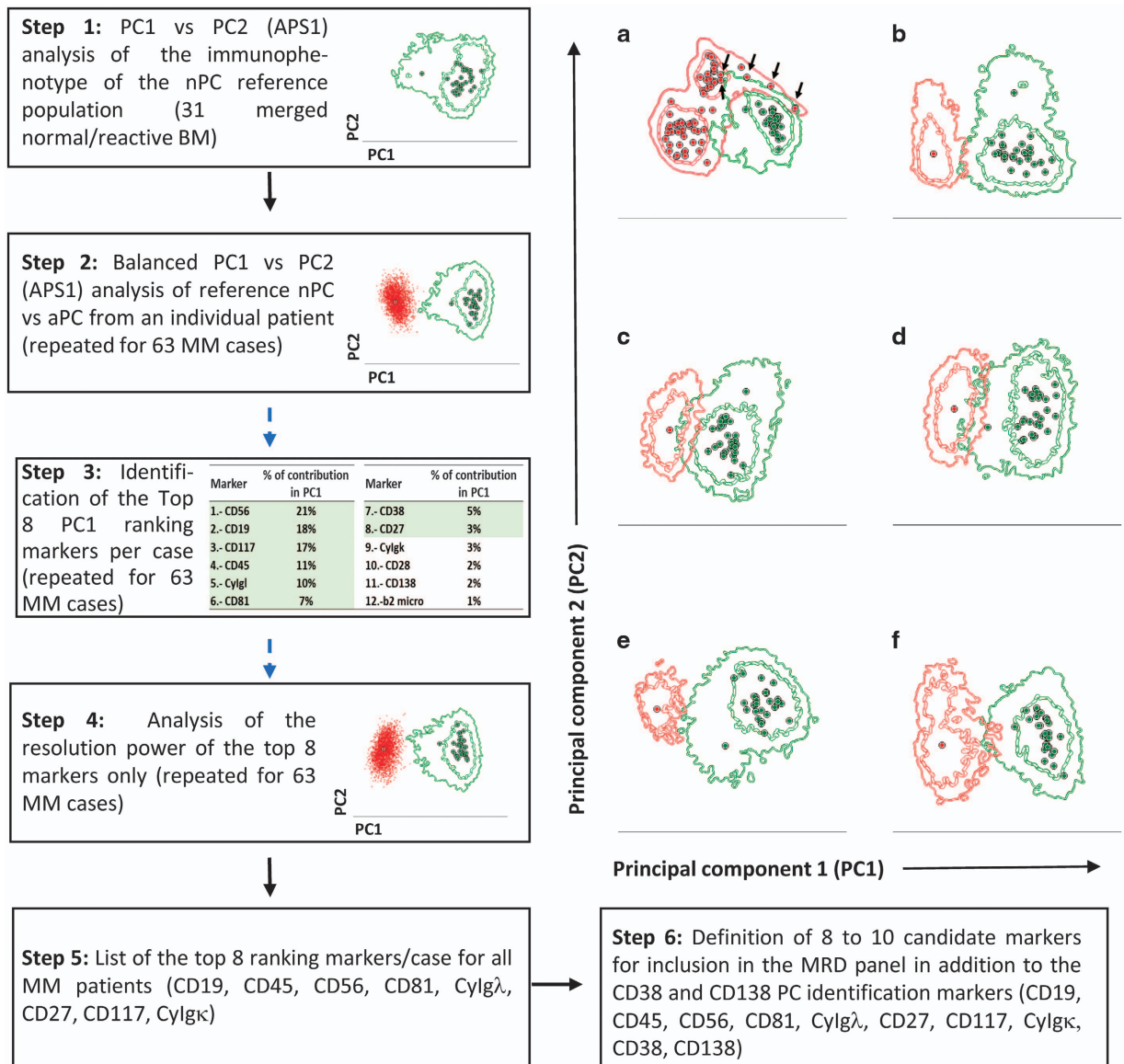


Figure 1. Diagram illustrating the process used for the selection and evaluation of markers for the NGF MM MRD panel. Left and lower right panels show the sequential steps followed to select those markers providing the best resolution between aPCs and nPC, including principal component 1 (PC1) vs PC2 —automatic population separator (APS1)— plots illustrating the described comparisons for steps 1, 2 and 4, respectively. (right; **a**) An APS1 plot corresponding to the simultaneous evaluation of 31 normal/reactive BM samples vs all 63 MM patients studied at diagnosis, in which the resolution power of the EuroFlow diagnostic PCD antibody panel combination is illustrated. Please note that PC from five samples (highlighted by the black arrows) showed suboptimal separation in the overall comparison; nonetheless, when individually compared vs the normal/reactive reference PC pool (**b–f**), these cases also showed sufficient phenotypic discrimination from nPC. Markers contributing to PC1 (and their percentage contribution) for each panel on the right include: (**a**) CD19(20%), CD56(17%), CD81(13%), CD45(11%), CD117(10%), CD27(8%), Cylgλ(5%), CD38(5%), Cylgκ(4%), β2 micro(3%), CD138(3%), CD28(1%); (**b**) Cylgκ(27%), Cylgλ(13%), β2 micro(12%), CD38(11%), CD56(10%), CD138(7%), CD28(16%), CD45(4%), CD27(4%), CD117(4%), CD19(2%), CD81(0%); (**c**) Cylgκ(20%), CD45(16%), CD56(11%), CD28(10%), CD19(10%), CD27(8%), CD117(6%), CD81(6%), CD38(6%), Cylgλ(4%), CD138(3%), β2 micro(0%); (**d**), CD19(29%), β2 micro(13%), Cylgκ(13%), CD56(13%), CD45(11%), CD38(5%), CD27(4%), Cylgλ(3%), CD28(3%), CD138(2%), CD117(2%), CD81(2%); (**e**) CD19(23%), β2 micro(13%), CD45(12%), Cylgλ(11%), CD81(9%), CD56(7%), Cylgκ(6%), CD38(6%), CD28(4%), CD138(4%), CD27(4%), CD117(1%); (**f**) CD19(20%), CD117(19%), CD81(14%), CD45(13%), CD56(12%), Cylgλ(9%), β2 micro(6%), CD38(3%), CD27(2%), CD28(1%), CD138(1%), Cylgκ(0%). In all PC1 vs PC2 plots, solid circles represent median values for the 12 fluorescence-associated parameters evaluated, inner (dotted) and outer (solid) lines represent the first and second standard deviations for individual PC. nPC populations are depicted in green while aPC are shown as red dots, circles and lines, respectively.

percentage MRD was calculated upon dividing the number ($\times 100$) of MRD cells by the total number of cells in the reaction.

Statistical methods

Number of samples required in the assay development and validation experiments were calculated using the hypothesis contrast strategy for the

comparison of paired quantitative data (EPIDAT 4.0 software, Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Spain). To evaluate the distribution of MRD data, the Kolmogorov–Smirnov test was used. The Wilcoxon or Friedman tests and the Mann–Whitney *U* or the Kruskal–Wallis tests were used to assess the (two-sided) statistical significance of differences observed between ≥ 2 groups for paired and unpaired variables, respectively. For correlation studies, the (two-sided) Spearman's *rho* (ρ) for non-parametric

paired data was employed. The Kaplan–Meier method and the (two-sided) log-rank test were used to plot and compare progression-free survival (PFS) curves. PFS was defined as the time from MRD assessment to either disease progression or the last follow-up visit. Statistical significance was set at $P < 0.05$. All samples evaluated were blindly analyzed during the experimental phase.

RESULTS

Antibody panel construction for optimal identification of MM plasma cells at MRD levels

Comparison of the whole immunophenotypic profile of aPC from individual MM patients ($n = 63$) vs the normal/reactive BM PC database ($n = 31$) showed multiple aberrant phenotypes in every case (Figure 1). Eight of the 12 markers evaluated contributed most frequently to the discrimination between aPC and nPC based on principal component analysis of single PC phenotypes: CD19 (97% of cases); CD45 (89%); CD56 (86%); CD81 (86%); Cylgλ (73%); CD27 (71%); CD117 (60%); and Cylgκ (56%). Re-evaluation of the utility of the combination of these eight top markers alone in the same 63 MM BM confirmed clear-cut distinction between aPC and nPC in the database, in every case. Consequently, the six surface membrane markers of this list, plus the CD138 and CD38 PC-identification markers, were selected to be combined in a single 8-color tube. In a second 8-color antibody combination, Cylgκ and Cylgλ were added to the CD138 and CD38, together with CD229 as an extra PC-identification antigen, plus the three most informative markers (CD19, CD45, CD56), for parallel confirmation of immunoglobulin light chain (κ vs λ) restriction of PC suspected to be (clonal) myeloma PC (Versions 2 and 3).

Optimization of the two 8-color MM MRD antibody combinations
Subsequently, evaluation of the same 63 MM diagnostic samples using the two 8-color antibody combinations selected above, but focusing now on the detection of minimal numbers (that is, 0.02–0.1%) of MM PC, was performed using virtual (software) dilution experiments of decreasing numbers of PC in the nPC

reference database, as previously described.⁵¹ This revealed suboptimal reagent performance (for example dim staining) for two fluorochrome positions (that is, CD138-PacO and CD81/Cylgλ-APCH7).

From this initial Version 1, until the final version of the antibody panel (Version 5), four other versions of different fluorochrome-conjugated reagents of the same markers were tested (Table 1) as described in detail in Supplementary text. Briefly, in Version 2, the suboptimal CD138-PacO reagent was replaced by CD138-HV500C; in Version 3, suboptimal CD81-APCH7 and Cylgλ-APCH7 reagents were both replaced by CD81-APCC750 and Cylgλ-APCC750. For Version 4, the CD138-HV500C reagent found to be still suboptimal was replaced, together with the CD27-PerCPCy5.5 and CD45-PacB fluorochrome positions, by CD138-HV450, CD27-HV500C and CD45-PerCPCy5.5, respectively. Finally, in Version 5, CD138-HV450, CD27-HV500C and CD38-FITC were replaced by the optimized CD138-BV421 and CD27-BV510 conjugates, and the multi-epitope CD38-FITC antibody, respectively. The later CD38 reagent showed an equivalent performance in diagnostic MM samples to that of the original CD38 antibody clone, but a much better resolution in BM samples from MM patients who had received Daratumumab therapy (Supplementary Figure 1). Moreover, CD229 was excluded from tube 2, since this marker did not identify all aPC in 4/49 (8%) MM cases tested, and it was not specific for PC, being also (strongly) expressed on plasmacytoid dendritic cells and a subset of lymphocytes.⁵²

Evaluation of sample preparation protocols

Overall, bulk-lysis procedures were systematically associated with acquisition of a significantly ($P < 0.05$) greater number of cells vs the conventional BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) based (FACS-lyse) SOP (Supplementary Figure 2A). However, all bulk-lysis conditions but that using low bovine serum albumin (0.5% bovine serum albumin) and a FACS-lysing-fixation step (protocol A1 in Supplementary Figure 2), showed a significantly higher proportion of debris and dead cells ($P < 0.05$

Table 1. Multiple myeloma NGF-MRD: 8- and 10-color antibody panels evaluated from the first (Version 1) to the final version (Version 5)

8-color panel version	Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7	
1	1	CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81	
	2	CD45	CD138 <i>HV500C</i>	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117 Cylgκ	CD81 Cylgλ	
2	1	CD45	<i>CD138</i>	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81	
	2	CD45	<i>CD138</i>	CD38	<i>CD56</i>	<i>CD229</i>	<i>CD19</i>	Cylgκ	Cylgλ APC C750	
3	1	CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81	
	2	CD45 <i>HV450</i>	CD138	CD38	CD56	CD229	CD19	Cylgκ	Cylgλ	
4	1	<i>CD138</i>	<i>CD27</i>	CD38	CD56	<i>CD45</i>	CD19	CD117	CD81	
	2	<i>CD138</i> <i>BV421</i>	<i>CD27</i> <i>BV510</i>	CD38	CD56	<i>CD45</i>	CD19	Cylgκ	Cylgλ	
5	1	<i>CD138</i>	CD27	<i>CD38 (ME)</i>	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	
	2	<i>CD138</i>	CD27	<i>CD38 (ME)</i>	CD56	CD45	CD19	Cylgκ	Cylgλ	
10-color panel version	BV421	BV510	BV605	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCAF700/AF700	APC C750
1	CD138	CD27	Cylgλ	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	Cylgκ	CD81
2	CD138	CD27	<i>CD117</i>	CD38	CD56	CD45	CD19	<i>Cylgκ</i>		<i>Cylgλ</i>
3	CD138	CD27	<i>CD45</i>	<i>CD38 (ME)</i>	CD56	<i>Cylgλ</i>	CD19	<i>CD117</i>	<i>CD81</i>	<i>Cylgκ</i>

Abbreviations: APC, allophycocyanin; A700, alexa fluor 700; BV421, brilliant violet 421; BV510, brilliant violet 510; BV605, brilliant violet 605; Cy, cytoplasmic; C750, C750 dye; Cy5.5, cyanin5.5; Cy7, cyanin7; FITC, fluorescein isothiocyanate; HV450, Horizon V450; HV500C, Horizon V500C; H7, Hillite 7; Ig, immunoglobulin; MRD, minimal residual disease; ME, multi-epitope; PacB, pacific blue; PacO, pacific orange; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin–chlorophyll–protein. Changes from previous versions in markers or fluorochromes are highlighted in italics.

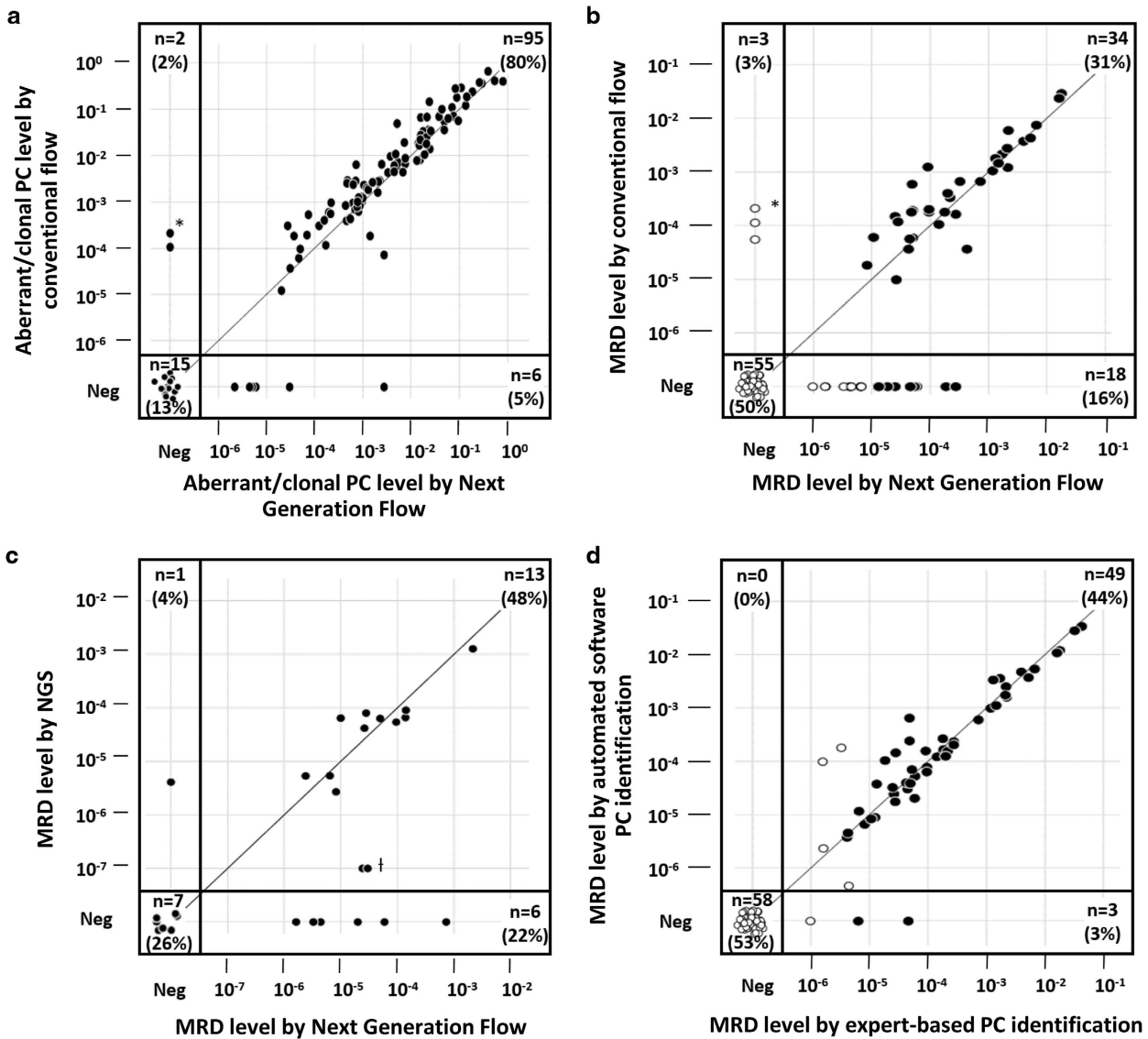


Figure 2. Validation of the new NGF method for MRD detection in MM against both conventional 8-color flow-MRD (**a**, **b**) and NGS (**c**), including expert-based vs automated NGF-MRD data analysis (**d**). In **a**, the comparison between NGF and conventional flow-MRD is shown for diagnostic and follow-up samples from patients with stable/progressive disease and partial response ($n=118$), while in **b** the two flow methods are specifically compared for follow-up samples from MM patients in VGPR and CR/sCR ($n=110$). (**d**) The correlation between expert-based vs automatic PC identification MRD levels in the same 110 BM samples as those of **b**. In turn, **c** shows the correlation between NGS and NGF MRD levels for those 27 (low level) MRD samples analyzed by both methods. *Samples proven polyclonal by Cy Ig κ/λ staining (2/2 and 2/3 in **a** and **b**, respectively). †Samples positive by NGS at the limit of quantitation of the technique. White and black circles in **b** and **d** represent NGF MRD levels below and above the limit of quantitation of the technique, respectively.

vs FACS-lyse protocols) associated with similar numbers ($P > 0.05$) of cell doublets (Supplementary Figure 2B). Of note, detailed analysis of the specific recovery of the major leukocyte populations (that is, eosinophils, neutrophils, monocytes, mature lymphocytes and nucleated red cells) as well as of nPC and aPC showed no significant differences between the conditions evaluated ($P > 0.05$), except for higher nPC percentages for the bulk-lysis protocol B1 (Supplementary Figures 2C and D). Therefore, the bulk-lysis procedure including a FACS-lysing-fixation step and 0.5% bovine serum albumin (protocol A1 in Supplementary Figure 2) was selected as the reference SOP and used to further titrate the individual antibody reagents selected, for staining of $\geq 10^7$ cells/tube (Supplementary Table 5).

Validation of the EuroFlow-based NGF MM-MRD method

The final NGF MM-MRD approach described above was validated against conventional 8-color flow-MRD in 228 MM BM samples studied at diagnosis ($n=66$) or after therapy ($n=162$), particularly focusing on 110 BM samples from patients in VGPR or CR/sCR. A strong correlation was found between both methods in diagnostic and follow-up samples with relatively high tumor burden from patients in partial response, stable disease and progressive disease ($\rho=0.96$; $P < 0.001$; Figure 2a). Most importantly, a fairly good overall correlation was also observed among cases in VGPR and CR/sCR ($\rho=0.77$; $P < 0.001$; Figure 2b), albeit significantly different rates of MRD⁺ samples were detected with both methods: 37/110 (34%) for conventional flow-MRD vs 52/110 (47%) for EuroFlow-NGF, respectively ($P=0.003$; Figure 2b). This was due to a relatively

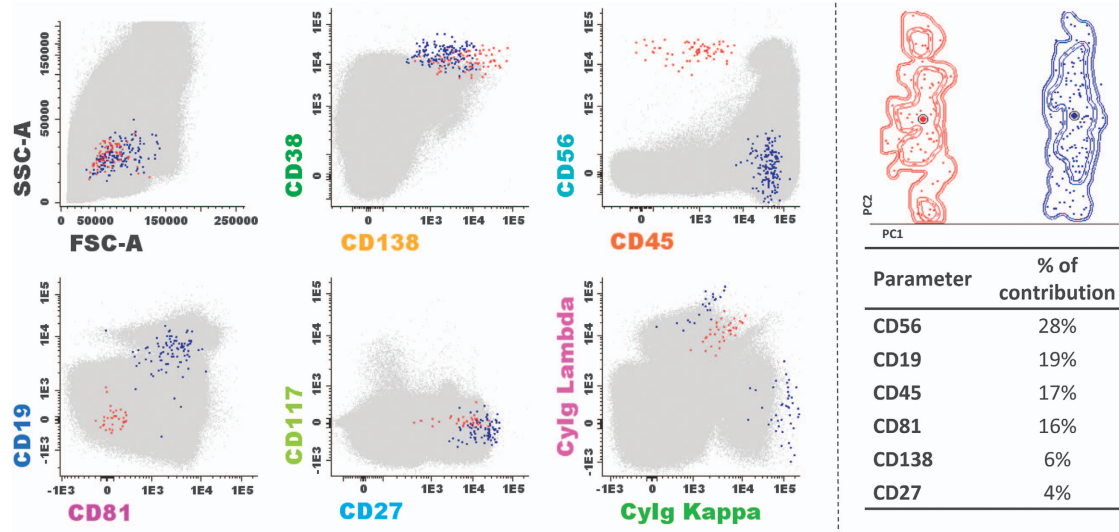


Figure 3. Illustrating graphical representations of the performance of the NGF method based on the analysis of (merged) data files corresponding to a BM MM sample ($> 10^7$ cells) with low level MRD stained with the NGF-MM MRD panel (Version 5). Left panels show classical bivariate dot plot representations in which PC (blue and red dots) were gated using a conventional manual analysis strategy. nPC (blue dots) display characteristic normal patterns of expression for the surface membrane markers used, with a cytoplasmic (Cy) Ig κ vs Cylg λ ratio of 1.6. In contrast, clonal/aberrant PC (red dots) can be clearly discriminated from nPC based on their more homogeneous phenotypic profile, the presence of myeloma-associated phenotypes (CD138^{hi}, CD38^{dim}, CD19⁻, CD81⁻, CD117⁻ and CD27^{dim}) and a restricted pattern of expression of Cylg λ . Other non-PC BM populations are depicted as gray dots. In turn, the top right panel shows the results of principal component analysis –automatic population separator 1 (APS1) view of principal component 1 (PC1) vs PC2— demonstrating a clearly different overall immunophenotypic profile of normal and aPCs in this sample. In this later plot, circles represent median values for all phenotypic parameters measured in the two tubes but Cylgs, while inner (dotted) and outer (solid) lines represent the first and second s.d. of the distribution of the PC events in the multidimensional space, respectively. The table in the right illustrates the top 6 parameters contributing to the separation between nPC and aPC in the above PC1 vs PC2 plot and their percentage contribution to the separation. Please note that, in this sample, PC corresponded to 0.005% of all nucleated BM cells; in turn, aberrant PC (127 PC events) corresponded to 0.001% of the whole BM cellularity with an assay sensitivity (in the quantitative range) of $< 5 \times 10^{-6}$.

high number of discrepant cases, which were mostly MRD⁺ by EuroFlow-NGF but MRD⁻ by conventional flow: 18/21 (86%) vs 3/21 (14%) discrepant samples, respectively. Of note, such discrepant NGF⁺ cases typically showed MRD levels $< 10^{-4}$ by EuroFlow-NGF with median (range) MRD levels of 0.001% (0.0001–0.03%) vs 0.02% (0.0008–1.79%) for MRD⁺ cases by both methods ($P < 0.001$; Figures 2b and 3). Interestingly, in three MRD⁻ cases by EuroFlow-NGF, MRD⁺ results at relatively high levels (median of 0.01%; range: 0.006–0.02%) were observed by conventional MRD-flow (Table 2). Evaluation of cytoplasmic κ/λ expression in the suspicious PC from these three patients by EuroFlow-NGF, demonstrated the polyclonal nature of the suspected aPC in 2/3 cases, indicating false-positivity in conventional flow-MRD; in contrast, no clear explanation was found for the discrepant results observed in the other patient. Overall, the frequency of aberrant expression profiles for individual markers on clonal PC by NGF, was as follows: CD45, 96%; CD19, 96%; CD56, 96%; CD27, 89%; CD81, 79%; CD38, 77%; CD117, 48% and CD138, 37%. In 8/52 MRD⁺ cases confirmation of light chain restriction among small numbers of suspicious PC carrying slightly aberrant phenotypes was required. No significant differences were observed in the validation phase between the participating centers with respect to rate and type of MRD discrepant cases ($P = 0.63$). Importantly, in all but 7/110 cases, $> 7 \times 10^6$ cells were evaluated (median 10.4×10^6 cells) with an impact on the sensitivity of the method because of not reaching the LOD in only 2 cases (1.8%). Interestingly, an alarm for decreased percentage of CD117^{hi} mast cells ($\leq 0.002\%$) suggesting blood contamination, was observed in 17/110 samples, 11/17 MRD⁻ and 6/17 MRD⁺ samples (Table 3).

Automatic identification and enumeration of aPCs showed an excellent correlation with expert-based gating, also in VGPR and

CR/sCR cases ($\rho = 0.96$; $P < 0.001$; Figure 2d). However, due to the minimum number of events required by the software algorithm, aPC were not identified in 3/110 cases (2.7%) with low MRD levels by NGF (and MRD⁻ by conventional flow-MRD) –median % aPC (range): 0.0006% (0.0001–0.005%; Figure 2d)–.

Parallel assessment of MRD by NGF and NGS in a subset of 31 samples showed a higher applicability for the EuroFlow-NGF approach: 31/31 (100%) vs 27/31 (87%) cases, respectively ($P < 0.001$). Among those 27 cases assessed by both methods (22 of them with MRD levels $\leq 10^{-4}$), a good correlation was found between the percentage of residual aPC by NGF and NGS ($\rho = 0.62$; $P = 0.001$; Figure 2c). However, NGF showed a higher sensitivity than NGS with 19/27 (70%) vs 14/27 (52%) MRD⁺ samples ($P = 0.06$) with higher MRD levels –mean percentage \pm s.d. MRD⁺ cells of $0.01 \pm 0.04\%$ vs $0.006 \pm 0.02\%$ ($P = 0.07$), respectively-. This was due to 7/27 discrepant cases including six MRD⁺ by NGF and MRD⁻ by NGS: median (range) percentage aPC of 0.001% (0.0002–0.07%) and one MRD⁺ by NGS (0.0004% aPC) and negative (LOD $< 0.0002\%$ aPC) by NGF (Figures 2c and 3). In fact, 8/27 samples (30%) were NGF-positive (quantifiable), but NGS-negative or (disproportionally) low positive.

From the prognostic point of view, MM patients who were MRD⁻ by NGF had a significantly ($P = 0.01$) longer PFS vs MRD⁺ cases –75% PFS not reached (NR) vs 10 months; Figure 4a–, including also those that were MRD⁺ by NGF and MRD⁻ by conventional 8-color flow (75% PFS of 10 months; Figure 4b); similar results were observed when the analysis was restricted to patients in CR/sCR ($P = 0.02$; 75% PFS NR vs 7 and 5 months, respectively; Figures 4c and d). Of note 2/6 patients who were MRD⁺ by NGF and MRD⁻ by NGS also showed disease progression, while the only NGF⁻/NGS⁺ discrepant patient remained in continuous CR after 14 months follow-up.

DISCUSSION

MRD detection in BM has proven clinically meaningful for MM monitoring after therapy, particularly to predict outcome of patients that reach CR^{12–16,29} independently of therapy.^{22,53}

Currently, several different flow- and PCR-based MRD approaches are available.³⁰ Flow-MRD has clear advantages vs PCR-based methods because of its relative simplicity, high speed, greater clinical applicability and worldwide availability.^{16,25} However, major concerns have been recently raised about the lack of standardization of flow-MRD in MM³⁸ and its lower sensitivity vs PCR-based approaches, particularly NGS.^{25,29,53–55}

Here we describe an innovative EuroFlow-based high-sensitive, standardized and validated NGF-MRD method which can be applied to virtually every MM patient for MRD monitoring in BM after therapy. Overall, our results show a similar applicability but a significantly increased sensitivity for the novel EuroFlow-NGF approach vs conventional flow-MRD, with around one fourth of all MRD-negative samples by conventional flow becoming MRD-positive by NGF. To the best of our knowledge, this is the first time that a validated high-sensitive flow-MRD assay is described with a LOD close to 10⁻⁶ (ability to identify down to 20 tumor PCs among 10⁷ evaluated BM cells) and a limit of quantitation of < 5 × 10⁻⁶ (ability to accurately quantify tumor PC percentages at levels down to five cells per million cells, that is, 0.0005%), calculated following consensus recommendations.⁴² Importantly, the EuroFlow-NGF approach provided similar results in different centers, which further confirms the high standardization level of the method. From the clinical point of view, despite the (still) limited follow-up time, the NGF approach already showed a significant prognostic impact on PFS of MM patients, even among those in CR/sCR, significantly improving the predictive clinical value of conventional flow-MRD.

The greater sensitivity of NGF vs conventional flow-MRD was mostly due to the use of both an optimized combination of fluorochromes and antibody reagents for increased specificity at very low MRD levels, and the 10-fold increase in the number of cells evaluated, in the context of fully standardized laboratory protocols. The two-tube approach proposed also allows confirmation in a second independent measurement, of the clonal nature of suspicious (low numbers of) PC, through evaluation of the cytoplasmic κ/λ restriction of phenotypically aberrant PC which proved to be required in a significant number of cases. Interestingly, the phenotypic markers selected as most informative

Table 2. Distribution of aberrant (aPC) and normal (nPC) plasma cells in BM samples from MM patients in VGPR, CR and sCR with discrepant MRD results (MRD⁺ vs MRD⁻) by NGF vs conventional flow-MRD assays

Case ID	Disease status	Conventional flow			NGF		
		% tPC	% nPC	% aPC	% tPC	% nPCs	% aPC
1	CR	0.01	0.01	0	0.008	0.007	0.0004
2	CR	0.01	0.01	0	0.02	0.02	0.0002
3	CR	0.007	0.007	0	0.007	0.007	0.0003
4	CR	0.04	0.04	0	0.02	0.02	0.0004
5	sCR	0	0	0	0.003	0.002	0.0006
6	CR	0.1	0.1	0	0.1	0.1	0.002
7	CR	0.2	0.2	0	0.2	0.2	0.02
8	sCR	0	0	0	0.002	0.003	0.0002
9	CR	0.9	0.9	0	0.6	0.6	0.005
10	CR	0.2	0.2	0	0.06	0.06	0.0004
11	VGPR	0	0	0	0.01	0.01	0.0007
12	CR	0	0	0	0.01	0.01	0.006
13	sCR	0.2	0.2	0	0.2	0.2	0.005
14	sCR	0.03	0.03	0	0.03	0.03	0.002
15	CR	0.1	0.1	0	0.07	0.04	0.03
16	VGPR	0	0	0	0.009	0.008	0.001
17	CR	0.1	0	0	0.004	0.003	0.001
18	CR	0.04	0	0	0.01	0.01	0.0002
19	CR	0.09	0.08	0.01	0.05	0.05	0
20	CR	0.1	0.1	0.006	0.1	0.1	0
21	CR	0.4	0.3	0.02	0.3	0.3	0

Abbreviations: aPC, aberrant plasma cell; BM, bone marrow; CR, complete response; MM, multiple myeloma; MRD, minimal residual disease; NGF, next generation flow; nPC, normal plasma cell; sCR, stringent CR; tPC, total plasma cells; VGPR, very good partial response.

Table 3. Distribution of distinct BM-associated populations as identified by the NGF antibody combination (version 5) and percentages of MRD⁻ and MRD⁺ cases with decreased levels

BM-associated cell population (phenotype ^a)	Normal BM range (n = 16), hemodiluted BM cutoff	% of cases with low levels		NGF MRD ⁻ patients showing disease progression TOTAL	
		MRD ⁻	MRD ⁺	Case 1	Case 2
% Mast cells (CD117 ^{hi} , CD45 ⁺ , CD81 ^{dim} , CD38 ⁺ , SSC/FSC ^{int-hi})	0.006% (0.002–0.03%)	10%	5%	0.0017%	0.0006%
% NRBC (SSC/FSC ^{lo} , all markers ⁻)	6.4% (2–11.5%)	3%	1%	8%	5%
% CD19 ⁻ nPC (CD38 ^{hi} , CD138 ⁺ , CD45 ^{-/+} , CD56 ^{-/+} , CD81 ^{-/+} , CD27 ⁺ , FSC/SSC ^{int})	0.05% (0.003–0.2%)	14%	14%	0.0038%	0.0036%
% CD27 ⁺ B Cell precursors (CD19 ⁺ ; CD38 ⁺⁺ , CD45 ^{dim} , CD81 ⁺⁺ , CD27 ⁺ , CyIg ⁻ , FSC/SSC ^{lo})	0.08% (0.004–0.4%)	12%	11%	0.0001%	0.003%
% CD27 ⁻ B Cell precursors (CD19 ⁺ ; CD38 ⁺⁺ , CD45 ^{dim} , CD81 ⁺⁺ , CD27 ⁻ , CyIg ⁻ , FSC/SSC ^{lo})	0.4% (0.05–2.2%)	11%	13%	0.001%	0.01
% Mature B cells (CD19 ⁺ ; CD38 ⁺ , CD45 ^{dim/+} , CD81 ⁺ , CD27 ^{-/+} , CyIg ⁺ , FSC/SSC ^{lo})	1.6% (0.6–3.5%)	26%	23%	0.1%	0.1%
% Myeloid precursors (CD117 ⁺ , CD45 ^{dim} , CD38 ^{dim/+} ; CD81 ⁺ , SSC/FSC ^{int})	1.8% (0.2–3.6%)	8%	8%	0.3%	0.3%
% Endothelial and mesenchymal cells (CD81 ^{hi} , CD45 ⁻ , SSC/FSC ^{int/hi})	0.01% (0.0005–0.08%)	1%	0%	0.02%	0.02%

Abbreviations: BM, bone marrow; FSC, forward scatter; MRD, minimal residual disease; NGF, next generation flow; nPC, normal plasma cells; NRBC, nucleated red blood cells; SSC, sideward scatter. ^aMarkers used in the gating strategy.

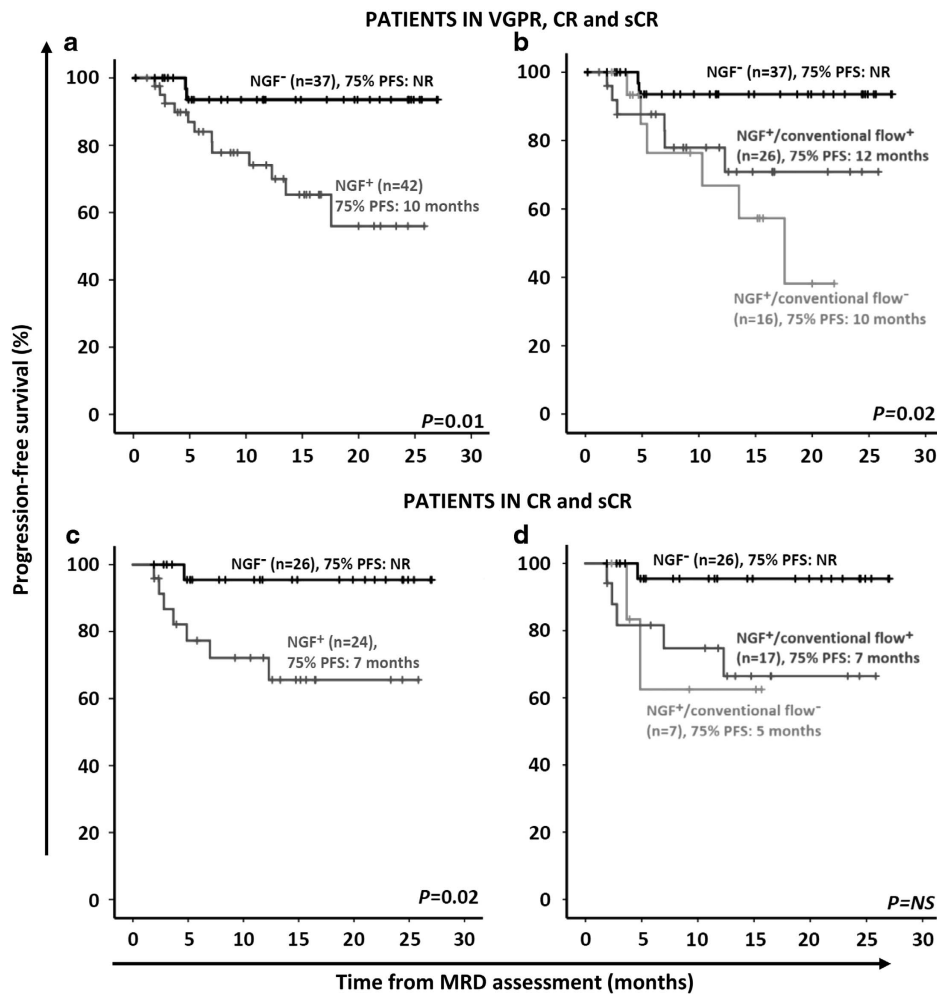


Figure 4. PFS curves of MM patients grouped according to their BM MRD status as assessed by NGF (**a, c**) and both NGF and conventional flow-MRD (**b, d**). In **a** and **b** the impact of the MRD status is shown for MM patients in VGPR, CR and sCR ($n = 79$), while in **c** and **d**, PFS analyses was restricted to MM patients who were in CR and sCR at the moment of MRD assessment ($n = 50$).

did not differ from those considered to be essential by expert consensus.^{40,41,48} However, we proved here that selection of optimal fluorochrome-conjugated antibody clones per marker could not be predicted by pre-existing (shared) expertise. Thus, identification of the optimal marker combinations for the 2-tube 8-color antibody panel required five rounds of optimization of what we already considered initially to be a potentially 'optimal' panel (that is, Version 1). Major limitations of suboptimal reagents were: (i) increased non-specific and background fluorescence; (ii) too dim fluorescence intensity; (iii) specific interactions among mixed reagents and/or; (iv) suboptimal staining or reduced reactivity on nPC vs aPCs, particularly on Daratumumab-treated vs non-treated patients. Altogether, these results indicate that (extensive) prospective testing is mandatory to define optimal combinations of reagents for flow-MRD monitoring in MM, due to the problems encountered and the significantly different staining profiles obtained with distinct combinations of reagents of the same CD markers. As an example, only two of the many ($n=9$) CD38 antibody clones evaluated proved efficient for detecting CD38 on PC from Daratumumab-treated MM patients (Supplementary Figure 1); even more, only one of these two clones proved to be effective for detecting CD38 on MM PC treated *in vitro* with the Isatuximab antibody (Supplementary Figure 1).

Although the specific combination(s) of markers used is a key factor for optimal identification of BM PC and discrimination

between nPC and aPC, another critical factor in building a sensitive flow-MRD technique is the number of cells analyzed.^{42,56} To the best of our knowledge, this is the first report in which consistently $>5 \times 10^6$ cells/patient sample (usually $>10^7$ cells) were investigated. For the most frequently used stain-lyse-and-then-wash sample preparation flow-MRD procedures, hundred thousand to 1–2 million cells in $\leq 300 \mu\text{l}$ BM are analyzed. In contrast, the here described EuroFlow SOP assured acquisition of $>10^7$ events in most MM BM MRD samples, by means of staining a median of 1.5 ml of total BM sample, with a proven limit of quantitation for the NGF MRD method of $<5 \times 10^{-6}$ and a LOD of <2 cells per million. These features contribute to explain the higher sensitivity of EuroFlow-based NGF vs conventional flow-MRD, and NGS. The relatively high frequency of discrepant results (30%) in the NGF vs NGS comparison among cases with low ($<10^{-4}$) MRD levels, might be caused by suboptimal annealing of the NGS-PCR primers due to high levels of somatic hypermutations in the *IG* genes of nPC and aPC,^{16,32,34} and deserves further investigation.

Independently of its potentially greater sensitivity, NGF has other additional advantages over NGS:³⁷ it is faster (<4 h), standardized and reproducible, it has a greater applicability ($\geq 98\%$), and it does not require a diagnostic sample or patient-specific probes, which potentially lead to a lower variability in the sensitivity reached per patient.¹⁶ However, EuroFlow-based NGF required fresh material analyzed within 24 h after sampling; this is

feasible in virtually all countries, since the standardized EuroFlow procedures have now been implemented worldwide. In addition, the costs of the NGF reagents (~100 USD) and assay (~350 USD), are estimated to be lower than those of NGS (~350 USD and 700 USD, respectively).¹⁶

Importantly, NGF can also provide an overall assessment of the quality of the patient sample through identification of a significant decrease in non-PC BM cell populations (for example, CD117^{hi} mast cells, CD45⁻ sideward-scatter^{lo} nucleated red blood cells, CD117⁺ myeloid precursors, CD19⁺CD38^{hi}CD45^{lo} B-cell precursors and CD19⁻ nPC) in hemodiluted BM samples (Table 3) and through providing full insight in the normal B-cell compartment via the identification of normal BM residual B-cell precursors (CD19⁺CD38^{hi}CD45^{lo} and CD45^{int}), immature B-lymphocytes (CD19⁺CD45^{hi}CD38^{lo}), naive B cells (CD19⁺CD38⁻CD27⁺), memory B-lymphocytes (CD19⁺CD38⁻CD27⁺), and nPC (CD19⁺CD56⁻, CD19⁻CD56⁻ and CD19⁻CD56^{lo}) in addition to myeloma PC (Supplementary Figure 3). Of note, decreased numbers of mast cells were found in 17/110 ≥VGPR BM samples, particularly among MRD⁻ cases, including the only two patients that showed disease progression (Table 3), pointing out the need for careful evaluation of MRD⁻ cases for blood contamination. Whether evaluation of an additional sample from the same patient is required in the such cases, still remains to be established.

The relatively short time needed for the complete EuroFlow-NGF procedure (< 4 h) can be further reduced by implementing automatic sample preparation procedures, pre-mixed and dried antibody cocktails, and software algorithms for automatic data analysis. Such improvements are ongoing and will further contribute to prevent diagnostic errors.

A major challenge we faced during the design phase was to determine whether the 2-tube 8-color NGF approach could be replaced by a single 10-color tube to decrease reagent costs and data acquisition time, as suggested by others.⁵⁷ Direct comparison of Version 5 of the two 8-color tube antibody panel vs three different versions of a single 10-color antibody combination (Supplementary text) showed quite comparable results for both formats. However, the 2-tube 8-color method emerged as a more robust assay because (i) higher numbers of cells were measured; (ii) the confirmatory value of the second tube in case of small populations of suspicious PC found in the first tube; and (iii) the increased consistency and precision of replicate vs single measurements.

In summary, here we describe a novel validated EuroFlow-NGF assay for high-sensitive, fast and standardized quantification of MRD in MM that overcomes previous limitations of conventional flow-MRD approaches and improves prediction of patient outcome. This method is ready-to-use and well-suited for implementation in clinical trials to establish the diagnostic role of MRD in MM.

CONFLICT OF INTEREST

G-EG and RF are employees of Cytognos SL, Salamanca, Spain. JJMvd received research support and traveling support from Roche, Amgen and Becton Dickinson. SB received research support from Roche, Celgene, Becton Dickinson and AbbVie as well as honoraria from Roche and AbbVie. JF-M, LS-F, OG-S, J-JP-M, AC-M, CJ, JM-L, M-VM, VvdV, JC, LS, NP, M-BV, RGS, MG, RP, M-CdC, JB, J-JL, CA, AB, AG-M, JL, PL, CA-S, JS-M, BD and AO declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the International Myeloma Foundation-Black Swan Research Initiative, the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC); grant SA079U14 from the Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain and; grant DTS15/00119 from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain.

REFERENCES

- Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, Palumbo A, Mateos MV, Orłowski R *et al*. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 2014; **28**: 525–542.
- Bianchi G, Richardson PG, Anderson KC. Promising therapies in multiple myeloma. *Blood* 2015; **126**: 300–310.
- Lonial S, Durie B, Palumbo A, San-Miguel J. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma: current status and future perspectives. *Leukemia* 2016; **30**: 526–535.
- Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2016; **91**: 101–119.
- Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, Rosinol L, Sureda A, de la Rubia J *et al*. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 5775–5782.
- Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosinol L, Blade J, Lahuerta JJ, Cavo M *et al*. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 3279–3287.
- Usmani SZ, Crowley J, Hoering A, Mitchell A, Waheed S, Nair B *et al*. Improvement in long-term outcomes with successive total therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? *Leukemia* 2013; **27**: 226–232.
- Palumbo A, Bringhen S, Larocca A, Rossi D, Di Raimondo F, Magarotto V *et al*. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: updated follow-up and improved survival. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 634–640.
- Mateos MV, Leleu X, Palumbo A, San Miguel JF. Initial treatment of transplant-ineligible patients in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 2014; **7**: 67–77.
- Rollig C, Knop S, Bornhauser M. Multiple myeloma. *Lancet* 2015; **385**: 2197–2208.
- Mateos MV, Ocio EM, Paiva B, Rosinol L, Martínez-López J, Blade J *et al*. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev* 2015; **29**: 387–403.
- Fulciniti M, Munshi NC, Martínez-López J. Deep response in multiple myeloma: a critical review. *BioMed Res Int* 2015; **2015**: Article ID 832049.
- Lonial S, Anderson KC. Association of response endpoints with survival outcomes in multiple myeloma. *Leukemia* 2014; **28**: 258–268.
- Gay F, Larocca A, Wijermans P, Cavallo F, Rossi D, Schaafsma R *et al*. Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood* 2011; **117**: 3025–3031.
- Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, Epstein J, Morgan GJ, Crowley J. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* 2014; **124**: 3043–3051.
- Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood* 2015; **125**: 3059–3068.
- Paiva B, Gutiérrez NC, Rosinol L, Vidriales MB, Montalbán MA, Martínez-López J *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; **119**: 687–691.
- Paiva B, Martínez-López J, Vidriales MB, Mateos MV, Montalbán MA, Fernandez-Redondo E *et al*. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 1627–1633.
- Paiva B, Montalbán MA, Puig N, Cordon L, Martínez-López J, Ocio EM *et al*. Clinical significance of sensitive Flow-MRD monitoring in elderly multiple myeloma patients on the Pethema/GEM2010MAS65 Trial. *Blood* 2014; **124**: 3390.
- Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, Davies FE, Gregory WM, Bell SE *et al*. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 2540–2547.
- 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; **100**: 3095–3100.
- Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, Davies FE, Bell SE, Drayson MT *et al*. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* 2015; **125**: 1932–1935.
- Robillard N, Bene MC, Moreau P, Wuilleme S. A single-tube multiparameter seven-colour flow cytometry strategy for the detection of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2013; **3**: e134.

- 24 Paiva B, Cedena MT, Puig N, Arana P, Vidriales MB, Cordon L et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood* 2016; **127**: 3165–3174.
- 25 Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martinez J, Paiva B, Garcia H et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* 2014; **28**: 391–397.
- 26 Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Martinez J, Mateo G, Martinez P et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005; **90**: 1365–1372.
- 27 Ladetto M, Donovan JW, Harig S, Trojan A, Poor C, Schlossnan R et al. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; **6**: 241–253.
- 28 Puig N, Sarasquete ME, Alcoceba M, Balanzategui A, Chillon MC, Sebastian E et al. Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2012; **89**: 328–335.
- 29 Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, Gonzalez M, Barrio S, Ayala R et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014; **123**: 3073–3079.
- 30 Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, Lendvai N, Hassoun H, Stetler-Stevenson M et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; **12**: 286–295.
- 31 Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; **17**: e328–e346.
- 32 van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
- 33 Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 2014; **28**: 1299–1307.
- 34 Bai Y, Wong KY, Fung TK, Chim CS. High applicability of ASO-RQPCR for detection of minimal residual disease in multiple myeloma by entirely patient-specific primers/probes. *J Hematol Oncol* 2016; **9**: 107.
- 35 Martinez-Lopez J, Fernandez-Redondo E, Garcia-Sanz R, Montalban MA, Martinez-Sanchez P, Pavia B et al. Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study. *Br J Haematol* 2013; **163**: 581–589.
- 36 Rawstron AC, de Tute RM, Houghton J, Owen RG. Measuring disease levels in myeloma using flow cytometry in combination with other laboratory techniques: lessons from the past 20 years at the Leeds haematological malignancy diagnostic service. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; **90**: 54–60.
- 37 van Dongen JJ, van der Velden VH, Bruggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; **125**: 3996–4009.
- 38 Flanders A, Stetler-Stevenson M, Landgren O. Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity. *Blood* 2013; **122**: 1088–1089.
- 39 Salem D, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Landgren O. Myeloma minimal residual disease testing in the United States: evidence of improved standardization. *Am J Hematol* 2016; **91**: E502–E503.
- 40 Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; **90**: 26–30.
- 41 Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdickova L, Brooimans RA, Bumbea H et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; **93**: 431–438.
- 42 Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; **90**: 31–39.
- 43 Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, Lecrevisse Q, Almeida J, van Dongen JJ et al. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A* 2008; **73**: 834–846.
- 44 Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; **26**: 1986–2010.
- 45 van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; **26**: 1908–1975.
- 46 Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJ, Orfao A, EuroFlow C. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol* 2013; **31**: 415–425.
- 47 Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A* 2004; **62**: 169–173.
- 48 Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Perez JJ, Bottcher S, Wind H et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; **90**: 61–72.
- 49 Orfao De Matos Correia e Vale A, Sobral da Costa E, Pedreira CE. Method for the multidimensional detection of aberrant phenotypes in neoplastic cells to be used to monitor minimal disease levels using flow cytometry, European patent 1724581B1 (2014).
- 50 Orfao De Matos A, Pedreira CE, Sobral Da Costa E. Generation of flow cytometry datafiles with a potentially infinite number of dimensions derived from the fusion of a group of separate flow cytometry datafiles and their multidimensional reconstruction with both actually measured and estimated flow cytometry data, European patent EP1770387B1 (2011).
- 51 Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J et al. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A* 2008; **73A**: 1141–1150.
- 52 Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Perez JJ, Puig N, Paiva B et al. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; **90**: 91–100.
- 53 Paiva B, Puig N, Garcia-Sanz R, San Miguel JF. Is this the time to introduce minimal residual disease in multiple myeloma clinical practice?. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 2001–2008.
- 54 Rawstron AC, Paiva B, Stetler-Stevenson M. Assessment of minimal residual disease in myeloma and the need for a consensus approach. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; **90**: 21–25.
- 55 Silvennoinen R, Lundan T, Kairisto V, Pelliniemi TT, Putkonen M, Anttila P et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2014; **4**: e250.
- 56 Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; **90**: 47–53.
- 57 Royston DJ, Gao Q, Nguyen N, Maslak P, Dogan A, Roshal M. Single-Tube 10-fluorochrome analysis for efficient flow cytometric evaluation of minimal residual disease in plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2016; **146**: 41–49.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© The Author(s) 2017

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

ARTÍCULO 2

“Utilidad clínica de la citometría de flujo de nueva generación como técnica mínimamente invasiva para la detección de células plasmáticas tumorales circulantes en la sangre de pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto y mieloma múltiple al diagnóstico”

Luzalba Sanoja Flores*, Juan Flores-Montero^{*1}, Juan José Garcés^{2*}, Bruno Paiva^{2*}, Noemi Puig³, Aránzazu García-Mateo⁴, Omar García-Sánchez³, Alba Corral-Mateos¹, Leire Burgos², Elena Blanco¹, José Hernández-Martín⁴, Roberia Pontes⁵, María Diez-Campelo³, Pamela Millacoy⁶, Paula Rodríguez-Otero², Felipe Prosper², Juana Merino², María-Belén Vidriales³, Ramón García-Sanz³, Alfonso Romero⁷, Luis Palomera⁸, Rafael Ríos-Tamayo⁹, Martín Pérez-Andrés¹, Juan F. Blanco¹⁰, Marcos González³, Jacques J.M van Dongen¹¹, Brian Durie¹², María-Victoria Mateos³, Jesús San-Miguel² y Alberto Orfao¹ en nombre del Consorcio EuroFlow.

*Estos autores han contribuido de igual manera a este trabajo y por tanto cada uno de ellos debe ser considerado como primer autor.

¹. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL); Servicio General de Citometría (NUCLEUS) y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, Instituto Carlos III, Madrid, España. CIBER-ONC número CB16/12/00400.

². Clínica Universidad de Navarra; Centro de Investigación de Medicina Aplicada (CIMA), IDISNA, Pamplona, España (UNAV). CIBER-ONC número CB16/12/00369 y CB16/12/00489.

³. Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, España. CIBER-ONC número CB16/12/00233.

⁴. Servicio de Hematología, Hospital de Segovia, Segovia, España.

⁵. Servicio de Pediatría, Instituto de Pediatría y Puericultura, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Brasil.

⁶. Servicio de Hematología, Centro Hospitalario de Navarra, Pamplona, España.

⁷. Centro de Atención Primaria Miguel Armijo, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Salamanca, España.

⁸. Servicio de Hematología, Hospital Lozano Blesa, Zaragoza, España.

⁹. Servicio de Hematología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, España.

¹⁰. Servicio de traumatología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, España.

¹¹. Departamento de Inmunohematología y Hemoterapia, Centro Médico Universitario de Leiden, Leiden, Países Bajos.

¹². Centro del Cáncer Cedars-Sinai Samuel Oschin, Los Angeles, Estados Unidos.

Blood Cancer Journal (2018), 8:117

DOI: 10.1038/s41408-018-0153-9.

La información suplementaria correspondiente a este trabajo y citada en el mismo está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo II y en el disco compacto disponibles al final de la memoria de esta tesis doctoral.

Introducción. Varios estudios han puesto de manifiesto la asociación que existe entre la presencia de células plasmáticas tumorales circulantes (CPTC) en sangre de pacientes con neoplasias de células plasmáticas (CP) y un peor pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, en estos trabajos la frecuencia de pacientes con CPTC es muy variable, dependiendo en gran medida del nivel de sensibilidad de la técnica empleada para su detección. Hasta la fecha, se desconoce cuál es exactamente la frecuencia de CPTC en pacientes con distintos subtipos diagnósticos de neoplasias de CP cuando se emplea la citometría de flujo de nueva generación para su identificación, así como el posible impacto pronóstico que supone tal hallazgo al diagnóstico en estas entidades.

Objetivo. En este trabajo nos propusimos explorar por primera vez, la utilidad de la citometría de flujo de nueva generación para la detección de CPTC al diagnóstico, en muestras de sangre de pacientes con distintos subtipos de neoplasias de CP, con el fin de determinar la frecuencia de casos positivos, los niveles de CPTC y su potencial impacto en el pronóstico de estas enfermedades.

Materiales y métodos. Para abordar los objetivos antes planteados, analizamos un total de 508 muestras pareadas de sangre periférica (n=264) y médula ósea (MO; n=244) procedentes de 264 pacientes con neoplasias de CP al diagnóstico, incluyendo casos que mostraban un compromiso sistémico de la enfermedad, como la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), el mieloma quiescente (MMQ) o el mieloma activo (MM), y otros con neoplasias de tipo localizado, como el plasmocitoma solitario o el MM macrofocal. En paralelo, analizamos 71 muestras de sangre periférica y 12 de médula ósea (MO) de donantes sanos, dentro de un rango de edad similar a la de los pacientes incluidos en el estudio. A su vez, correlacionamos los resultados del análisis inmunofenotípico de la presencia y número de CPTC mediante la técnica de citometría de flujo de nueva generación recientemente desarrollada, con distintos subgrupos diagnósticos y pronósticos de la enfermedad (según los sistemas de estratificación de riesgo comúnmente usados en la actualidad), así como con la infiltración tumoral en muestras pareadas de MO.

Resultados. En términos generales, la citometría de flujo de nueva generación demostró la presencia de CPTC en la sangre periférica al diagnóstico de todos los pacientes con MM activo (68/68; 100%) y MMQ (28/28; 100%), y en más de la mitad de los pacientes con GMSI (88/150; 59%). Por el contrario, solo una pequeña proporción de los enfermos con plasmocitoma solitario (3/17; 18%) mostraron CPTC en sangre al diagnóstico. Además, el número de CPTC en sangre

aumentaba de forma progresiva desde los pacientes que presentaban tumores localizados de CP -plasmocitoma solitario y MM macrofocal-, hasta la GMSI, el MMQ y el MM activo ($p < 0,0001$). Así mismo, los pacientes clasificados en subgrupos de mayor riesgo de progresión según los estándares actuales de estratificación pronóstica para GMSI y MM, presentaron niveles más elevados de CPTC en sangre que los pacientes que, teniendo la misma enfermedad, mostraban bajo riesgo ($p < 0,05$). En este sentido, observamos también una correlación directa (no lineal) entre la presencia de un elevado número de CPTC y un mayor grado de infiltración medular por CP tumorales ($p = 0,78$; $p < 0,001$). Desde el punto de vista pronóstico, niveles más elevados de CPTC en sangre se asociaron con una menor supervivencia libre de progresión entre los pacientes diagnosticados de GMSI y de MM ($p < 0,0001$), así como con tasas de supervivencia global significativamente inferiores ($p \leq 0,03$) en este último grupo de pacientes. Especial, destaque merece el hecho de que las CPTC mostraron un perfil inmunofenotípico más inmaduro que su contrapartida medular, lo cual apoya el posible papel que pudieran tener las CP tumorales de sangre periférica en la diseminación de la enfermedad, tanto a nivel de MO como en órganos extramedulares.

Conclusiones. Nuestros hallazgos demuestran que la citometría de flujo de nueva generación constituye uno de los métodos más sensibles para la detección de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP al diagnóstico, reflejando la existencia de enfermedad diseminada asociada con un comportamiento clínico más agresivo y un pronóstico adverso, especialmente entre los pacientes diagnosticados de GMSI y MM.

ARTICLE

Open Access

Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC)

L. Sanoja-Flores^{1,2}, J. Flores-Montero^{1,2}, J. J. Garcés³, B. Paiva³, N. Puig⁴, A. García-Mateo⁵, O. García-Sánchez⁴, A. Corral-Mateos^{1,2}, L. Burgos³, E. Blanco^{1,2}, J. Hernández-Martín⁵, R. Pontes⁶, M. Díez-Campelo⁴, P. Millacoy⁷, P. Rodríguez-Otero³, F. Prosper³, J. Merino³, M. B. Vidriales⁴, R. García-Sanz⁴, A. Romero⁸, L. Palomera⁹, R. Ríos-Tamayo¹⁰, M. Pérez-Andrés^{1,2}, J. F. Blanco¹¹, M. González⁴, J. J. M. van Dongen¹², B. Durie¹³, M. V. Mateos⁴, J. San-Miguel³ and A. Orfao^{1,2}, on behalf of the EuroFlow consortium

Abstract

Here, we investigated for the first time the frequency and number of circulating tumor plasma cells (CTPC) in peripheral blood (PB) of newly diagnosed patients with localized and systemic plasma cell neoplasms (PCN) using next-generation flow cytometry (NGF) and correlated our findings with the distinct diagnostic and prognostic categories of the disease. Overall, 508 samples from 264 newly diagnosed PCN patients, were studied. CTPC were detected in PB of all active multiple myeloma (MM; 100%), and smoldering MM (SMM) patients (100%), and in more than half (59%) monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) cases ($p < 0.0001$); in contrast, CTPC were present in a small fraction of solitary plasmacytoma patients (18%). Higher numbers of CTPC in PB were associated with higher levels of BM infiltration and more adverse prognostic features, together with shorter time to progression from MGUS to MM ($p < 0.0001$) and a shorter survival in MM patients with active disease requiring treatment ($p \leq 0.03$). In summary, the presence of CTPC in PB as assessed by NGF at diagnosis, emerges as a hallmark of disseminated PCN, higher numbers of PB CTPC being strongly associated with a malignant disease behavior and a poorer outcome of both MGUS and MM.

Introduction

Plasma cell neoplasms (PCN) are a heterogeneous group of diseases characterized by the clonal expansion of terminally-differentiated plasma cells (PC)^{1–4}. Whereas

monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM) represent pre-malignant phases of the disease with progressively higher degree of bone marrow (BM) involvement and relatively low rates of malignant transformation (i.e., 1 and 10% per year, respectively^{5–7}), multiple myeloma (MM) is an active malignancy usually associated with end-organ damage requiring therapy, and potential for transformation into PC leukemia (PCL)^{1,8,9}. In turn, solitary plasmacytoma (SP) consists of a localized accumulation of tumor (mono) clonal PC (TPC) in a specific tissue area, without evidence for systemic disease^{10,11}, but

Correspondence: A. Orfao (orfao@usal.es)

¹Cancer Research Center (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL); Cytometry Service (NUCLEUS) and Department of Medicine, University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer: CIBER-ONC number CB16/12/00400, Instituto Carlos III, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article.

These authors contributed equally: Sanoja-Flores L., Flores-Montero J., Garcés J., Paiva B.

© The Author(s) 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

a rate of transformation to MM of ~ 15%–50%, depending on the primary localization of the tumor (e.g., soft-tissue vs. bone plasmacytoma, respectively)^{12,13}.

Despite BM is the most frequently involved tissue in PCN^{9,14,15}, and a close interaction with the BM micro-environment is required for long-term persistence of normal plasma cells (NPC) and TPC^{16–18}, previous studies have recurrently shown involvement of peripheral blood (PB) in a substantial fraction of patients^{15,19–24}. However, the frequency of PB involvement depends on the sensitivity of the methods used and the specific diagnostic subtype of PCN^{15,19–23}. Thus, PB involvement by circulating TPC (CTPC) increases from MGUS -19 to 37%- to MM -50 to 75%-^{19,24–26}, and PCL (100%)^{8,27}, depending on whether immunocytochemistry or conventional 4–8-color flow cytometry are used, respectively.

Despite such variability and the relatively low sensitivity of the methods used so far, the presence of CTPC in PB of newly diagnosed MGUS and SMM patients has been associated with an increased risk of progression to MM^{20,21,25–29}, and within MM with an adverse outcome^{14,30}, both when evaluated at diagnosis and after therapy^{31–33}. Recently, a next-generation flow cytometry (NGF) approach has been established for high-sensitive minimal residual disease (MRD) monitoring in the BM of MM patients, after therapy^{34,35}. However, no study has investigated so far whether NGF also increases the frequency of detection of very low levels of PB involvement by CTPC in newly diagnosed PCN patients, and its potential prognostic impact.

Here, we investigated for the first time the frequency and number of CTPC in PB of 264 newly diagnosed patients with localized (i.e., SP) and systemic (i.e., MGUS, SMM, and MM) PCN using NGF³⁴, and correlated our findings with the distinct diagnostic and prognostic categories of the disease.

Patients and methods

Patients and samples

Overall, 508 samples -264 PB and 244 paired BM samples- from 264 patients (53% males and 47% females; median age of 69 years, ranging from 28 to 97 years) with newly diagnosed PCN, were studied. In parallel, 71 PB and 12 BM samples from sex- and age-matched healthy donors (HD) were also investigated. Patients were classified according to the International Myeloma Working Group (IMWG) criteria³⁶ into: 150 MGUS, 97 multiple myeloma patients (72 MM and 25 SMM) and, 17 SP patients (Supplemental Table 1). Four MM patients presented with >1 focal lesion associated with multiple osteolytic lesions (CRAB criteria) but minimal BM involvement by PC on cytomorphology (percentage of BMPC of 2%, 3%, 7%, and 17%, respectively) (Supplemental Table 2); hereafter, these four cases are referred to

as macrofocal MM (macrofocalMM)^{37–39}. MM and SMM that progressed to MM were both uniformly treated according to the Spanish PETHEMA protocols^{40,41}. Written informed consent was given by each individual prior to entering the study according to the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local ethics committees. All samples were received from the different participating centers (USAL/HUSA, UNAV, CAS, CHN, HULB, HVN) and centrally processed at either USAL or UNAV within 24 h after they had been collected. None of the samples received was inadequate for further staining and processing.

Risk-stratification of MGUS, SMM, and MM patients

MGUS patients were stratified by the Mayo Clinic index⁴² into: score 0, 52 cases; score 1, 54; score 2, 40; and score 3, 3 patients. Most MGUS patients (89%) showed < 95% TPC within the overall BMPC compartment⁴³. In turn, SMM patients were stratified into risk-groups by both the Mayo Clinic⁴² (score 0, 7 cases; score 1, 13; and, score 2, 5 patients) and the Spanish prognostic indices⁴³ (score 0, 2 patients; score 1, 8; and, score 2, 12 cases); due to the low number of cases, we grouped them into just two groups: standard/low (score 0–1) vs. high (score 2) risk cases. Finally, MM patients were classified by the Revised International Staging System (R-ISS)⁴⁴ into stage I ($n = 12$), stage II ($n = 29$), and stage III ($n = 24$) patients. In the remaining few cases, enough data was not available.

Immunophenotypic studies

PB (median volume: 5.1 mL; range: 2.1–12.8 mL) and BM-aspirated (100 μ L) samples were collected in tubes containing EDTA and processed using the EuroFlow bulk-lysis, surface membrane (Sm)-only and Sm-plus cytoplasmic (Cy) staining procedures³⁴. Overall, $\geq 10 \times 10^6$ PB and $\geq 1 \times 10^6$ BM cells/tube were stained with the 2-tube/8-color EuroFlow-IMF MM MRD antibody panel, as described elsewhere³⁴ (Supplemental Materials and Supplemental Table 3). Stained cells were measured in FACSCanto II flow cytometers -Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA- using the FASCDiva software (BD). The percentage of immunophenotypically NPC and TPC was calculated from both the whole sample cellularity and from the PB and BM PC compartments. In addition, PB absolute NPC and CTPC counts, were determined using a dual-platform approach⁴⁵. For flow cytometry data analysis, the *Infinicyt* software (version 2.0; Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used. Antigen expression levels were specifically evaluated for PB and BM TPC, and they were expressed as median fluorescence intensity values (MFI; arbitrary units scaled from 0 to 262,144). The limit of detection of the NGF approach used in both PB and BM was set at ≥ 20 tumor plasma cell events, following previously established criteria^{34,46}.

Statistical methods

For all statistical analyses the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 23; IBM, Armonk, NY) was used. To assess the statistical significance of differences observed between two or more than two groups, either the Mann–Whitney *U* (unpaired variables) or the Wilcoxon tests (paired variables), and the Kruskal–Wallis test were used, respectively. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was applied to define the most accurate cutoff value to discriminate between MGUS and MM cases, based on the absolute number of CTPC in PB. Correlation studies were performed using the (two-sided) Spearman's rho (ρ) for non-parametric paired data. The Kaplan–Meier method and either the (two-sided) log-rank or the post-hoc tests were used to plot and compare time to progression (TTP), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) curves between two or more than two groups, respectively. Progression was defined as transformation of MGUS into SMM or MM, and of SMM into MM. TTP, OS, and PFS were calculated as the time from diagnosis to disease progression, to death by any reason, and either to disease progression or death by any reason, respectively. Statistical significance was set at *p*-values < 0.05.

Results

Distribution of normal and tumor PC in PB

Most PCN patients -185/264 (70%)- showed CTPC in PB. The frequency of cases in which CTPC were detected in PB progressively increased ($p < 0.05$) from SP patients (18%) and macrofocalMM (25%), to MGUS (59%), and both SMM (100%) and MM (100%) cases (Fig. 1a). In parallel, progressively higher numbers ($p < 0.05$) of CTPC in PB were found from SP and macrofocalMM patients (median in both groups: <0.001 CTPC/ μ L) to MGUS (median: 0.008 CTPC/ μ L), SMM (median: 0.16 CTPC/ μ L) and MM (1.9 CTPC/ μ L)- (Fig. 1b and Supplemental Table 4).

In turn, NPC were detected in PB of all healthy donors (median: 1.9 NPC/ μ L) and, at lower ($p < 0.001$) numbers, also in all PCN patients (median: 1.0 NPC/ μ L). In more detail, significantly decreased NPC counts were found in PB of MGUS ($p < 0.001$) and SMM ($p = 0.01$), but not in SP, macrofocalMM and MM cases who had normal ($p > 0.05$ vs. HD) NPC levels (Fig. 1c and Supplemental Table 5). This altered distribution of PB CTPC and NPC translated into a progressively increased median percentage of CTPC within the whole PB PC compartment from SP and macrofocalMM (0%) to MGUS (0.8%), SMM (15.8%), and MM (47.9%) ($p < 0.05$; Fig. 1d and Supplemental Table 4).

Of note, a strong (non-linear) correlation was observed between the percentage of TPC from all BMPC and the absolute number of PB CTPC in paired (PB and BM)

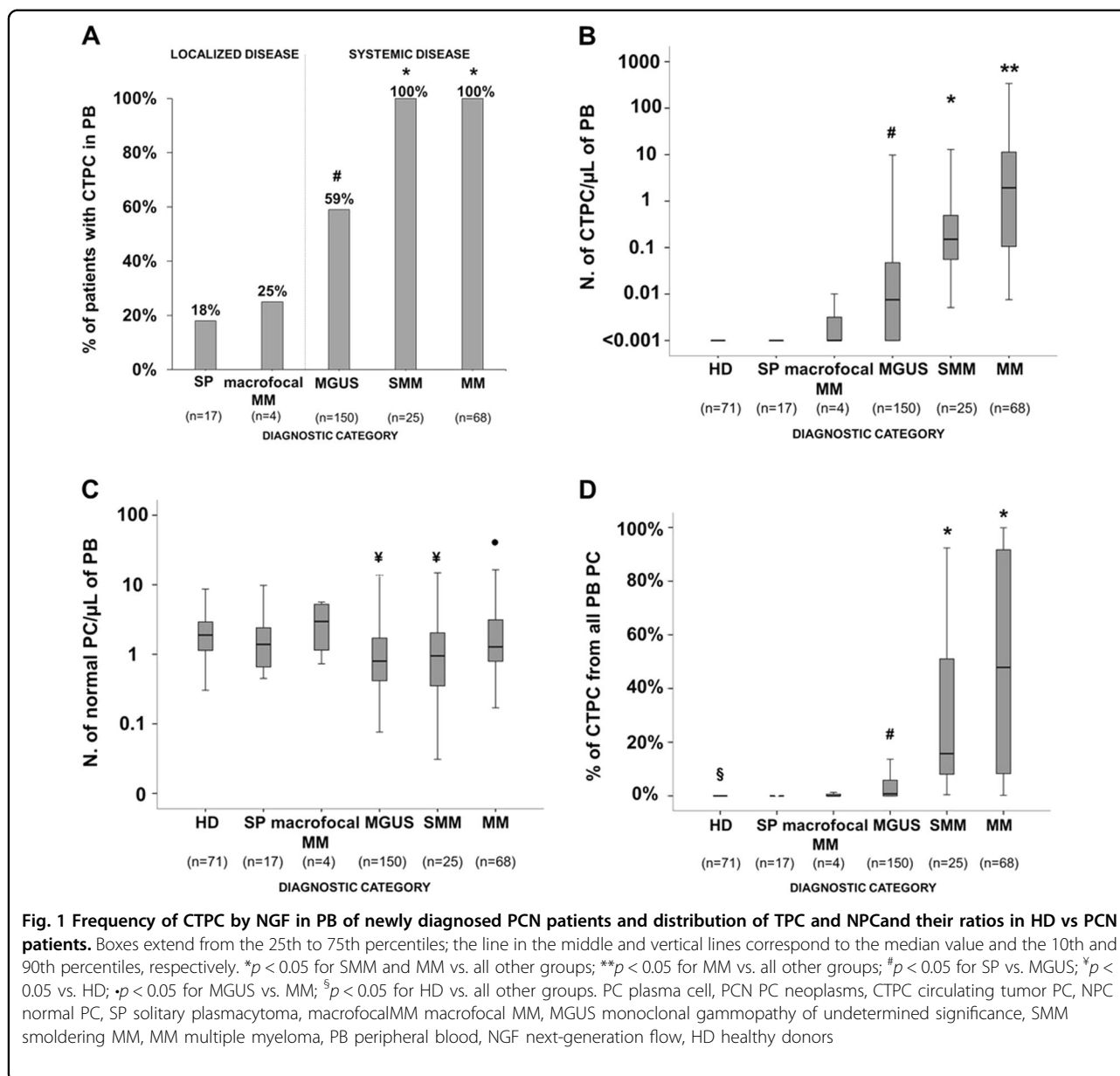
samples ($\rho = 0.78$; $p < 0.001$), TPC typically becoming detectable in PB when they represented $\geq 60\%$ of the whole BMPC compartment (Fig. 2a). Of note, such correlation remained significant even when patients with localized disease (SP and macrofocalMM) ($\rho = 0.54$, $p = 0.02$), MGUS ($\rho = 0.64$, $p < 0.0001$), SMM ($\rho = 0.51$, $p = 0.02$) and MM ($\rho = 0.55$, $p < 0.0001$), were analyzed separately.

From the phenotypic point of view, although PB CTPC showed a similar profile to that of BM TPC, they displayed significantly lower ($p < 0.05$) expression levels of the CD38, CD138, CD81, CD56, CD27, and Vs38c maturation-associated markers, together with CD117 and to a lesser extent also the Ki67-proliferation marker ($p = 0.11$), supporting a more immature and less proliferative immunophenotype for paired PB vs. BM TPCs. Other maturation-associated PC markers displayed either a tendency towards lower (CD20, $p = 0.14$; and CD19, $p = 0.06$), or similar expression levels -CD45 ($p = 0.47$) and Sm/CyIg light chains (SmIg κ/λ , $p = 0.68$; CyIg κ , $p = 0.9$; CyIg λ , $p = 0.7$)- in BM vs. PB TPC (Fig. 2b and Supplemental Fig. 1).

Association between the number of PB CTPC and the distinct diagnostic and prognostic categories of the disease

ROC curve analysis showed that the most accurate (88% accuracy) cutoff to discriminate between MGUS and MM was at a PB count ≥ 0.058 CTPC/ μ L ($p < 0.001$) (Table 1). Within MGUS, cases at very low-risk of malignant transformation as defined by both the Mayo Clinic index (i.e., score 0) and the Spanish criteria (a percentage of TPC within the total BMPC of <95%), less commonly showed CTPC in PB: 35% vs. 72%, 70% and 100% for the Mayo Clinic scores 1, 2, and 3, respectively ($p \leq 0.03$; Fig. 3a), and 55% vs. 88% for MGUS cases with <95% vs. $\geq 95\%$ TPC/all BMPC ($p = 0.01$; Fig. 3c), respectively. Likewise, the number of CTPC also increased significantly from MGUS cases with Mayo Clinic score 0 to score 1, 2, and 3 cases ($p \leq 0.003$; Fig. 3b) and in MGUS cases with $\geq 95\%$ vs. <95% TPC/all BMPC ($p = 0.001$; Fig. 3d). Interestingly, despite the still limited follow-up, those MGUS cases with higher absolute PB CTPC counts showed significantly greater ($p < 0.0001$) rates of progression to SMM and MM -6/29 (21%) MGUS cases had progressed to SMM ($n = 1$) and MM ($n = 5$) at 30 months- compared to MGUS cases who showed low or undetectable CTPC in PB -0/115 cases (0%)- (Table 1 and Fig. 4a).

In contrast to MGUS, no significant differences in PB CTPC counts were observed among SMM patients classified into different risk-groups by the Mayo Clinic prognostic index ($p = 0.2$; Supplemental Fig. 2a) and the Spanish score ($p = 0.5$; Supplemental Fig. 2b), which could be due to the limited number of high-risk cases



(score 2) analyzed and/or the independent value of the two parameters. Despite this, at nearly 2 years, ~25% of SMM with higher numbers of CTPC in PB (≥ 0.1 CTPC/ μ L) had progressed to active MM vs. 0% among SMM patients with lower PB CTPC counts, although differences did not reach statistical significance ($p = 0.2$) (Fig. 4b).

Among MM, R-ISS stage III cases showed significantly higher counts (Fig. 3e) of CTPC in PB ($p = 0.001$ and $p = 0.004$ vs. stage I and stage II cases, respectively). Interestingly, MM cases with low numbers (i.e., < 0.1 CTPC/ μ L of PB- that would correspond to an MGUS-like pattern) of CTPC, showed prolonged 2 years PFS and OS rates (Figs. 4c, d, respectively): PFS of 94% vs. 40% ($p = 0.014$) and OS of 100% vs. 67% ($p = 0.03$), respectively.

Surprisingly, the longer PFS rates of MM cases who showed lower numbers of CTPC in PB was independent of response to therapy both when the IMWG complete response (CR) status ($p < 0.0001$; Fig. 4e) and the BM MRD status ($p = 0.02$; Fig. 4f) were considered.

Discussion

In the past, progressively higher frequencies of MGUS and MM patients presenting with CTPC in PB have been reported in parallel to an increased sensitivity of the techniques used (e.g., immunocytochemistry vs. conventional 4- and 8- color flow)^{19,20,22–24,29,47,48}. Here, we applied for the first time the recently described high-sensitive NGF method³⁴ for the detection of CTPC in PB

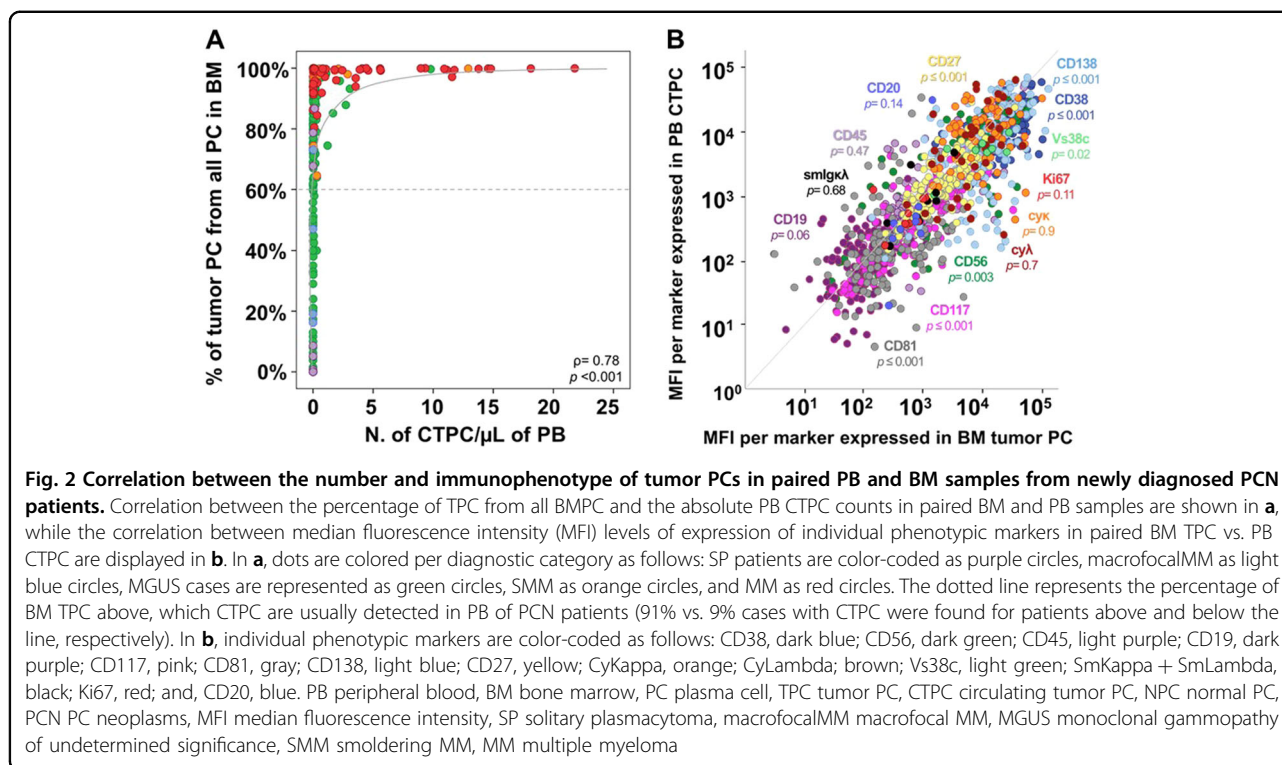


Table 1 Most accurate cutoff to discriminate between MM and MGUS cases based on the absolute number of PB circulating tumor PC

Variable	No. of CTCP/ μ L of PB
Cutoff value	0.058 CTCP/ μ L
Sensitivity	80%
Specificity	80%
AUC	88%
Positive predictive value (%)	65%
Negative predictive value (%)	90%
No. of MGUS cases below cutoff/total (%)	120/150 (80%)**
No. of MM cases above cutoff/total (%)	55/68 (81%)
False-positive cases (%)	30/150 (20%)
False-negative cases (%)	13/68 (19%)

PB peripheral blood, PC plasma cell, CTCP circulating tumor PC, MGUS monoclonal gammopathy of undetermined significance, MM symptomatic multiple myeloma, AUC area under the curve, No. number.

* $p < 0.0001$. **6/30 (20%) MGUS cases above the cutoff have progressed to MM after a median follow-up of 17 months

of a large cohort of newly diagnosed MGUS, SMM and MM cases, including also for the first time, SP and macrofocalMM patients. Overall, our results showed an up to ~2-fold increased frequency of cases presenting with CTCP in PB by NGF vs. both immunocytochemistry and conventional flow cytometry, among MGUS (59% vs.

19–37%)^{19,25}, SMM (100% vs. 15–50%)^{29,49} and MM (100% vs. 50–73%)^{19,25,26}. In contrast, only a small percentage of SP and macrofocalMM had detectable CTCP in PB. Altogether, these results confirm and extend on previous observations indicating that the presence of CTCP in PB is usually associated with systemic disease (i.e., MGUS, SMM and MM), higher numbers of PB CTCP within patients with systemic disease reflecting a more malignant clinical behavior^{19,22,50}, while it is a rare finding among tissue-localized PC tumors (e.g., SP and macrofocalMM)¹⁴. In line with these findings, the overall number of PB CTCP as assessed by NGF also increased progressively from SP and macrofocalMM to MGUS, SMM, and MM, the number instead of the presence vs. absence of CTCP providing an accurate discrimination between MGUS and MM in the great majority of patients. Altogether, these findings would support further evaluation of the benefit of including PB CTCP counts in new minimally invasive (i.e., PB-based) diagnostic algorithms, to distinguish between MGUS and MM; alternatively, it might be used as a prognostic factor in both diseases, as discussed below. Although next-generation sequencing approaches were not explored in parallel to NGF in our cases, previous reports from the literature suggest a similar sensitivity (i.e., detection of 1 CTCP in 10^6 total cells; 0.0001%) but a slightly lower applicability ($n = 44/46$ patients; 96%)^{51,52}.

Previous studies based on less sensitive approaches indicated that the presence of CTCP in PB and/or their

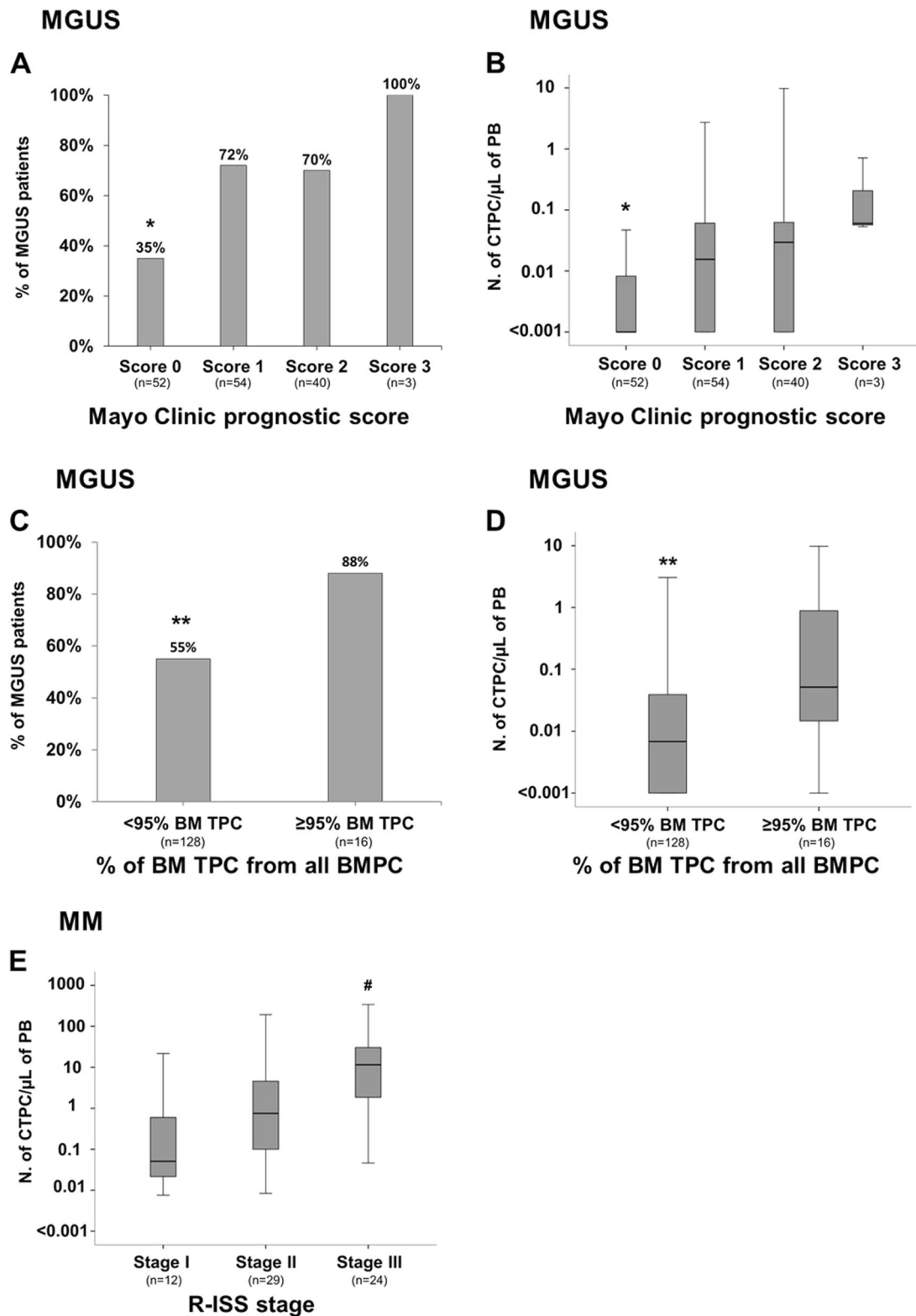


Fig. 3 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

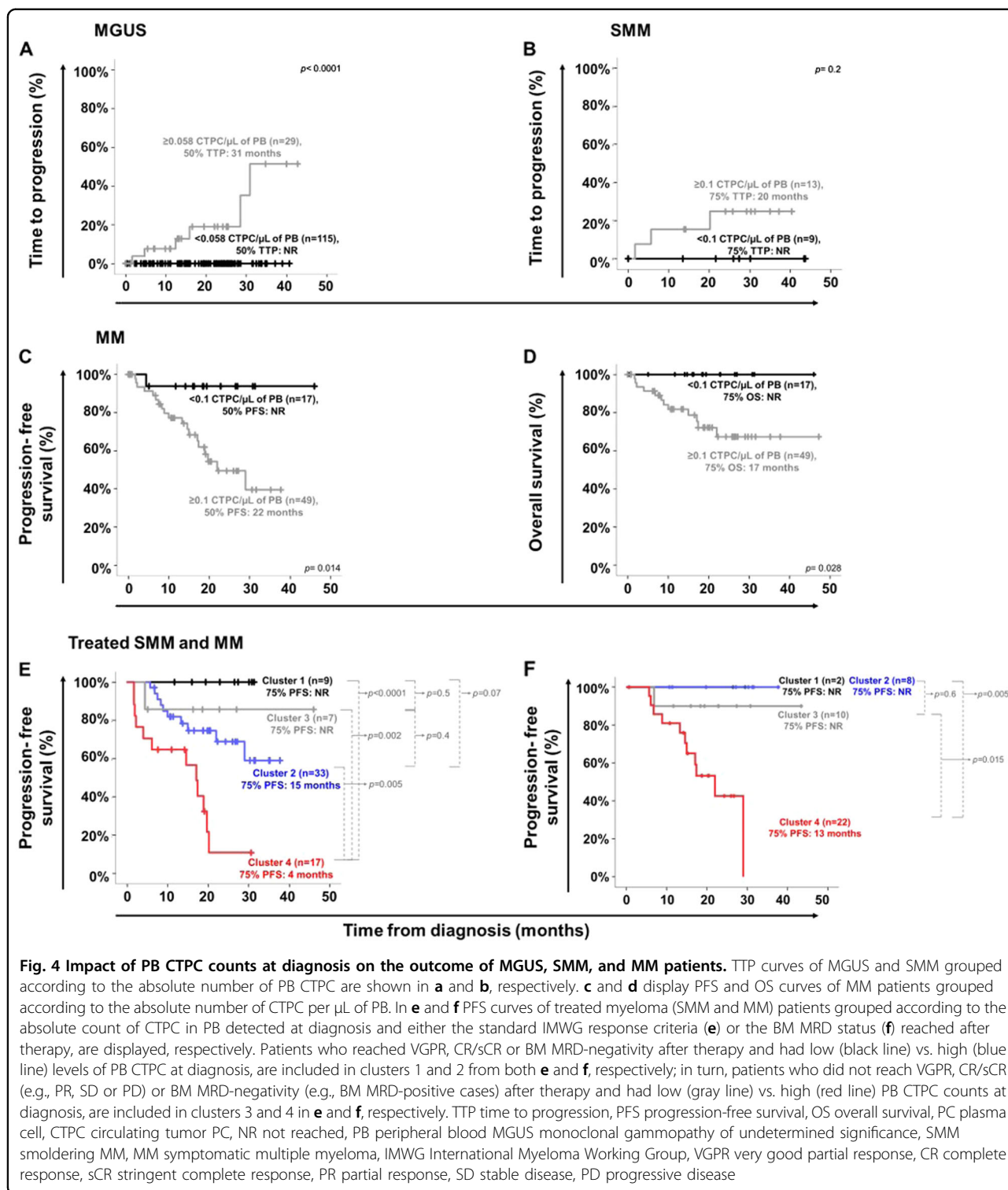
Fig. 3 Frequency and distribution of circulating tumor PC in PB of MGUS and MM patients classified into distinct risk-groups and clinical stages, respectively. Frequency of MGUS patients presenting with CTPC and their absolute counts according to the Mayo Clinic prognostic index (**a** and **b**, respectively; * $p < 0.05$ for Mayo Clinic prognostic score 0 vs. scores 1, 2, and 3) and the distribution of TPC within the whole BMPC compartment (<95% vs. $\geq 95\%$) (**c** and **d**, respectively; ** $p < 0.05$ vs. $\geq 95\%$ TPC from all BM PC). In **e**, the absolute counts of PB TPC in MM patients distributed according to the R-ISS stages is shown (* $p < 0.05$ for stage III vs. stages I and II). Boxes extend from the 25th to the 75th percentile values; the line in the middle and vertical lines correspond to the median value and the 10th and 90th percentiles, respectively. PC plasma cell, TPC tumor PC, CTPC circulating tumor PC, PB peripheral blood, BM bone marrow, MGUS monoclonal gammopathy of undetermined significance, MM multiple myeloma, R-ISS revised international staging system

number, are both associated with (i) an increased risk of transformation of MGUS to MM^{20,23} and (ii) the outcome of SMM and MM, when assessed both at diagnosis^{22,29,47,48,53} and after therapy^{21,31–33}. Despite the still relatively limited number of patients investigated per diagnostic category and the short median follow-up, our results confirm and extend on these findings. Thus, MGUS showing higher numbers of PB CTPC displayed shorter TTP to MM, while in SMM, the prognostic impact of the number of CTPC in PB appears to be more limited and independent from both the Mayo Clinic and the Spanish scoring systems. Nevertheless, the data on SMM should be interpreted with caution due to the limited number of these cases. Most interestingly, CTPC counts in MM within the range of MGUS patients were associated for the first time here, with a significantly longer PFS and OS, independently of response to therapy evaluated according to both the CR and MRD status. Altogether, these results reinforce the notion that also within MM, the presence of high number of CTPC is a strong adverse prognostic factor, very low numbers of CTPC in PB at diagnosis (i.e., similar to those observed in MGUS), potentially contributing to the identification of those few MM cases that show a good long-term outcome, even when they do not reach BM MRD-negativity or CR. Of note, preliminary results from our group further show that the persistence/presence of CTPC in MM patients who had undergone therapy, might be used as a surrogate marker of BM MRD-positivity, since all treated MM patients who showed CTPC after therapy, always showed MRD + of paired BM samples (data not shown). Confirmation of these findings deserves further prospective studies in large series of patients with longer follow-up.

The precise biological significance of the presence and the levels of CTPC in PB of MGUS and MM patients, still remains largely unknown^{25,54}. Classically, the presence of CTPC in PB of MM has been viewed as a sign of dissemination of BM TPC into the circulation leading to distinct tissue-homing patterns and the formation of new PC tumors at distant (e.g., extramedullary) sites^{19,25,55}. However, recent studies show that compared to BM TPC, PB CTPC display features of more quiescent cells with

greater resistance to chemotherapeutic agents and higher potential for self-renewal, together with a potentially more immature phenotype^{19,25,56,57}, suggesting that PB CTPC might constitute (and behave as) true MM stem cells^{55,58,59}.

Here, we confirm that PB CTPC from MM and MGUS patients are immunophenotypically more immature than their BM counterpart, as reflected by the expression of significantly lower levels of (i) markers that are typically acquired by PC during migration from secondary lymphoid tissues to the BM, such as CD38 and CD138^{60–64}, and (ii) adhesion molecules that anchor PC to stromal structures such as CD56, CD81, and CD117^{60,65–67}. Of note, here we also show that PB CTPC display lower expression levels of activation/differentiation-associated antigens such as CD27⁶⁷ and Vs38c, a rough endoplasmic reticulum protein directly linked to a high rate of protein (i.e., Ig) synthesis and secretion^{64,68,69}. In line with previous observations, PB CTPC detected in this large series of patients also tended to show lower levels of expression (vs. BMPC) of the Ki67-proliferation associated marker^{9,25,55,56}. In contrast, we did not find significant differences as regards the phenotypic profile of PB vs. BM TPC for other maturation-associated antigens previously described to be aberrantly expressed by TPC in MM and MGUS patients, such as CD19, CD20, CD45 and sm/cyIg;^{49,62} this might be due to the fact that the pattern of expression of these markers could more closely reflect tumor phenotypes potentially associated with specific genetic lesions -e.g., CD20 expression in cases carrying *t*(11;14)-⁷⁰ than actual maturation-associated phenotypes. Despite all the above, CTPC in MM might also correspond to an admixture of immature (i.e., potential stem cell-like) TPC and more mature (i.e., BM derived) myeloma PC. In any case, if this whole concept about the greater immaturity and stem cellness of PB vs. BM TPC holds true, PB CTPC in MM and MGUS might play a key role in disease dissemination throughout the BM (and in a subset of MM patients, also to extramedullary sites), at the same time they would be unable to appropriately home in the BM when niches are (almost) full and occupied by long-living (more mature) and growing tumor PCs. Altogether, this might also contribute to



explain, at least in part, the non-linear (significant) correlation here reported between the PB and BM TPC burden. Similarly, it might also contribute to explain the unexpectedly higher number of circulating NPC in PB in

more advanced vs. earlier stages of the disease (i.e., MM vs. MGUS), despite an almost complete depletion of their normal long-living BMPC counterpart is frequently observed in association with low serum non-involved

immunoglobulin levels in MM, but not in MGUS. In such case, progressive unspecific blockade of both TPC and (recently produced short-lived) NPC into the BM, due to the lack of (empty) PC niches occupied by TPC would occur together with a parallel increase in PB of both CTPC and NPC. The long-living nature of CTPC would provide an advantage to this PC population over short-lived NPC (recently produced in lymphoid tissues). This would lead to selective accumulation of TPC in the BM with progressive depletion of normal long-living PC in BM. As a consequence, abnormally low serum antibody production and immunoparesis would emerge as a hallmark of advanced disease^{43,71}.

In summary, here we show that the presence of CTPC in PB as assessed by NGF is a hallmark of both SMM and MM and a highly frequent finding among MGUS, while absent in most SP and macrofocalMM cases. Higher numbers of CTPC in PB were strongly associated with features of malignant disease, providing a powerful minimally-invasive blood test to discriminate between MGUS and MM at diagnosis and to identify both (i) MGUS cases at high-risk of progression to MM, and (ii) a small subset of MM patients with low number of CTPC (within the range of MGUS cases) that display a significantly longer survival despite not achieving BM MRD-negativity or CR.

Disclaimer

The EuroFlow consortium is an independent scientific consortium, which aims at innovation and standardization of diagnostic flow cytometry. All acquired knowledge and experience within EuroFlow is shared with the scientific and diagnostic community after protection of the relevant Intellectual Property, for example by filling patents. The involved patents are owned by the EuroFlow Consortium and licensed to companies, including Cytognos SL (Salamanca, Spain), Becton/Dickinson Biosciences (San José, CA, USA), and Immunostep SL (Salamanca, Spain). The revenues of the patents are exclusively used for EuroFlow Consortium activities, such as for covering (in part) the costs of the Consortium meetings, the EuroFlow Educational Workshops and the purchase of custom-made reagents for collective experiments. F.M.J., v.D.J.J.M., and O.A. are part of the inventors on the EuroFlow-owned patent PCT/NL/2013/050420; US 62/072,498 (Methods, reagents and kits for detecting minimal residual disease). This patent is licensed to Cytognos, which pays royalties to the EuroFlow Consortium

Acknowledgements

This work has been supported by the International Myeloma Foundation-Black Swan Research Initiative and the EuroFlow Consortium; Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBER-ONC; Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain and FONDOS FEDER), numbers: CB16/12/00400, CB16/12/00369, CB16/12/00489

and CB16/12/00233; grant SA079U14 from the Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain and; grant DTS15/00119 from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain. Acuerdo de colaboración con Fundación de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, Valladolid, Spain. This study was also supported by the Qatar National Research Fund (QNRF) Award No. 7-916-3-237, the AACR-Millennium Fellowship in Multiple Myeloma Research (15-40-38-PAIM), ERA-NET TRANSCAN-2 (iMMunocell), by a 2017 Leonardo Grant (BZG10931) for Researchers and Cultural Creators, BBVA Foundation, and the European Research Council (ERC) 2015 Starting Grant (MYELOMANEXT).

Author details

¹Cancer Research Center (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL); Cytometry Service (NUCLEUS) and Department of Medicine, University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer: CIBER-ONC number CB16/12/00400, Instituto Carlos III, Madrid, Spain. ³Clinica Universidad de Navarra (UNAV), Applied Medical Research Center (CIMA), IDISNA. CIBER-ONC number CB16/12/00369 and CB16/12/00489, Pamplona, Spain. ⁴Department of Hematology, University Hospital of Salamanca (HUSA), IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC). CIBER-ONC number CB16/12/00233, Salamanca, Spain. ⁵Department of Hematology, Health Care Center of Segovia (CAS), Segovia, Spain. ⁶Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro and Institute of Pediatrics and Childhood Care, Rio de Janeiro, Brazil. ⁷Department of Hematology, Hospital Center of Navarra (CHN), Pamplona, Spain. ⁸Primary Care Center Miguel Armijo, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Salamanca, Spain. ⁹Department of Hematology, University Hospital Lozano Blesa (HULB), Zaragoza, Spain. ¹⁰Department of Hematology, Virgen de las Nieves Hospital (HVN), Granada, Spain. ¹¹Department of Orthopedics, University Hospital of Salamanca, IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain. ¹²Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. ¹³Cedars-Sinai Samuel Oschin Cancer Center, Los Angeles, CA, USA

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41408-018-0153-9>).

Received: 10 September 2018 Revised: 22 October 2018 Accepted: 29 October 2018

Published online: 19 November 2018

References

- Boyle, E. M., Davies, F. E., Leleu, X. & Morgan, G. J. Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica* **99**, 605–612 (2014).
- McKenna R. W. et al. In *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue* IARC. pp. 200–208 (Lyon, 2008)
- Palumbo, A. U. & Anderson, A. U. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1046–1060 (2011).
- Swerdlow, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2391 (2016).
- Kyle, R. A. et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2582–2590 (2007).
- Kyle, R. A. et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.* **346**, 564–569 (2002).
- Kyle, R. A. et al. Long-term follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.* **378**, 241–249 (2018).
- García-Sanz, R. et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* **93**, 1032–1037 (1999).
- Röllig, C., Knop, S. & Bornhäuser, M. Multiple myeloma. *Lancet* **385**, 2197–2208 (2015).

10. Dimopoulos, M. A. & Terpos, E. Solitary bone plasmacytomas need to flow. *Blood* **124**, 1209–1210 (2014).
11. Weber, D. M. Solitary bone and extramedullary plasmacytoma. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* **2005**, 373–376 (2005).
12. Paiva, B. et al. Multiparameter flow cytometry for staging of solitary bone plasmacytoma: New criteria for risk of progression to myeloma. *Blood* **124**, 1300–1303 (2014).
13. Kilciksiz, S., Karakoyun-Celik, O., Agaoglu, F. Y. & Haydaroglu, A. A review for solitary plasmacytoma of bone and extramedullary plasmacytoma. *Sci. World J.* **2012**, 1–6 (2012).
14. Witzig, M. A. et al. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood* **88**, 1780–1787 (1996).
15. Billadeu, D. et al. Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood* **80**, 1818–1824 (1992).
16. Morgan, G. J., Walker, B. A. & Davies, F. E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 335–348 (2012).
17. Pérez-Andrés, M. et al. 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* **19**, 449–455 (2005).
18. Moschetta, M. et al. Bone marrow stroma and vascular contributions to myeloma bone homing. *Curr. Osteoporos. Rep.* **15**, 499–506 (2017).
19. Billadeu, D. et al. 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* **88**, 289–296 (1996).
20. Kumar, S. et al. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5668–5674 (2005).
21. Gonsalves, W. I. et al. Quantification of clonal circulating plasma cells in relapsed multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **167**, 500–505 (2014).
22. An, G. et al. Multiple myeloma patients with low proportion of circulating plasma cells had similar survival with primary plasma cell leukemia patients. *Ann. Hematol.* **94**, 257–264 (2015).
23. Periago, A. et al. Circulating aberrant plasma cells allow risk stratification of patients with myeloma. *Am. J. Hematol.* **91**, E353–E355 (2016).
24. Rawstron, A. C. et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br. J. Haematol.* **97**, 46–55 (1997).
25. Paiva, B. et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood* **122**, 3591–3598 (2013).
26. Bae, M. H. et al. Increased circulating plasma cells detected by flow cytometry predicts poor prognosis in patients with plasma cell myeloma. *Cytom. B. Clin. Cytom.* **94**, 493–499 (2016).
27. De Larrea, C. F. et al. Plasma cell leukemia. *Leukemia* **27**, 780–791 (2013).
28. Witzig, T. E., Kimlinger, T. K., Ahmann, G. J., Katzmann, J. A. & Greipp, P. R. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry* **26**, 113–120 (1996).
29. Bianchi, G. et al. High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia* **27**, 680–685 (2013).
30. Nowakowski, G. S. et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* **106**, 2276–2279 (2005).
31. Chakraborty, R. et al. Serial measurements of circulating plasma cells before and after induction therapy has an independent prognostic impact in patients with multiple myeloma undergoing upfront autologous transplantation. *Haematologica* **102**, 1439–1445 (2017).
32. Chakraborty, R. et al. Risk stratification in myeloma by detection of circulating plasma cells prior to autologous stem cell transplantation in the novel agent era. *Blood Cancer J.* **6**, 1–6 (2016).
33. Dingli, D. et al. Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system. *Blood* **107**, 3384–3388 (2006).
34. Flores-Montero, J. et al. Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* **31**, 2094–2103 (2017).
35. Kumar, S. et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **17**, e328–e346 (2016).
36. Rajkumar, S. V. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **15**, e538–e548 (2014).
37. Dimopoulos, M. A., Mouloupoulos, L. A., Maniatis, A. & Alexanian, R. Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood* **96**, 2037–2044 (2000).
38. Fan, J. et al. Macrofocal multiple myeloma is a particular subgroup of multiple myeloma. *Blood* **126**, 1855 LP–1851855 (2015).
39. Dimopoulos, M. A. et al. Macrofocal multiple myeloma in young patients: A distinct entity with favorable prognosis. *Leuk. Lymphoma* **47**, 1553–1556 (2006).
40. Mateos, M. -V. et al. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev.* **29**, 387–403 (2015).
41. Mateos, M. V. & González-Calle, V. Smoldering Multiple Myeloma: Who and When to Treat. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **17**, 716–722 (2017).
42. Rajkumar, S. V., Lacy, M. Q. & Kyle, R. A. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Blood Rev.* **21**, 255–265 (2007).
43. Pérez-Persona, E. 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* **110**, 2586–2592 (2007).
44. Palumbo, A. et al. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2863–2869 (2015).
45. Menéndez, P., del Cañizo, M. C. & Orfao, A. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **15**, 53–61 (2001).
46. Arroz, M. et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* **0**, 1–9 (2015).
47. Gonsalves, W. I. et al. Quantification of clonal circulating plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma: implications for redefining high-risk myeloma. *Leukemia* **28**, 2060–2065 (2014).
48. Gonsalves, W. I. et al. Quantification of circulating clonal plasma cells via multiparametric flow cytometry identifies patients with smoldering multiple myeloma at high risk of progression. *Leukemia* **31**, 130–135 (2017).
49. Paiva, B. et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **78**, 239–252 (2010).
50. Witzig, T. E., Dhodapkar, M. V., Kyle, R. A. & Greipp, P. R. Quantitation of circulating peripheral blood plasma cells and their relationship to disease activity in patients with multiple myeloma. *Cancer* **72**, 108–113 (1993).
51. Vij, R. et al. Deep sequencing reveals myeloma cells in peripheral blood in majority of multiple myeloma patients. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* **14**, 131–139 (2014).
52. Paiva, B., Dongen, J. J. M. Van & Orfao, A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood* **125**, 3059–3069 (2015).
53. Vagnoni, D. 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.* **170**, 523–531 (2015).
54. Paiva, B. et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia* **25**, 697–706 (2011).
55. Ghobrial, I. M. & Dc, W. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for the therapy. *Blood* **120**, 20–30 (2012).
56. Kumar, S., Rajkumar, S. V., Greipp, P. R. & Witzig, T. E. Cell proliferation of myeloma plasma cells: Comparison of the blood and marrow compartments. *Am. J. Hematol.* **77**, 7–11 (2004).
57. Mishima, Y. et al. The mutational landscape of circulating tumor cells in multiple myeloma. *Cell Rep.* **19**, 218–224 (2017).
58. Johnsen, H. E. et al. The myeloma stem cell concept, revisited: from phenomenology to operational terms. *Haematologica* **101**, 1451–1459 (2016).
59. Dela, CruzR., Tricot, G., Zangari, M. & Zhan, F. Progress in myeloma stem cells. *Am. J. Blood Res.* **1**, 135–145 (2011).
60. Perez-Andres, M. et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **78B**, S47–S60 (2010).

61. Caraux, A. et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138 plasma cells. *Haematologica* **95**, 1016–1020 (2010).
62. Flores-Montero, J. et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **90**, 61–72 (2016).
63. Jego, G. et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* **94**, 701–712 (1999).
64. Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I. & Brieva, J. A. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* **99**, 2154–2161 (2002).
65. Mateo, G. et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: A study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2737–2744 (2008).
66. Schmidt-Hieber, M. et al. CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica* **96**, 328–332 (2011).
67. Márk, Á. et al. The effect of microenvironmental factors on the development of myeloma cells. *Hematol. Oncol* **35**, 741–745 (2017).
68. Turley, H. et al. VS38: a new monoclonal antibody for detecting plasma cell differentiation in routine sections. *J. Clin. Pathol.* **47**, 418–422 (1994).
69. Banham a, H., Turley, H., Pulford, K., Gatter, K. & Mason, D. Y. The plasma cell associated antigen detectable by antibody VS38 is the p63 rough endoplasmic reticulum protein. *J. Clin. Pathol.* **50**, 485–489 (1997).
70. An, G. et al. t (11; 14) multiple myeloma: A subtype associated with distinct immunological features, immunophenotypic characteristics but divergent outcome. *Leuk. Res.* **37**, 1251–1257 (2013).
71. Bladé, J., Dimopoulos, M., Rosiñol, L., Rajkumar, S. V. & Kyle, R. A. Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: Current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations. *J. Clin. Oncol.* **28**, 690–697 (2010).

ARTÍCULO 3

“Monitorización de células plasmáticas tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con mieloma múltiple tras tratamiento mediante citometría de flujo de nueva generación”

Luzalba Sanoja-Flores¹, Juan Flores-Montero¹, Noemi Puig², Teresa Contreras-Sanfeliciano³, Roberia Pontes⁴, Alba Corral-Mateos¹, Omar García-Sánchez², María Díez-Campelo², Roberto José Pessoa de Magalhães Filho⁵, Luis García-Martín⁶, José María Alonso-Alonso⁷, Aranzazú García-Mateo⁸, Carlos Aguilar-Franco⁹, Jorge Labrador¹⁰, Abelardo Barez-García¹¹, Angelo Maiolino⁵, Bruno Paiva¹², Jesús San Miguel¹², Elaine Sobral da Costa⁴, Marcos González², María Victoria Mateos², Brian Durie¹³, Jacques van Dongen¹⁴ y Alberto Orfao en nombre del Consorcio EuroFlow.

¹. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL-IBSAL); Servicio General de Citometría (NUCLEUS) y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, Instituto Carlos III, Madrid, España. CIBER-ONC número CB16/12/00400.

². Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL; IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, España. CIBER-ONC número CB16/12/00233.

³. Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁴. Servicio de Pediatría, Instituto de Pediatría y Puericultura Martagão Gesteira, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Brasil.

⁵. Servicio de Hematología, Hospital Universitario Clementino Fraga Filho, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Brasil.

⁶. Servicio de Hematología, Hospital de Zamora, Zamora, España.

⁷. Servicio de Hematología, Hospital de Palencia, Palencia, España.

⁸. Servicio de Hematología, Hospital de Segovia, Segovia, España.

⁹. Servicio de Hematología, Hospital de Soria, Soria, España.

¹⁰. Servicio de Hematología, Hospital de Burgos, Burgos, España.

¹¹. Servicio de Hematología, Hospital de Ávila, Ávila, España.

¹². Clínica Universidad de Navarra; Centro de Investigación de Medicina Aplicada (CIMA), IDISNA, Pamplona, España (UNAV). CIBER-ONC número CB16/12/00369 y CB16/12/00489.

¹³. Centro del Cáncer Cedars-Sinai Samuel Oschin, Los Angeles, Estados Unidos.

¹⁴. Departamento de Inmunohematología y Hemoterapia, Centro Médico Universitario de Leiden, Leiden, Países Bajos.

Blood, (2019), 134:24

DOI: 10.1182/blood.2019002610.

La información suplementaria correspondiente a este trabajo y citada en el mismo está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo III y en el disco compacto disponibles al final de esta memoria de tesis doctoral.

Introducción. La técnica de citometría de flujo de nueva generación se ha desarrollado recientemente como herramienta de elevada sensibilidad e importante valor pronóstico, tanto para la detección de células plasmáticas tumorales circulantes (CPTC) en sangre al diagnóstico en pacientes con neoplasias de CP, como para la monitorización de enfermedad mínima residual (EMR) en médula ósea (MO) de pacientes con mieloma múltiple (MM) tras tratamiento. No obstante, hasta la fecha no se ha investigado la utilidad de la citometría de flujo de nueva generación para detectar la presencia de CPTC en sangre de pacientes con MM una vez administrado el tratamiento, y su posible utilidad pronóstica adicional respecto a la presencia de EMR en MO y/o la persistencia en suero del componente monoclonal.

Objetivo. Analizar la frecuencia de pacientes con MM que, tras tratamiento, presentaban CPTC en sangre mediante citometría flujo de nueva generación, y su posible asociación tanto con la persistencia de EMR en MO y de componente monoclonal (CM) en suero por inmunofijación, como con un posible impacto pronóstico.

Materiales y métodos. En este trabajo, aplicamos la técnica de citometría flujo de nueva generación sobre 274 muestras pareadas de sangre periférica y MO provenientes de 137 pacientes tratados con MM, analizando, además, en un subgrupo de 54 pacientes, muestras secuenciales de sangre periférica (>1 estudio). A nivel pronóstico, evaluamos el impacto de la presencia de CPTC en sangre sobre la supervivencia de estos pacientes, respecto a los factores de riesgo conocidos más relevantes como la edad, el perfil citogenético estudiado mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) sobre núcleos interfásicos de poblaciones purificadas de CP, y la persistencia/ausencia de EMR en MO o de CM en suero por inmunofijación.

Resultados. En conjunto, 36 de los 137 (26%) pacientes con MM analizados tras tratamiento mostraron CPTC en sangre. Merece destacar que todos ellos presentaron, además, persistencia de EMR positiva en MO (36/36), detectándose en más de la mitad (21/36, 58%) la presencia de componente monoclonal en suero. Pese a estos resultados, la sensibilidad de la detección de CPTC en sangre a la hora de identificar enfermedad persistente en pacientes tratados con MM, fue inferior a la obtenida con los estudios de EMR en MO (66%; 91/137) y de inmunofijación en suero (45%; 62/137). Aun así, la presencia de CPTC en sangre constituyó un factor pronóstico adverso e independiente de otros parámetros, a la hora de predecir la de supervivencia libre de progresión de los pacientes estudiados, tanto en su conjunto -índice de riesgo de 5,1 intervalo de confianza (IC) del 95%: 2,9-8,9; $p < 0,0001$ -, como de forma específica en aquellos casos que

alcanzaron respuesta completa (RC) o RC estricta -índice de riesgo de 7,4 (IC del 95%: 3,0-18,2; $p < 0,0001$)-. Además, cabe señalar que el valor predictivo de la presencia de CPTC en sangre no solo era independiente de la respuesta clínica alcanzada, sino también del momento del tratamiento en el que se evaluó su presencia (durante el tratamiento vs. final de tratamiento). Finalmente, la ausencia de CPTC en sangre en dos o más estudios consecutivos demostró ser la variable que mejor refleja el comportamiento evolutivo de la enfermedad, facilitando la optimización del seguimiento clínico a largo plazo de los pacientes con MM, al permitir discriminar de forma más clara entre pacientes con bajo vs. alto riesgo de recaída.

Conclusiones. La presencia de CPTC detectada mediante citometría flujo de nueva generación en sangre de pacientes con MM tras tratamiento, constituye un marcador de elevado valor pronóstico que refleja de forma constante la persistencia de EMR en MO. Además, permite una monitorización estrecha de los pacientes con MM empleando procedimientos mínimamente invasivos, particularmente en aquellos casos que han finalizado la terapia activa. Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de CPTC en sangre de pacientes con MM tras tratamiento proporciona información complementaria a la de otros factores pronósticos bien establecidos, a la hora de evaluar la respuesta al tratamiento, permitiendo identificar un subgrupo de pacientes con riesgo inminente de progresión, independientemente de la calidad de la respuesta clínica y de los niveles de EMR en MO alcanzados con el tratamiento.

TO THE EDITOR:

Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy

Luzalba Sanoja-Flores,^{1,5} Juan Flores-Montero,^{1,5} Noemi Puig,^{1,4,6} Teresa Contreras-Sanfeliciano,⁷ Roberia Pontes,⁸ Alba Corral-Mateos,^{1,5} Omar García-Sánchez,^{1,4,6} María Díez-Campelo,^{1,4,6} Roberto José Pessoa de Magalhães,⁹ Luis García-Martín,¹⁰ José María Alonso-Alonso,¹¹ Aranzazú García-Mateo,¹² Carlos Aguilar-Franco,¹³ Jorge Labrador,¹⁴ Abelardo Barez-García,¹⁵ Angelo Maiolino,⁹ Bruno Paiva,^{4,16} Jesús San Miguel,^{4,16} Elaine Sobral da Costa,⁸ Marcos González,^{1,4,6} María Victoria Mateos,^{1,4,6} Brian Durie,¹⁷ Jacques J. M. van Dongen,¹⁸ and Alberto Orfao,^{1,5} on behalf of the EuroFlow Consortium

¹Cancer Research Center–Instituto de Biología Celular y Molecular del Cáncer (IBMCC) of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain; ²Cytometry Service (NUCLEUS) and ³Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBER-ONC), Instituto Carlos III, Madrid, Spain; ⁵Instituto de Investigación Biosanitaria (IBSAL), Salamanca, Spain; ⁶Department of Hematology and ⁷Department of Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁸Department of Pediatrics, Institute of Pediatrics and Puericulture Martagão Gesteira (IPPMG) and ⁹University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; ¹⁰Department of Hematology, Hospital of Zamora, Zamora, Spain; ¹¹Department of Hematology, Hospital of Palencia, Palencia, Spain; ¹²Department of Hematology, Hospital of Segovia, Segovia, Spain; ¹³Department of Hematology, Hospital of Soria, Soria, Spain; ¹⁴Department of Hematology, Hospital of Burgos, Burgos, Spain; ¹⁵Department of Hematology, Hospital of Ávila, Ávila, Spain; ¹⁶Clinica Universidad de Navarra, Applied Medical Research Center (CIMA), IDISNA, Pamplona, Spain; ¹⁷Cedars-Sinai Samuel Oschin Cancer Center, Los Angeles, CA; and ¹⁸Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

In recent years, detection of circulating tumor plasma cells (CTPC), tumor cell–derived deoxyribonucleic acid (DNA), RNA, or protein markers in blood has gained interest for disease monitoring in multiple myeloma (MM).^{1,2} This is mainly because of (1) the minimally invasive nature of blood vs bone marrow (BM) analyses, (2) the possibility for more precise quantification of absolute numbers of CTPC than BM minimal residual disease (MRD) resulting from absence of potential hemodilution, and (3) the (nonlinear) correlation observed between CTPC numbers and BM disease burden at diagnosis.^{1,3} Recently, we have shown by high-sensitivity next-generation flow (NGF) that CTPC are systematically present in blood of MM at diagnosis, with an adverse prognostic impact for higher counts.³ These results highlight the relevance of greater levels of disease dissemination via blood in conferring a malignant behavior to MM, suggesting the presence of blood CTPC might be required for subsequent disease progression of treated MM patients.

Based on this hypothesis, here we investigate for the first time the prognostic impact of CTPC by NGF in blood of 137 newly diagnosed MM patients after active treatment outside clinical trials (supplemental Table 1 on the *Blood* Web site), in parallel to BM MRD and serum immunofixation (sIF). Overall, a total of 328 samples were analyzed: 274 paired BM and blood samples, plus 54 follow-up blood specimens. Following the EuroFlow-NGF MM MRD approach,⁴ a median (range) of 6 mL (3–14 mL) of blood and 1.8 mL (0.3–5 mL) of BM sample were lysed to (systematically) obtain $\geq 10^7$ cells per sample. In parallel, sIF was measured by the HYDRAGEL kit (HYDRASYS system, Sebia, Barcelona, Spain).⁵ Statistical significance was set at P values $< .05$ (supplemental Materials). All studies were approved by the institutional review board.

Following therapy, persistence of CTPC in blood was detected in 26% of MM cases. This represents a 50% higher frequency

than previously reported by conventional flow cytometry (18%–19%),^{6–8} reaching rates similar to those found with other high-sensitivity techniques such as allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction (25%–28.8%^{9,10}) or next-generation sequencing (31%–34%^{2,11} for cell-free DNA and 40%² for genomic leukocyte DNA). This translated into even higher differences among patients who reached complete response (CR)/stringent CR (sCR): 17% CTPC⁺ cases in our series vs 0%^{12,13} to $< 8\%$ ^{6,8} in other previous conventional flow cytometry studies (supplemental Table 2).

Despite the greater sensitivity and rate of positivity for CTPC reported here, a significant proportion of our MM cases that were BM MRD⁺ or sIF⁺ still had undetectable CTPC in (paired) blood samples: 55/137 (40%) and 41/137 (30%), respectively. In contrast, 15/36 (42%) CTPC⁺ cases were also sIF[–] (supplemental Table 2). These findings indicate that CTPC is a less sensitive MRD marker in MM than BM MRD, complementary to sIF, in line with previous observations.¹ However, although BM MRD and sIF mainly reflect persistence of resistant tumor¹⁴ and tumor cell–derived immunoglobulins,¹⁵ they fail to provide insight on the ability of these cells to support tumor regrowth and/or dissemination, which ultimately determine disease progression. In contrast, CTPC might not only reflect tumor load but, particularly, the ability of persisting tumor cells to disseminate the disease and support tumor growth and progression at (multiple) distant sites in BM and other tissues, as previously suggested¹⁶ based on their more immature and prominent stem cell-like PC features compared with (paired) BM-derived tumor-plasma cells (TPC).³

Despite all of this, every CTPC⁺ case in our cohort was BM MRD⁺, suggesting that the presence of blood CTPC after therapy might be a surrogate marker of persistent BM MRD in guiding (eg, avoiding) subsequent (more invasive) BM aspiration

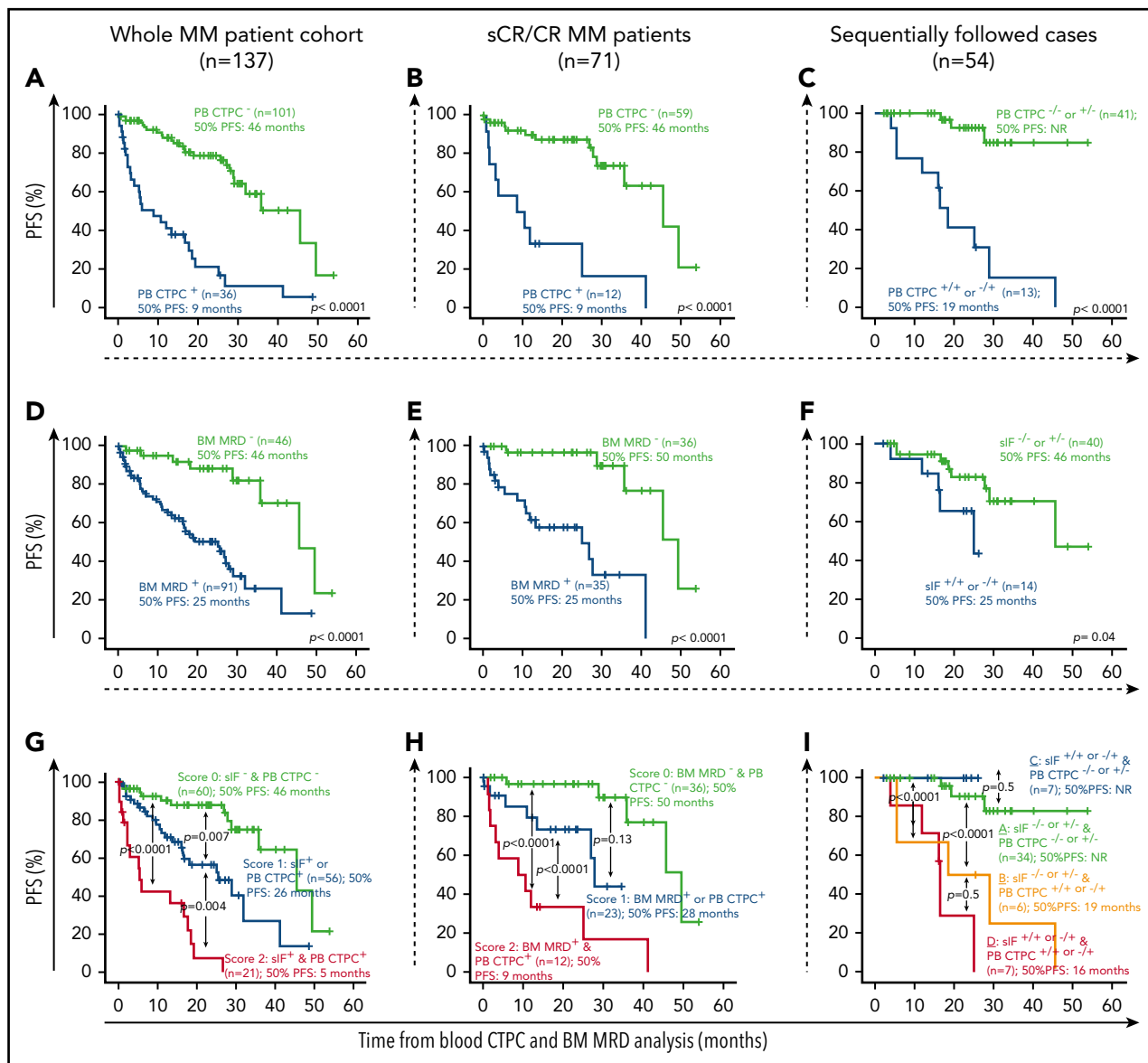


Figure 1. Prognostic impact of blood CTPC by NGF (vs BM MRD and sIF) on PFS of MM patients according to patient response to therapy. (A-B) Effect of PB CTPC, (D-E) BM MRD, (H) combination of both parameters, and (G) PB CTPC together with sIF status on PFS is displayed for (A, D, G) the entire MM cohort and (B, E, H) for sCR and CR patients, respectively. PFS curves of MM patients grouped according to (C) their sequential PB CTPC (-/- or +/- vs -/+ and +/+), (F) sIF status, or (I) a combination of both, are shown. Overall, CTPC⁻ and MRD⁻ was defined as the absence of TPC in PB or BM by NGF, respectively, with a limit of detection of $<2 \times 10^{-6}$. CR, complete response; NR, not reached; PB, peripheral blood.

procedures, particularly among sCR/CR patients. In contrast, a significant fraction of our CTPC⁻ cases were BM MRD⁺ and/or sIF⁺, supporting the notion that MM is a BM disease with greater levels of infiltration by (usually) functional PC in BM vs PB. Prolonged half-life (~23 days) and complete clearance (~29 weeks) of the M-protein for the most prevalent immunoglobulin G subclass,¹⁷ in addition to persistence of extramedullary disease¹⁸ and/or the administration of monoclonal antibody-therapy (eg, daratumumab)¹⁹ for MM patients, might also explain sIF positivity in at least a subset of BM MRD⁻/sIF⁺ cases. Additionally, poor BM sample quality (eg, from hemodilution) might also play a role because abnormally low ($\leq 0.002\%$)⁴ mast cell counts were detected here in 5/10 BM MRD⁻/sIF⁺ cases. In contrast, sIF negativity among 4 of our non-sCR/CR patients could be related to the appearance/persistence of plasmacytomas¹⁸ (2/4 cases),

and high free light chain ratio levels (>500) without measurable M-component in serum and urine¹⁸ (1/4 cases), together with a non-secretory TPC¹⁵ detectable here in another MM patient.

From the prognostic point of view, our results based on real-world MM show for the first time that the absence vs presence of blood CTPC by NGF is a new powerful independent prognostic marker for progression-free survival (PFS) measured from the time of BM-MRD/CTPC assessment both among the entire MM patient cohort (hazard ratio [HR], 5.1; 95% confidence interval [CI], 2.9-8.9; $P < .0001$) (Figure 1A) and within sCR/CR cases (HR, 7.4; 95% CI, 3.0-18.2; $P < .0001$; Figure 1B), complementary to currently available prognostic tools such as sIF and BM MRD, respectively (Table 1), and regardless of the treatment phase BM-MRD/CTPC being assessed (supplemental Figure 1).

Table 1. Multivariate analysis of prognostic factors For PFS In MM

	Univariate analysis		Multivariate analysis		
	Median PFS (mo)	P	HR	(95% CI)	P
Prognostic factors for entire MM series					
Age					
<65 y	28	.3	—	—	—
≥65 y	36				
Cytogenetic profile by FISH					
Standard-risk	36	.07	—	—	—
High-risk	16				
Serum IF					
Negative	41	.001	—	—	—
Positive	18		2.4	(1.3-4.4)	.004
BM MRD status by NGF					
Negative	46	<.0001	—	—	—
Positive	25				
PB CTPC status by NGF					
Negative	46	<.0001	—	—	—
Positive	9		5.1	(2.9-8.9)	<.0001
Prognostic factors for sCR/CR cases					
Age					
<65 y	50	.5	—	—	—
≥65 y	41				
Cytogenetic profile by FISH					
Standard-risk	50	.09	—	—	—
High-risk	28				
BM MRD status by NGF					
Negative	50	<.0001	—	—	—
Positive	25		6.1	(1.5-24.4)	.01
PB CTPC status by NGF					
Negative	46	<.0001	—	—	—
Positive	9		7.4	(3.0-18.2)	<.0001

High-risk cytogenetics was defined as presence at diagnosis of t(4;14); t(11;14); t(14;16); 1q amplification, deletion 13q, and/or deletion 17p. Standard-risk cytogenetics includes all other cases. (Data available in 96/137 cases.)

FISH, fluorescent in situ hybridization; IF, immunofixation.

Based on those covariables that showed a (statistically) significant effect on PFS in multivariate analysis (Table 1), a prognostic score was built that allowed identification of a subgroup of blood CTPC⁺ MM patients with a very poor outcome (score 2 in the risk stratification models proposed here) with PFS rates at 2 years of only 1% for the entire patient cohort (Figure 1G) and of 33% for sCR/CR MM patients (Figure 1H), respectively.

These results, together with the demonstration that CTPC are systematically detected in blood of MM at diagnosis³ and at relapse,¹³ suggest that detection of blood CTPC rather than a surrogate marker of response is a strongly reliable predictor of impending (early) disease progression⁹ (Figure 1A-B). In contrast, BM MRD would be a better predictor of persistent disease (Figures 1D-E) and longer term prognosis of MM undergoing different therapies, as recurrently shown in the literature in the settings of clinical trials, both for conventional²⁰⁻²² and for high-sensitivity NGF^{4,23} and next-generation sequencing²⁴ approaches. However, frequent BM sampling is hampered by the invasive nature of BM aspiration procedures,¹ whereas more frequent follow-up of CTPC in blood is feasible. Thus, sequential monitoring of blood CTPC was performed in a subset of 54 cases in parallel

to sIF. Our results showed that MM patients who were persistently CTPC⁻ (CTPC^{-/-}) or that became CTPC⁻ after being CTPC⁺ (CTPC^{+/-}) showed a significantly better outcome than cases with a blood CTPC⁺ result in the last follow-up study (CTPC^{+/+} or ^{-/+}) (Figure 1C), independent of sIF status (Figure 1F, I). However, this should be confirmed in larger series of patients with longer monitoring because the limited number of sIF^{+/+} or ^{-/+} (n = 7) cases was observed for a paradoxically (slightly) better outcome vs the sIF^{-/-} or ^{+/-} (n = 34) MM showing no CTPC in the last follow-up study (ie, CTPC^{-/-} or ^{+/-} cases) (Figure 1I). In spite of that, the former findings suggest that blood CTPC might provide additional relevant prognostic information to single time-point BM MRD assessment in predicting for longer term outcome in patients that either (persistently) remain or turn CTPC⁻ in sequential follow-up studies, in line with previous reports.^{9,25}

In summary, we show here that blood CTPC is a novel independent prognostic marker for PFS in real-world MM prone to more frequent monitoring, which provides early indication of impending disease progression, regardless of BM MRD and sIF status. These results suggest that presence of blood CTPC

of MM after therapy probably reflects a unique distinct tumor biology (eg, tumor dissemination capacity) at a given time point after therapy with important clinical consequences. Further studies in larger series of MM patients outside and inside clinical trials are required to confirm our findings.

Acknowledgments

The authors thank Sergio Matarraz and Lourdes Martín-Martín for their support on statistical analysis.

This work has been supported by the International Myeloma Foundation-Black Swan Research Initiative and the EuroFlow Consortium; Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBER-ONC; Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain, and FONDOS Europeo de Desarrollo Regional) grants CB16/12/00400 (L.S.-F., J.F.-M., A.C.-M., and A.O.), CB16/12/00233 (N.P., O.G.-S., M.D.-C., M.G. and M.-V.M.), CB16/12/00369 and CB16/12/00489 (B.P. and J.S.M.); grant SA079U14 from the Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; and grant DTS15/00119 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain; by the Research Foundation of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (grant E26/110.105/2014) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ of Brazil (grants 303765/2018-6 and 409440/2016-7).

The EuroFlow Consortium is an independent scientific consortium that aims at innovation and standardization of diagnostic flow cytometry. All consortium members that contributed are listed as authors. All acquired knowledge and experience within EuroFlow is shared with the scientific and diagnostic community after protection of the relevant Intellectual Property; for example, by filing patents. The involved patents are owned by the EuroFlow Consortium and licensed to companies, including Cytognos SL (Salamanca, Spain), Becton/Dickinson Biosciences (San José, CA), and Immunostep SL (Salamanca, Spain). The revenues of the patents are exclusively used for EuroFlow Consortium activities, such as for covering (in part) the costs of the Consortium meetings, the EuroFlow Educational Workshops, and the purchase of custom-made reagents for collective experiments. J.F.-M., J.J.M.v.D., and A.O. are part of the inventors on the EuroFlow-owned patent PCT/NL/2013/050420; US 62/072 498 (Methods, reagents and kits for detecting minimal residual disease). This patent is licensed to Cytognos, which pays royalties to the EuroFlow Consortium.

Authorship

Contribution: L.S.-F., T.C.S., R.P., A.C.-M., and O.G.S. performed experiments; L.S.-F. and J.F.M. analyzed results; N.P., M.D.-C., R.J.P.d.M., L.G.-M., J.M.A.-A., A.G.-M., C.A.-F., J.L., A.B.-G., A.M., E.S.d.C. and M.G. contributed to the data collection and performed patients management; L.S.-F., J.F.-M., B.P., J.S.M., M.V.M., B.D., J.J.M.v.D., and A.O. designed the research; and L.S.-F., J.F.-M. and A.O. wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: M.-V.M. declares honoraria for lectures and advisory boards from Janssen, Celgene, Amgen, Takeda, Abbvie, GSK, Adaptive, EDO-Mundipharma, and Pharmamar. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: L.S.F., 0000-0002-9275-7793; J.F.M., 0000-0002-1119-4387; R.P., 0000-0003-3608-8254; M.D.C., 0000-0002-1467-6779; J.S.M., 0000-0002-9183-4857; E.S.da.C., 0000-0002-5340-5816; A.O., 0000-0002-0007-7230.

Correspondence: Alberto Orfao, Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-USAL), Avenida Universidad de Coimbra S/N, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain; e-mail: orfao@usal.es.

Footnotes

For original data, please contact orfao@usal.es.

The online version of this article contains a data supplement.

Appendix: study group members

The members of the EuroFlow Consortium are: J.J.M.v.D., W. M. Bitter, B. R. Lubbers, A. S. M. van der Meij, C. I. Teodosio, M. Zlei, A. J. van der Sluijs-Gelling, M. van der Burg (Leiden University Medical Center); V. H. J. van der Velden, A. W. Langerak, J. te Marvelde, J. Schilperoord-Vermeulen, A. Blijkerk, K. C. Heezen (Erasmus MC); A.O., J. Almeida, M. B. Vidriales, J.F.-M., M. Pérez-Andrés, S. Matarraz, E. Blanco, L. Martín, Q. Lecrevisse, J. J. Pérez-Morán, N. Puig (University of Salamanca); A. Medina Almeida, M. Gomes da Silva, T. Faria (Instituto Português de Oncologia); M. Brüggemann, M. Ritgen, M. Szczepanowski, S. Kohlscheen, A. Steinert, E. Harbst, J. Finke (University of Schleswig-Holstein); V. Asnafi, L. Lhermitte, E. Duroyon (Hôpital Necker-Enfants Malades); J. Trka, O. Hrusak, T. Kalina, E. Mejstrikova, M. Novakova, D. Thumer, V. Kanderova (Charles University); T. Szczepanski, L. Sędek, J. Balsa, L. Slota, J. Kulis (Medical University of Silesia); C. E. Pedreira, E. Sobral da Costa (Federal University of Rio de Janeiro); S. Nierkens, A. de Jong, A. de Koning (Dutch Childhood Oncology Group); M. Lima, A. H. Santos (Centro Hospitalar do Porto/University of Porto); S. Böttcher, S. Lange, R. Engelmann, D. Paape, C. Machka (Universitätmedizin Rostock); G. Gaipa, C. Burracchi, C. Bugarin (Università di Milano); E. Lopez-Granados, L. del Pino Molina (University Hospital La Paz-IdiPAZ); M. Vilkova, J. Nechvatalova (St Anne's Faculty Hospital); M. Roussel (University of Rennes); L. Campos-Guyotat, C. Aanei (CHU de Saint-Etienne); J.S.M., B.P., L. Burgos (Universidad de Navarra); N. Villamor-Casas, L. Magnano (Hospital Clínic de Barcelona); J. Philippé, C. Bonroy, B. Denys, A. Willems, P. Brueghe, J. de Wolf (University Hospital Ghent); A. E. Sousa, S. L. Silva (University of Lisbon); P. Fernandez, D. Morf (Kantonsspital Aarau).

REFERENCES

1. Waldschmidt JM, Anand P, Knoechel B, Lohr JG. Comprehensive characterization of circulating and bone marrow-derived multiple myeloma cells at minimal residual disease. *Semin Hematol*. 2018;55(1):33-37.
2. Oberle A, Brandt A, Voigtlaender M, et al. Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. *Haematologica*. 2017;102(6):1105-1111.
3. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Garcés JJ, et al; EuroFlow consortium. Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC). *Blood Cancer J*. 2018;8(12):117.
4. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094-2103.
5. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, Blanckaert N. Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clin Chem*. 1998;44(5):944-949.
6. Chakraborty R, Muchtar E, Kumar SK, et al. Risk stratification in myeloma by detection of circulating plasma cells prior to autologous stem cell transplantation in the novel agent era. *Blood Cancer J*. 2016;6(12):e512.
7. Moor I, Bacher VU, Jeker B, et al. Peripheral flow-MRD status at the time of autologous stem cell collection predicts outcome in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(12):1599-1602.
8. Cowan AJ, Stevenson PA, Libby EN, et al. Circulating plasma cells at the time of collection of autologous PBSC for transplant in multiple myeloma patients is a negative prognostic factor even in the age of post-transplant maintenance therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(7):1386-1391.
9. Korthals M, Sehnke N, Kronenwett R, et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in the peripheral blood of patients with multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(7):1109-1115.
10. Huhn S, Weinhold N, Nickel J, et al. Circulating tumor cells as a biomarker for response to therapy in multiple myeloma patients treated within the GMMG-MM5 trial. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(8):1194-1198.
11. Mazzotti C, Buisson L, Maheo S, et al. Myeloma MRD by deep sequencing from circulating tumor DNA does not correlate with results obtained in the bone marrow. *Blood Adv*. 2018;2(21):2811-2813.

12. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997;97(1):46-55.
13. Gonsalves WI, Morice WG, Rajkumar V, et al. Quantification of clonal circulating plasma cells in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2014;167(4):500-505.
14. Paiva B, Corchete LA, Vidriales M-B, et al; Spanish Myeloma Group / Program for the Study of Malignant Blood Diseases Therapeutics (GEM / PETHEMA) Cooperative Study Groups. Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood*. 2016;127(15):1896-1906.
15. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al; International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009;23(2):215-224.
16. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*. 2012;120(1):20-30.
17. Drayson M, Morgan G, Jackson G, et al. Prospective study of serum FLC and other M-protein assays: when and how to measure response? *Clin Lymphoma Myeloma*. 2012;9(Suppl 1):S56.
18. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328-e346.
19. Rosenberg AS, Bainbridge S, Pahwa R, Jialal I. Investigation into the interference of the monoclonal antibody daratumumab on the free light chain assay. *Clin Biochem*. 2016;49(15):1202-1204.
20. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, et al; GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112(10):4017-4023.
21. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol*. 2013;31(20):2540-2547.
22. Lahuerta J-J, Paiva B, Vidriales M-B, et al; GEM (Grupo Español de Mieloma)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Group. Depth of response in multiple myeloma: a pooled analysis of three PETHEMA/GEM clinical trials. *J Clin Oncol*. 2017;35(25):2900-2910.
23. Paiva B, Puig N, Cedena MT, et al. Impact of next-generation flow (NGF) minimal residual disease (MRD) monitoring in multiple myeloma (MM): results from the Pethema/GEM2012 trial. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):905.
24. Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(20):3073-3079.
25. Chakraborty R, Mughtar E, Kumar SK, et al. Serial measurements of circulating plasma cells before and after induction therapy have an independent prognostic impact in patients with multiple myeloma undergoing upfront autologous transplantation. *Haematologica*. 2017;102(8):1439-1445.

DOI 10.1182/blood.2019002610

© 2019 by The American Society of Hematology

TO THE EDITOR:

Clinical utility of targeted next-generation sequencing–based screening of peripheral blood in the evaluation of cytopenias

Vignesh Shanmugam,¹ Aric Parnes,² Rajeshwari Kalyanaraman,³ Elizabeth A. Morgan,^{1,*} and Annette S. Kim^{1,*}¹Department of Pathology, ²Division of Hematology, and ³Department of Obstetrics and Gynecology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA

One of the most common reasons for hematology consultation is the evaluation of cytopenia(s). The workup of patients who present with cytopenia(s) can be extensive, given the wide differential diagnosis.¹ Although only a minority of patients are ultimately diagnosed with a hematologic malignancy, a key entity to exclude in this differential is myelodysplastic syndrome (MDS),² which requires bone marrow morphology and cytogenetics for diagnosis. There is a clinical need for the development of minimally invasive ancillary tests to enhance conventional hematologic workup (eg, complete blood count with differential, B12/folate testing, iron-related studies, and serum protein electrophoresis) in the identification of patients who are at a low risk of having an underlying hematologic malignancy as the cause of cytopenia(s), thereby avoiding a costly and invasive bone marrow biopsy (BMBx).

Mutation profiling of peripheral blood (PB) using next-generation sequencing (NGS) is an attractive solution to this problem because of its potential application as a minimally invasive screen. Recent large-scale genome-sequencing studies using bone marrow samples have demonstrated that most cases of MDS and other related neoplasms, such as acute myeloid leukemia and

myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm overlap syndromes, harbor pathogenic somatic mutations in diverse myeloid cancer driver genes.²⁻⁶ Moreover, some or all of these mutations can be detected in PB granulocytes in most patients with MDS and related neoplasms (Phillip D. Michaels, Dahai Wang, A.S.K., manuscript in preparation).^{7,8}

Despite these advances and the widespread use of NGS testing, there are limited data on the clinical use of NGS testing in the early evaluation of patients with cytopenia(s). We hypothesize that targeted PB NGS using a myeloid cancer gene panel can be a valuable minimally invasive, ancillary tool in identifying patients with an underlying myeloid neoplasm as the cause of cytopenia(s). Herein, we report the clinical utility of PB screening by targeted NGS testing in a large institutional cohort of patients with cytopenia(s).

After institutional review board approval, we retrospectively identified all patients presenting with PB cytopenia(s) over a 30-month period (January 2015 through June 2017) to the Hematology Clinic at the Dana-Farber/Brigham and Women's

-DISCUSIÓN-

En las últimas décadas se han logrado importantes avances en el conocimiento de la biología de las células plasmáticas (CP) normales y de la fisiopatología de las neoplasias de CP ⁷³. En paralelo, este nuevo conocimiento ha permitido identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar una amplia batería de nuevos fármacos con importantes efectos anti-tumorales, lo que ha supuesto una notable mejoría en las tasas de respuesta al tratamiento y en el pronóstico de los pacientes con mieloma múltiple, ya sea quiescente (MMQ) ^{148, 149} o sintomático (MM) ^{240, 242, 248, 342–346}. Así, hoy día se calcula que, alrededor de 80% de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico tratados con los nuevos fármacos o combinaciones de los mismos, alcanzan respuesta completa (RC) ²⁸¹. No obstante, aunque lograr RC se asocia con un importante beneficio pronóstico ^{270, 271, 275, 276, 280, 302, 347}, independientemente de la edad del paciente y del estadio clínico (p.ej. ISS) de la enfermedad en el que se encuentra ²⁷⁷, no supone la curación completa. Así, en una importante proporción de los pacientes que alcanzan RC, persisten niveles mínimos de enfermedad residual (EMR) que resultan indetectables mediante las técnicas convencionales de citología e inmunofijación empleadas en la definición clásica de RC ²⁹¹, y que *a posteriori* son responsables de la progresión de la enfermedad ^{271, 275, 347, 348}. Por todo ello, el aumento de la tasa de RC y su calidad ha obligado a desarrollar métodos más sensibles que permitan detectar EMR persistente en MO de aquellos pacientes que han alcanzado una RC. En paralelo, el desarrollo de estos nuevos métodos de detección de EMR ha obligado también a realizar una actualización paralela de los criterios de respuesta al tratamiento de forma que estos permitieran evaluar de manera más precisa y estandarizada la eficacia de los nuevos esquemas terapéuticos y redefinir grupos de pacientes con diferente riesgo pronóstico, una vez iniciado el tratamiento y alcanzada una RC ^{341, 349, 350}. Así, hoy sabemos que la ausencia de EMR constituye el factor pronóstico más relevante en el MM una vez instaurado el tratamiento ^{282, 351–353} y de forma especial, entre los pacientes que han alcanzado RC ^{215, 278, 284}.

Tal como hemos expuesto en la introducción de este trabajo, entre todos los métodos disponibles para la detección de EMR ^{215, 350}, las técnicas convencionales de citometría de flujo multiparamétrica han demostrado ser de gran utilidad. Esto es debido a que permiten identificar la persistencia de pequeñas cantidades de CP tumorales residuales, resistentes al tratamiento ($\leq 10^{-4}$) ²⁸⁷, en médula ósea (MO) de pacientes con MM en RC, asociándose la persistencia de EMR con un curso clínico más adverso y desfavorable de la enfermedad, independientemente del tratamiento recibido ^{284, 285, 290} o del riesgo citogenético de cada caso ²⁹².

Desde el punto de vista práctico, la citometría de flujo convencional es una técnica relativamente sensible que proporciona resultados de forma rápida ²⁹³, siendo aplicable a la práctica totalidad de los pacientes con MM, lo que supone una importante ventaja respecto a los estudios de biología molecular basados en la reacción en cadena de la polimerasa con sondas alelo-específicas (ASO-qPCR) o de secuenciación masiva (NGS, siglas del inglés “*next generation sequencing*”) ^{215, 281}. No obstante, con respecto a las técnicas moleculares, la citometría de flujo convencional sigue presentando algunas limitaciones a la hora de detectar EMR en MO de pacientes tratados con MM ^{279, 350}. Esto es debido a que tiene menor sensibilidad ($\approx 10^{-4}$; 0,01%) ²⁸⁷ y carece de estandarización ³¹⁶, empleando prácticamente cada laboratorio un panel de anticuerpos y una estrategia de análisis (subjetivos) distintos ³¹⁷. Ambos aspectos resultan especialmente limitantes si tenemos en cuenta que, con los nuevos tratamientos y la mejoría pronóstica asociada a los mismos, se alcanzan niveles de EMR cada vez más bajos, a la vez que el aumento de la supervivencia inherente a la mejor respuesta al tratamiento, hace que con mayor frecuencia esos pacientes puedan cambiar de centro de referencia para su seguimiento. Ante estos condicionantes, el primer objetivo de esta tesis doctoral se centró en diseñar y validar un nuevo método estandarizado y de alta sensibilidad, para la monitorización de EMR en muestras de MO de pacientes con MM, tras tratamiento. Además de validar clínicamente la utilidad de la detección de EMR con el nuevo método, nuestro primer objetivo se centró también en comparar la nueva estrategia de detección de EMR con los métodos más empleados en el momento, como la citometría de flujo convencional de 8-colores y la secuenciación masiva.

Por otra parte, hoy se reconoce que la presencia de CP tumorales circulantes (CPTC) en la sangre periférica de pacientes con distintas neoplasias de CP constituye uno de los factores pronósticos más relevantes, tanto cuando es estudiado al diagnóstico ^{141, 168, 169, 187, 188, 193, 194, 201} como tras tratamiento ^{202, 326, 327, 330, 331}. No obstante, las técnicas disponibles hasta la fecha para la detección de CPTC son relativamente poco sensibles y/o específicas y muy laboriosas, lo que hace que su utilización esté restringida a un número limitado de centros de referencia. En el caso de las técnicas moleculares más sensibles, se requiere además de una muestra basal (p.ej. del momento del diagnóstico) con una proporción importante ($\geq 5\%$) de CP tumorales para poder identificar el reordenamiento de los genes de inmunoglobulinas (Ig) presente en las mismas y que se empleará para la posterior detección de cantidades mínimas de CPTC ¹⁹⁷. Ante esta situación, el segundo objetivo de este trabajo doctoral se centró en evaluar la aplicabilidad y

utilidad clínica del nuevo método de citometría de flujo de elevada sensibilidad desarrollado, para la identificación y cuantificación de CPTC en sangre de pacientes con distintas neoplasias de CP (localizadas y sistémicas) al diagnóstico, y evaluar su posible impacto pronóstico, tanto en la GMSI como en el MM.

En el caso de que esta nueva estrategia inmunofenotípica mostrase la presencia sistemática de CPTC al diagnóstico en pacientes con MM, cabría entonces la posibilidad de que la recaída de la enfermedad tras RC, viniese también precedida de forma constante por la presencia de estas células tumorales en sangre periférica. Ante esta posibilidad, el tercer y último objetivo de este trabajo de tesis doctoral se centró en evaluar la posible presencia de CPTC en sangre de pacientes con MM tras tratamiento, e investigar su relación con i) la respuesta al tratamiento, determinada tanto mediante criterios convencionales (p.ej. RC) como a través del estudio de los niveles de EMR en MO, y ii) su posible impacto pronóstico.

A continuación, en este apartado de la memoria de la tesis doctoral discutiremos separadamente y de forma general, los resultados obtenidos en relación con cada uno de los tres objetivos planteados al inicio del trabajo.

1. Diseño y validación de un nuevo método de citometría de flujo de nueva generación para la monitorización de EMR en el MM

El estudio de los niveles de EMR en MO constituye uno de los parámetros más útiles en la monitorización clínica de los pacientes con MM, para predecir el pronóstico una vez iniciado el tratamiento, particularmente, en aquellos que han alcanzado RC ^{215, 278, 284}, independientemente del tipo de tratamiento administrado ^{287, 291, 354}. En el momento de iniciar este trabajo disponíamos de tres técnicas para la monitorización de EMR en la MO de pacientes con MM, con importantes diferencias entre ellas: citometría de flujo multiparamétrica convencional (de 4 a >8 colores) ²⁸⁷, ASO-qPCR ²¹⁴ y NGS ³²³. Las técnicas de citometría de flujo tienen importantes ventajas sobre los métodos moleculares en cuanto a la mayor rapidez con la que proporcionan los resultados, su elevada aplicabilidad ($\approx 100\%$) y mayor disponibilidad en los laboratorios de diagnóstico onco-hematológico ^{213, 215}. Por el contrario, se trata de una aproximación que carece de estandarización, asociada a una sensibilidad insuficiente y variable de un centro a otro ³¹⁶, requiriendo además de muestras frescas que deben ser procesadas en <24 horas ³¹⁷, lo que constituye un conjunto de

importantes limitaciones frente a las técnicas moleculares^{214, 355}, especialmente frente a las nuevas herramientas de secuenciación masiva³²³.

En este trabajo diseñamos, desarrollamos y validamos un nuevo método de citometría de flujo de nueva generación (NGF), estandarizado y de elevada sensibilidad, para la monitorización de EMR en (la práctica totalidad de) pacientes tratados con MM. Globalmente, el nuevo método desarrollado mostró una aplicabilidad similar a la de la citometría de flujo convencional, asociada a una sensibilidad significativamente más elevada ($\leq 2 \times 10^{-6}$ vs. $\leq 10^{-4}$, respectivamente) que permitía identificar EMR en cerca de una cuarta parte de los casos que no mostraban infiltración de MO por CP tumorales con la técnica inmunofenotípica convencional de citometría de 8-colores. Hasta donde conocemos, este es el primer estudio en el que se valida un ensayo de citometría de flujo de alta sensibilidad con un límite de detección cercano a 10^{-6} (<20 CP tumorales entre 10^7 células de MO) y un límite de cuantificación inferior a 5×10^{-6} (5 CP tumorales por millón de células analizadas, equivalente a 0,0005%). Además, el nuevo método aquí propuesto mostró una elevada reproducibilidad entre distintos laboratorios, una vez que cumple de forma estricta las recomendaciones del consorcio internacional para la detección de EMR en el MM³¹⁸, reforzando el alto grado de estandarización de la técnica.

Desde el punto de vista clínico, en este trabajo demostramos que la mayor sensibilidad del método desarrollado se traduce en una predicción más precisa del pronóstico de los pacientes estudiados, en términos de supervivencia libre de progresión de la enfermedad, mejorando con creces el valor predictivo de la citometría de flujo convencional de 8-colores, incluso al considerar de forma específica los pacientes con MM que alcanzarán RC o RC estricta con el tratamiento.

A nivel técnico, en el diseño y desarrollo de la citometría de flujo de nueva generación, actuamos principalmente a tres niveles diferentes respecto a las técnicas inmunofenotípicas convencionales de 8-colores: i) la optimización de la combinación de anticuerpos y conjugados fluorescentes de esos anticuerpos, ii) la adquisición de información sobre un número de células ≥ 10 veces más elevado, mediante la incorporación de nuevos protocolos estandarizados de preparación de muestra (procedimiento de lisis masiva de hematíes), y iii) el desarrollo de herramientas informáticas para el análisis automático de los datos de citometría. Así, el nuevo panel de anticuerpos incluye dos combinaciones de 8 anticuerpos en dos tubos que permiten, por un lado, la identificación de CP fenotípicamente aberrantes y, por otra parte, confirmar la naturaleza clonal de las mismas mediante la expresión restringida de las cadenas ligeras de las Ig

intracitoplasmáticas κ ο λ. Precisamente, la posibilidad de poder confirmar la naturaleza (mono)clonal de las CP fenotípicamente aberrantes, resultó de vital importancia en casos con niveles mínimos de EMR en MO, confiriendo mayor solidez al nuevo método frente a la citometría de flujo convencional.

En términos generales, los marcadores fenotípicos seleccionados por ser los más informativos para la identificación de las CP presentes en MO y la discriminación entre CP normales y tumorales, no diferían a grandes rasgos de los recomendados como esenciales, según el consenso de expertos en esta materia ^{208, 297, 356}. Sin embargo, entre las sugerencias de los expertos, no se especifican cuáles serían los clones de anticuerpos o los conjugados de fluorocromos idóneos para cada marcador, siendo este aspecto de suma importancia a la hora de disponer de un panel de anticuerpos óptimo para el estudio de EMR en el MM mediante citometría de flujo ³⁵⁶. De hecho, su relevancia se ve reflejada en que a pesar de conocer cuáles serían los eventuales marcadores claves ^{208, 297, 356}, la selección de los mejores clones y conjugados de fluorocromos para las dos combinaciones de anticuerpos del panel, requirió de cinco rondas de diseño, evaluación y rediseño, debido a que algunos de los reactivos disponibles mostraron una calidad sub-óptima asociada a i) marcaje inespecífico, ii) intensidad débil de fluorescencia, iii) interacciones no deseadas con otros anticuerpos y/o, iv) un marcaje deficiente a la hora de identificar las CP o distinguir dentro de ellas entre CP normales y CP aberrantes, especialmente en muestras de pacientes con MM tratados con anticuerpos anti-CD38 (p.ej. Daratumumab). Así, a modo de ejemplo, sólo dos de los 9 clones de anticuerpos anti-CD38 evaluados, mostraron capacidad para detectar la proteína CD38 sobre la superficie de la membrana de las CP de MO de pacientes con MM tratados con Daratumumab y, tan solo uno de esos dos clones, lo hacía de forma inequívoca en muestras tratadas *ex-vivo* con Isatuximab.

Uno de los aspectos clave a la hora de identificar de forma específica las CP de MO y discriminar dentro de ellas entre CP normales y CP tumorales, es la combinación concreta de marcadores (anticuerpos, clones y fluorocromos) empleados. Esto es debido a que la combinación de anticuerpos influye tanto en la especificidad como en la sensibilidad del método. No obstante, esta última depende también en gran medida del número de células analizadas ^{317, 318}. Precisamente por este motivo, en este trabajo desarrollamos un nuevo procedimiento de preparación y marcaje de muestras de MO que permite por primera vez, la evaluación sistemática de $>5 \times 10^6$ células por tubo que, con el panel de dos tubos propuestos, permite el análisis

sistemático de la presencia de EMR en MO de pacientes tratados con MM sobre un total de $>10^7$ células/muestra. Respecto a las técnicas convencionales de citometría de flujo con las que habitualmente se analizan $\leq 300\mu\text{L}$ de muestra (mediante protocolos de tinción-lisado-lavado) que como máximo contienen entre 1 y 2 millones de células, el nuevo procedimiento aquí descrito aseguraría la adquisición de información sobre un número de células significativamente superior ($>10^7$ células totales), como ha sido demostrado en la mayoría de las muestras de MO analizadas en el grupo de pacientes empleados en este trabajo para la validación del método. Sin embargo, ello requiere disponer de un volumen medio de 1,5mL de aspirado medular, para garantizar que se alcance el límite de detección y de cuantificación del método de $<2\times 10^{-6}$ y $<5\times 10^{-6}$, respectivamente.

En conjunto, el panel optimizado de marcadores aquí propuesto, junto con el nuevo procedimiento de preparación de muestras desarrollado para la monitorización de EMR en pacientes tratados con MM, contribuyen a la mayor sensibilidad alcanzada con la citometría de flujo de nueva generación, respecto a las técnicas inmunofenotípicas convencionales e, incluso, a la secuenciación masiva. En relación a esta última, cabe además señalar, la menor aplicabilidad observada para la técnica de NGS respecto a la NGF, lo que podría ser debido, al menos en parte, a las limitaciones asociadas al empleo de técnicas moleculares que requieren la amplificación de secuencias del gen *IGH* mediante el empleo de sondas que deben hibridar en segmentos específicos de ADN que flanquean estos genes, y que en CP (normales y/o tumorales) son ricos en mutaciones somáticas que pueden interferir con la hibridación de dichas sondas y, por tanto, con el resultado^{214, 215, 322}. Estas limitaciones técnicas podrían contribuir también a explicar la frecuencia relativamente alta de resultados discrepantes (30%), al comparar los niveles de EMR obtenidos con ambas técnicas entre sí, en muestras de pacientes que presentaron niveles bajos de infiltración por CP tumorales residuales ($<10^{-4}$). Sin embargo, debido al número relativamente limitado de muestras analizadas, estos resultados necesitan ser confirmados en estudios prospectivos sobre series más amplias de pacientes.

A pesar de estas limitaciones, la citometría de flujo de nueva generación, además de mostrar una mayor sensibilidad en este estudio, presenta otras ventajas respecto a las técnicas de secuenciación masiva³⁵⁷. Así, es una aproximación mucho más rápida (<4 horas), estandarizada, reproducible, aplicable a prácticamente el 100% de los pacientes, sin necesidad de disponer de información sobre una muestra del momento del diagnóstico o de pruebas adicionales,

proporcionando una sensibilidad y especificidad superponibles para distintos pacientes, junto con información adicional sobre la calidad y composición de la muestra analizada. Además, la citometría de flujo de nueva generación constituye una técnica susceptible de ser implementada en la mayoría de los laboratorios a nivel mundial, con un coste asequible e inferior al de las técnicas de secuenciación masiva ²¹⁵. Sin embargo, como la gran mayoría de las herramientas inmunofenotípicas de citometría ³¹⁷, requiere del análisis de una muestra fresca que debe ser procesada dentro de las primeras 24 horas después de su extracción, lo que le diferencia de los ensayos moleculares, cuyos resultados no se ven afectados de forma significativa cuando se aplican sobre muestras congeladas ²¹⁴.

De todas estas ventajas de la citometría de flujo de nueva generación cabe destacar, de forma especial, el hecho de que proporciona información acerca de la calidad de la muestra en cada paciente, con lo que permite evaluar (además de la presencia y nivel de EMR), la distribución de las distintas poblaciones celulares residuales presentes en MO. En este sentido, en este trabajo demostramos que en el caso de muestras hemodiluidas, se observa un descenso significativo del número de mastocitos CD117⁺⁺, de precursores eritroides nucleados (CD45⁻), de precursores mieloides (CD117⁺) y linfoides B (CD19⁺ CD38⁺⁺CD45^{débil}), así como de las CP normales más maduras (CD19⁻). Del mismo modo, las combinaciones de anticuerpos establecidas permiten evaluar la distribución de células B normales residuales de MO a lo largo de sus diferentes estadios madurativos, desde los precursores B (CD19⁺ CD38⁺⁺ CD45^{débil/intermedio} CD27⁺ y CD27⁻), a las células B inmaduras (CD19⁺ CD45⁺⁺ CD38^{débil}), los linfocitos B naïve (CD19⁺ CD38⁻ CD27⁻) y los linfocitos B de memoria (CD19⁺ CD38⁻ CD27⁺), así como las CP normales con sus respectivos compartimentos madurativos definidos según el patrón de expresión de CD19 y CD56 (CP inmaduras CD19⁺ CD56⁻, CP intermedias CD19⁻ CD56⁻ y CP maduras CD19⁻ CD56⁺).

En este sentido, en el presente trabajo detectamos una disminución del número de mastocitos en 10%-20% de las muestras de MO correspondientes a pacientes que habían alcanzado muy buena respuesta parcial o RC, siendo la proporción de casos con EMR negativa superior en estas muestras hemodiluidas respecto a aquellas en las que no se observaba hemodilución, quedando incluidas entre ellas las muestras de los dos únicos pacientes que a pesar de la negatividad para EMR, mostraron progresión de la enfermedad. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la necesidad de evaluar de forma sistemática la calidad de la muestra analizada, especialmente en aquellos aspirados medulares en los que no se detecta EMR por citometría de flujo de nueva

generación y, ante la posibilidad de que pueda existir contaminación con sangre, considerar la muestra como no evaluable. Con ello, seguramente se incrementaría el impacto pronóstico de la detección de EMR al permitir identificar de forma precoz resultados falsos negativos.

Aunque los resultados de este capítulo de la presente tesis doctoral se han publicado de forma relativamente reciente, han tenido ya un gran impacto en la comunidad científica y en la práctica clínica, al reconocerse el método de citometría de flujo de nueva generación desarrollado como la técnica de referencia para definir RC con EMR negativa por citometría de flujo según el Grupo Internacional de Trabajo en MM (IMWG)¹³⁷. Igualmente, esto se ha traducido en el desarrollo de i) reactivos comerciales en los que se incluyen en formato deshidratado las mezclas de anticuerpos de cada una de las dos combinaciones de 8-colores y ii) de un programa informático que integra los algoritmos desarrollados para el análisis automático de datos y la clasificación de las distintas poblaciones celulares de MO incluidas las CP patológicas, así como la elaboración automática de un informe estándar de resultados. Con ambas herramientas, se evitan errores de pipeteo y marcaje de las muestras, a la vez que se reduce de forma significativa la subjetividad en la interpretación e informe de los resultados de los estudios de EMR.

Uno de los interrogantes abiertos por la disponibilidad reciente de equipos de citometría capaces de evaluar simultáneamente ≥ 10 fluorescencias distintas, ha sido la posibilidad de fusionar las dos combinaciones de anticuerpos de 8-colores en una sola combinación de 10 fluorescencias, con lo que se ahorraría en el coste de los reactivos y se reduciría el tiempo de preparación y sobre todo, de adquisición de la muestra en el citómetro de flujo, tal como han planteado algunos autores³⁵⁸. En este sentido, la comparación directa del panel de 2-tubos de 8-colores y tres versiones diferentes de un tubo de 10-fluorescencias, mostró resultados muy similares entre sí. Aun así, entendemos que la disponibilidad de la información derivada de 2-tubos de 8-colores resulta más beneficiosa al permitir: i) analizar un mayor número de células, ii) confirmar en la segunda determinación la existencia o ausencia de CP tumorales presentes en la primera, e iii) incrementar la consistencia y precisión del resultado, al realizar el análisis de EMR por duplicado.

En resumen, el método de citometría de flujo de nueva generación desarrollado en el presente trabajo constituye una herramienta robusta, altamente sensible y estandarizada para la detección y monitorización de EMR en MO de pacientes con MM tras tratamiento, superando las limitaciones más importantes de la citometría de flujo convencional. Desde el punto de vista

clínico, nuestros resultados demuestran que el nuevo método mantiene e incrementa el valor pronóstico de la EMR, convirtiéndose así en el método de referencia para la monitorización de EMR por citometría en la MO de pacientes con MM tratados, tanto dentro como fuera de ensayos clínicos.

2. Detección de células plasmáticas tumorales circulantes en la sangre periférica de pacientes con neoplasias de células plasmáticas al diagnóstico y su impacto pronóstico

Desde que se conoce que la presencia de CPTC en sangre de pacientes con MM estudiados al diagnóstico constituye un importante factor pronóstico en esta enfermedad^{167,168}, se sabe que por sí solo no permite distinguir entre pacientes que presentan una gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y aquellos que tienen MM, dado que en ambos grupos de neoplasias de CP existen casos positivos y negativos para CPTC^{141,169}. No obstante, hoy día se reconoce también que a lo largo del tiempo se ha observado un incremento progresivo en la frecuencia de pacientes con GMSI y de MM que muestran CPTC en sangre periférica, a medida que ha ido aumentando la sensibilidad de las técnicas empleadas para su detección, desde las tinciones de citología convencional y de inmunohistoquímica, a las técnicas de microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo multiparamétrica^{141,169,170,200,330}. En este sentido, al disponer por primera vez de la técnica de citometría de flujo de nueva generación desarrollada en este trabajo de tesis doctoral, dotada de una sensibilidad significativamente más elevada que la citometría de flujo convencional a la hora de detectar pequeños porcentajes de CP tumorales en MO de pacientes tratados con MM, nos permitió plantear como segundo objetivo de este trabajo, investigar la frecuencia de pacientes con diferentes neoplasias (localizadas y sistémicas) de CP que presentan CPTC en sangre al diagnóstico, y su posible impacto en el comportamiento clínico y en la evolución de la enfermedad.

Como cabría esperar, la aplicación de la técnica de citometría de flujo de nueva generación permitió identificar la presencia de CPTC en la mayoría de los pacientes con GMSI ($\approx 60\%$) y en la totalidad de los MMQ y MM activos analizados, lo que representa un incremento del 100% en la tasa de casos positivos respecto a lo observado con las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofenotípicas convencionales: 59% vs. 19%-37% de las GMSI^{141,200}, 100% vs. 15%-50% de los MMQ^{188,200} y 100% vs. 50%-73% de los MM activos^{168,169,200}. Por el contrario, solo una pequeña

proporción de los pacientes diagnosticados de plasmocitoma solitario y MM macrofocal mostraron CPTC en sangre.

Aunque en el presente trabajo la investigación de CPTC en sangre no se acompañó de análisis paralelos de secuenciación masiva, estudios previos indican que el empleo de estas técnicas moleculares permite también detectar la presencia de CPTC en sangre con una sensibilidad similar de 1 CPTC entre 10^6 células analizadas, aunque con una menor aplicabilidad (96% vs. 100% para la NGF)^{197, 215}. En su conjunto, estos resultados confirman y amplían observaciones previas de otros autores que indican que la presencia de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP se asocia con un patrón de afectación sistémica de la enfermedad (GMSI, MMQ, MM y LCP)^{129, 170, 193, 200}, mientras que constituye un hallazgo relativamente infrecuente entre pacientes con tumores localizados de CP¹⁶⁷, como es el caso del plasmocitoma solitario o del MM macrofocal. Además, de acuerdo con estos estudios previos²⁰⁰, los resultados obtenidos en este trabajo muestran un incremento progresivo del número de CPTC en sangre medidos por citometría de flujo de nueva generación, desde el plasmocitoma solitario y el MM macrofocal, hasta la GMSI, el MMQ y el MM, permitiendo establecer puntos de corte (0,058 CPTC por μL de sangre) que con gran precisión (80% de especificidad y 80% de sensibilidad) permiten discriminar entre GMSI y MM al diagnóstico. Estos hallazgos sugieren la utilidad del recuento (absoluto) de los niveles de CPTC en sangre periférica por citometría de flujo de nueva generación, en el diagnóstico diferencial entre ambas neoplasias de CP, lo que permitiría un diagnóstico mínimamente invasivo entre GMSI y MM, al obviar la necesidad de la realización de un aspirado/biopsia de MO, al menos en una parte de estos pacientes.

Desde el punto de vista pronóstico, diversos estudios previos basados en técnicas inmunofenotípicas menos sensibles, refieren que la presencia de CPTC y/o sus niveles en sangre periférica se asocian con i) un mayor riesgo de transformación maligna de GMSI a MM^{141, 191}, y ii) un pronóstico más adverso en el MMQ y el MM, tanto cuando se estudian en el momento del diagnóstico^{170, 188, 189, 201, 331}, como tras tratamiento^{203, 330, 331}. En este sentido, los resultados de nuestro trabajo basados en la detección de CPTC en sangre mediante NGF, confirman y amplían estos hallazgos, aun cuando el número de pacientes estudiados y su seguimiento, han sido relativamente limitados. Así, los pacientes con GMSI que exhibían cifras más elevadas de CPTC en sangre mostraron un tiempo hasta la progresión a MM significativamente más corto que aquellos que no presentaban CPTC, o que mostraban niveles más bajos de CPTC en sangre.

Del mismo modo, los pacientes con MM activo que presentaban niveles más bajos de CPTC en sangre (similares a los encontrados entre los pacientes con GMSI), mostraron una supervivencia significativamente más prolongada que aquellos que mostraban niveles más elevados de CPTC en sangre, tanto en términos de supervivencia libre de progresión como de supervivencia global. Estas diferencias fueron además independientes de haber alcanzado o no RC y/o EMR negativa en MO con el tratamiento. En su conjunto, estos resultados refuerzan hallazgos previos de otros autores basados en el empleo de técnicas menos sensibles que la citometría de flujo de nueva generación, y que demuestran que la presencia de concentraciones elevadas de CPTC en sangre al diagnóstico, constituye un factor pronóstico adverso en el MM. No obstante, al incrementar notablemente la sensibilidad de detección de CPTC en nuestro trabajo, hemos podido identificar de forma más precisa, un pequeño subgrupo de pacientes con MM que presentan niveles bajos de CPTC al diagnóstico, similares a los observados habitualmente en la GMSI. Desde el punto de vista pronóstico, estos pacientes mostraron un comportamiento clínico más favorable a largo plazo, aun cuando persistían niveles detectables de EMR en MO tras tratamiento. Por el contrario, el impacto pronóstico del número de CPTC en sangre de pacientes con MMQ parece ser más limitado, e independiente del grupo de riesgo definido según los sistemas de estratificación pronóstica propuestos por la Clínica Mayo y por el Grupo Español de Mieloma ^{105, 106}, si bien este resultado debe ser interpretado con precaución debido al número relativamente limitado de casos analizados.

Ante el importante valor diagnóstico y pronóstico asociado a la presencia de niveles de CPTC en sangre, surgen interrogantes acerca de su verdadero significado biológico, que sigue siendo en gran medida desconocido ^{223, 359}. Empíricamente, se ha relacionado la presencia de un elevado número de CPTC en sangre con la diseminación de la enfermedad desde los nichos medulares ³⁶⁰, debido a la migración de las CP tumorales desde la MO a la circulación periférica ^{200, 221, 223}. Sin embargo, nuestros resultados junto con los de otros estudios recientes, evidencian que en comparación con las CP tumorales de MO, las CPTC presentes en sangre muestran un perfil inmunofenotípico más inmaduro, asociado a un mayor grado de quiescencia, mayor resistencia a agentes quimioterápicos y un potencial de autorrenovación más prominente ^{200, 217, 223, 224}. En conjunto, estos hallazgos sugieren que las CPTC en sangre podrían constituir las verdaderas células madre tumorales del MM, siendo potencialmente responsables de la diseminación de la

enfermedad, tanto a nivel medular como extramedular, independientemente de si derivan o no del compartimiento medular de células tumorales.

De acuerdo con esta hipótesis, en este trabajo confirmamos que las CP tumorales presentes en circulación periférica son inmunofenotípicamente más inmaduras que su contrapartida medular, al expresar niveles (significativamente) inferiores de i) marcadores típicamente adquiridos durante la migración de la CP desde los órganos linfoides secundarios hacia la MO, como CD38 intenso y CD138⁺ ^{4, 5, 28, 52, 297}, junto a ii) CD56, CD81 y CD117, moléculas de adhesión necesarias para el anclaje de la CP al estroma medular ^{4, 209, 302, 361}. Así mismo, nuestros resultados muestran niveles inferiores de expresión en CPTC *vs.* CP tumorales de MO de otros marcadores funcionales asociados a maduración, como i) Vs38c, una proteína del retículo endoplasmático rugoso relacionada directamente con una elevada capacidad de síntesis y secreción proteica ^{5, 307, 309} (p.ej. de Ig) y ii) la molécula coestimuladora CD27 ³⁶¹. Por el contrario, otros antígenos característicos de las fases más tempranas de la maduración B a CP, como CD19, CD45, CD20 y las Ig, mostraron niveles de expresión similares en CPTC respecto a su contrapartida medular. Esto podría ser debido a que se trata de marcadores cuya expresión aberrante en CP tumorales estaría en gran medida influenciado por las alteraciones genéticas específicas de estas células, más que por el estadio madurativo de las mismas. En este sentido, desde hace tiempo se conoce la relación directa que existe entre MM con expresión de CD20⁺ y la presencia de t(11;14) ³⁶². Estos hallazgos, junto a la menor positividad para el marcador de proliferación celular Ki67 en CPTC de sangre (*vs.* MO) sugieren que las CPTC podrían constituir un compartimiento de CP quiescentes y más inmaduras que su contrapartida medular, al igual que ocurre con las CP normales de sangre y MO ^{4, 9, 53}.

A pesar de todo lo anterior, cabe la posibilidad también de que las CPTC de pacientes con neoplasias de CP estén integradas por una mezcla de CP tumorales inmaduras (con fenotipo de célula madre) y otras más maduras (procedentes de MO). En cualquier caso, la mayor inmadurez de las CPTC de sangre frente a su contrapartida medular, sugiere que las CPTC detectadas en pacientes con GMSI y MM podrían tener un papel clave en la diseminación de la enfermedad, no solo a nivel extramedular, si no también y de forma preferente, a lo largo de la misma MO. En este sentido, la observación de cifras de CPTC más elevadas en sangre al diagnóstico, podría reflejar una mayor tasa de diseminación y con ello, una mayor (tasa de crecimiento de la) masa tumoral. Alternativamente, el incremento de CPTC en sangre a lo largo de la evolución de la

enfermedad, podría deberse a que, una vez están ocupados los nichos medulares por CP tumorales, estas se acumularían en sangre periférica.

De acuerdo con esta hipótesis, en este trabajo observamos una correlación significativa, pero no lineal, entre el número absoluto de CPTC en sangre y la masa tumoral presente en muestras pareadas de MO de pacientes con neoplasias de CP, con un repunte del número de CP normales circulantes en sangre en las fases más avanzadas de la enfermedad (MM) que contrasta con el descenso observado en estadios más tempranos (GMSI). Estos hallazgos sugieren que el incremento en la tasa de inmunoparesia desde la GMSI al MM^{363, 364} podría ser debido, más que a una disminución de la producción de CP normales, a una capacidad reducida de las mismas, a la hora de alcanzar los nichos medulares ocupados por CP tumorales, y de, una vez allí, diferenciarse a CP de vida larga productoras de anticuerpos. Así, la ocupación de los nichos medulares por CP del tumor limitaría la disponibilidad de nichos de supervivencia vacíos, lo que conllevaría al bloqueo progresivo (e inespecífico) de la migración de CP, tanto normales (CP de vida corta recién generadas en los órganos linfoides secundarios) como de las CPTC, con una acumulación a nivel periférico de ambos compartimentos de CP (normales y tumorales), especialmente visible en las formas más avanzadas de la enfermedad. No obstante, cabe la posibilidad de que debido a la naturaleza (más) longeva de las CPTC respecto a las CP normales, estas dispusieran de alguna ventaja a la hora de migrar y anclarse en los nichos medulares, facilitando así un crecimiento selectivo del tumor en MO, con un desplazamiento gradual y paralelo de las CP normales de vida larga allí residentes^{8, 359, 365}. Esto podría contribuir a explicar, al menos en parte, el desarrollo de un déficit progresivo de producción de anticuerpos (normales/residuales) diferentes del componente monoclonal (CM), y por consiguiente, la aparición de inmunoparesia, sello característico de las fases más avanzadas de las neoplasias de CP^{72, 106, 110, 111, 366, 367}.

Tomando en consideración todo lo anteriormente expuesto, podríamos concluir que la citometría de flujo de nueva generación permite detectar CPTC en sangre al diagnóstico, en la práctica totalidad de los pacientes con MMQ y MM, así como en la gran mayoría de las GMSI, lo que confirma la utilidad del empleo de técnicas de elevada sensibilidad para su estudio. Además, la presencia de CPTC en sangre de pacientes con neoplasias de CP constituye un rasgo diferencial característico de las formas clínicas que cursan con enfermedad diseminada, como la GMSI, el MMQ y el MM, mientras representa un hallazgo poco frecuente en pacientes con enfermedad

localizada, como el plasmocitoma solitario o el MM macrofocal. Así mismo, el número de CPTC en sangre periférica al diagnóstico se asocia con formas más agresivas de la enfermedad, observándose un incremento progresivo de los niveles de CPTC en sangre desde la GMSI al MMQ y el MM sintomático. Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de cifras más elevadas de CPTC en pacientes con GMSI, se asocia con mayor riesgo de progresión a MM y una supervivencia libre de progresión significativamente más corta; a su vez, aquellos pacientes con MM que muestran bajos recuentos de CPTC en sangre al diagnóstico (en el rango observado entre los pacientes con GMSI), muestran una supervivencia significativamente más prolongada, independientemente de la respuesta al tratamiento.

3. Utilidad clínica de la monitorización de células plasmáticas tumorales circulantes en sangre periférica mediante NGF en pacientes tratados con MM

En las últimas décadas, hemos asistido a un incremento notable de estrategias dirigidas a identificar la presencia de CPTC o de sus productos (CM, ADN o ARN tumorales) en sangre periférica^{204, 325}. Esto se debe a la reconocida utilidad clínica de la detección de EMR en MO de pacientes con MM, tras iniciar el tratamiento^{202, 326, 327, 330, 331}, junto al amplio abanico de ventajas que proporcionaría la monitorización de la enfermedad en sangre *vs.* MO, entre las que se incluyen: i) la naturaleza mínimamente invasiva que brinda el empleo de muestras de sangre respecto a los análisis de MO^{279, 325}, ii) la posibilidad de cuantificar de forma más precisa el número absoluto de CPTC en sangre, iii) además de la ausencia de hemodilución, y iv) la existencia de una distribución más homogénea del tumor en sangre *vs.* MO²⁷⁹. Además, la demostración de la presencia sistemática (mediante NGF) de CPTC en sangre al diagnóstico en pacientes con MM, y su posible relevancia en la diseminación de la enfermedad, junto con la existencia de una correlación directa entre los niveles de CP tumorales en sangre y MO, avalan el interés y la posible utilidad del rastreo de CPTC en sangre de pacientes con MM tras tratamiento. Por este motivo, el tercer objetivo de esta tesis doctoral se centró en determinar la frecuencia con la que se encuentran CPTC en la sangre de pacientes con MM tras haber recibido tratamiento, analizar su relación con la persistencia de EMR en MO y su posible el impacto pronóstico.

En conjunto, la citometría de flujo de nueva generación demostró la presencia de CPTC en alrededor de una cuarta parte (26%) de todos los pacientes tratados con MM analizados. Estos

hallazgos demuestran que el empleo de NGF duplicaría la frecuencia de pacientes en los que se detectan CP tumorales en la circulación periférica mediante técnicas inmunofenotípicas convencionales (18%-19%)^{203, 326, 327}, alcanzando tasas de positividad similares a las referidas en la literatura con herramientas moleculares de alta sensibilidad, como la ASO-qPCR (25%-28,8%)^{195, 210} y cercanas a las obtenidas con técnicas de secuenciación masiva dirigida al estudio de ADN libre circulante (31%-34%)^{204, 328} o de ADN genómico leucocitario (40%)²⁰⁴. Esta mayor sensibilidad de la citometría de flujo de nueva generación, se aprecia de forma más clara al restringir el análisis a aquellos pacientes que alcanzaron RC o RC estricta con el tratamiento, al detectarse la presencia de CPTC en 17% de las muestras de sangre estudiadas frente a tasas de 0%^{222, 331} o <8%^{203, 327} referidas en la literatura por otros autores, al emplear citometría de flujo convencional.

A pesar de esta mayor sensibilidad de la citometría de flujo de nueva generación, respecto a la citometría de flujo convencional a la hora de detectar la presencia de CPTC en sangre de pacientes con MM, nuestros resultados demuestran que, aun así, existía una proporción importante de casos que seguían mostrando EMR positiva en MO o CM en suero por inmunofijación, en ausencia de CPTC en sangre. A su vez, todos los casos que mostraron CPTC en sangre eran también positivos para EMR en MO, mientras que solo en alrededor del 60% persistía la presencia de CM sérico.

El hallazgo de EMR en MO y de CM en suero de mielomas tratados, habitualmente reflejan la persistencia de un mayor o menor número de células tumorales resistentes al tratamiento administrado³⁶⁸. No obstante, ninguno de estos parámetros refleja de forma específica la capacidad de diseminación y crecimiento tumoral, parámetros que en definitiva, tras tratamiento, determinan la mayor o menor probabilidad de progresión de la enfermedad a corto vs. largo plazo^{269, 272}. Por el contrario, la presencia de CPTC en sangre, no solo aporta información relacionada con la persistencia de células neoplásicas resistentes al tratamiento y la carga tumoral, sino que además reflejaría la capacidad que tienen esas células de diseminar el tumor a nivel de la MO o hacia localizaciones extramedulares^{369, 370}. De hecho, en alrededor de 10% de los casos analizados, se observaron niveles de CPTC en sangre similares o incluso superiores a los encontrados en muestras pareadas de MO de esos mismos pacientes. Estos hallazgos, junto con la descripción de un perfil inmunofenotípico más inmaduro de las CP tumorales de sangre

respecto a su contrapartida medular, refuerzan la hipótesis sobre el papel clave que presumiblemente tendrían las CPTC a la hora de diseminar la enfermedad.^{223, 224}

Desde el punto de vista práctico, resulta especialmente interesante el hecho de que todos los pacientes que mostraban CPTC en sangre mostraran también positividad para EMR en MO, independientemente de la respuesta clínica alcanzada con el tratamiento en ese momento. Estos datos sugieren que la detección de células tumorales circulantes en la sangre periférica de pacientes tratados con MM, podría emplearse como un marcador de persistencia de CP tumorales residuales en MO y de esta forma, actuar como guía a la hora de realizar o evitar la realización de procedimientos (más invasivos) para estudio de EMR, como el aspirado medular, especialmente en los pacientes que han alcanzado RC.

De forma similar, llama la atención la existencia de un grupo de pacientes con MM en los que, pese a detectar CM sérico por inmunofijación tras tratamiento, no mostraban CPTC en sangre, ni EMR en MO. Esto podría deberse a una vida media más prolongada (≈ 23 días) y/o una depuración sistémica alargada (≈ 29 semanas) del CM, especialmente en el caso de la IgG (el isotipo más común de proteína monoclonal)^{212, 291}, junto a la posible persistencia de enfermedad extramedular¹³⁷ y/o la administración terapéutica de anticuerpos monoclonales como Daratumumab³⁷¹, que podrían originar algunos falsos positivos observados en nuestra serie. Así mismo, estas discrepancias podrían estar relacionadas con la calidad de las muestras de MO (p.ej. con muestras de MO hemodiluidas), que se ha demostrado podría también dar lugar a falsos negativos en los estudios de EMR en MO asociados a positividad para CM sérico por inmunofijación, tal como observamos en un pequeño grupo de pacientes analizados. De igual manera, otro pequeño grupo de enfermos mostraron ausencia de proteína-M sérica, aun cuando cumplían criterios de respuesta parcial e, incluso, se encontraban en progresión tras tratamiento, siendo esto debido a la aparición o persistencia de plasmocitomas (2/4 casos)¹³⁷, a tumores no secretores^{272, 372} o a la existencia de un marcado desequilibrio entre las cadenas ligeras libres en suero clonal *vs.* normal (>500) en ausencia de CM en suero u orina¹³⁷.

De acuerdo con datos previos referidos en la bibliografía³²⁵, en su conjunto, nuestros resultados sugieren que el análisis de CPTC en sangre, aunque es menos sensible que la detección de EMR en MO, proporciona información relevante y complementaria a la de la inmunofijación, siendo de gran utilidad para la monitorización estrecha de pacientes con MM en sangre, una vez se haya iniciado el tratamiento.

Desde el punto de vista pronóstico, en este trabajo demostramos que la detección de CPTC en sangre de pacientes con MM tras tratamiento mediante NGF, constituye un importante factor pronóstico independiente de otras variables, a la hora de predecir la supervivencia libre de progresión, tanto cuando se consideran todos los pacientes, como cuando se restringe el análisis a aquellos casos que alcanzaron RC o RC estricta con el tratamiento. Estos resultados refuerzan el valor pronóstico de la determinación de CPTC en el MM, como herramienta complementaria a la detección del CM sérico por inmunofijación (en el conjunto de los pacientes) y al análisis de EMR en MO (entre los pacientes que han alcanzado RC), independientemente de la fase de tratamiento en la que se evalúe.

De acuerdo con estos resultados, construimos una escala de riesgo basada en aquellos parámetros que mostraban valor pronóstico independiente en el análisis multivariante, con el fin de identificar (tras tratamiento) pacientes con MM con distinta probabilidad de recaída. En este sentido, la persistencia de CP tumorales en sangre (y por definición también en MO) permite reconocer pacientes con MM que, aun estando en RC, presentan un pronóstico muy adverso con tasas de supervivencia libre de progresión a los dos años de entre 1% y 33%, según se considere el conjunto de los pacientes estudiados o de forma específica los que alcanzaron RC.

Estos resultados, junto con la demostración de la presencia sistemática de CPTC en la sangre periférica de la práctica totalidad de pacientes con MM estudiados al diagnóstico y en la recaída³³¹, sugieren que la detección de CPTC, más que un marcador de la respuesta al tratamiento, constituye una poderosa herramienta a la hora de identificar pacientes con elevado de riesgo de sufrir una recaída inminente²¹⁰. A su vez, la determinación de EMR en MO representaría un marcador de resistencia al tratamiento que refleja la persistencia de niveles mínimos de tumor en la MO de pacientes con MM sometidos a distintas estrategias terapéuticas y que, según los resultados aquí expuestos y los derivados de estudios previos de otros autores, tendría un importante valor pronóstico a más largo plazo, tanto cuando se emplean técnicas inmunofenotípicas convencionales^{284, 285, 290, 302, 354}, como análisis de elevada sensibilidad basados en secuenciación masiva^{321, 323} y citometría de flujo de nueva generación^{373, 374}.

En la actualidad, se considera que los estudios de EMR en MO de pacientes con MM que han alcanzado RC constituyen junto a las técnicas de imagen, el pilar fundamental sobre el que debe asentar el seguimiento de estos pacientes¹³⁷. No obstante, la obtención periódica de muestras de MO presenta importantes limitaciones relacionadas con la naturaleza invasiva del

procedimiento (de aspirado medular) mediante el que se obtienen ³²⁵. Por el contrario, resulta más fácil y asequible, la obtención periódica de muestras de sangre periférica para el rastreo de CPTC ³⁷⁵. En este sentido, el análisis secuencial de la presencia de CPTC en ≥ 2 muestras de sangre consecutivas junto con la detección del CM sérico mediante inmunofijación, evaluados en un subgrupo de nuestros pacientes, mostró que aquellos enfermos que de forma sistemática mostraban ausencia de CPTC en sangre (CPTC^{-/-}) o en los que esta determinación se negativizaba en el último estudio (CPTC^{+/-}), presentaban un pronóstico significativamente más favorable que los pacientes en los que se detectaron CPTC en sangre en la última evaluación (CPTC^{-/+} o CPTC^{+/+}), independientemente de la presencia o ausencia de proteína-M en suero. Estos resultados, caso se confirmen en series más amplias de pacientes con un mayor tiempo de seguimiento, sugieren que una vez alcanzada la RC, la monitorización secuencial (y frecuente) de la presencia de CPTC en sangre podría proporcionar información clínica de gran utilidad, especialmente entre aquellos pacientes en los que no se plantea la realización de estudios de MO de forma habitual, por ejemplo, por presentar un análisis negativo de EMR en MO, edad avanzada o co-morbilidades asociadas. Sin embargo, un pequeño grupo de los pacientes incluidos en este estudio mostraron positividad para CM en suero con inmunofijación (^{+/+} o ^{-/+}) en el último estudio, aunque carecían de CPTC en sangre (CPTC^{-/-} o CPTC^{+/-}). Paradójicamente, estos pacientes mostraron una ligera ventaja pronóstica sobre aquellos que presentaban ausencia de enfermedad tanto a nivel celular (CPTC^{-/-} o CPTC^{+/-}) como serológico (inmunofijación ^{-/-} o ^{+/-}), sin que existiera una explicación clara para estas diferencias. A pesar de ello, los hallazgos derivados de estudios secuenciales refuerzan la noción de que la investigación seriada de CPTC en sangre probablemente ofrezca un beneficio pronóstico adicional respecto al obtenido con una determinación puntual de CPTC e incluso, de EMR en MO, a la hora de predecir el comportamiento clínico a largo plazo, en línea con lo sugerido también por otros autores ^{192, 210}.

En resumen, nuestros hallazgos demuestran que la presencia de CPTC detectadas por citometría de flujo de nueva generación en sangre periférica de pacientes con MM tras tratamiento, constituye un nuevo marcador pronóstico independiente, a la hora de identificar aquellos pacientes que estén en riesgo de sufrir una recaída inminente, independientemente de la respuesta alcanzada o de la fase del tratamiento en el que detecte su presencia. Además, el estudio secuencial de CPTC podría ser de gran utilidad para una monitorización más estrecha de la enfermedad, especialmente en aquellos pacientes en los que no se plantee un análisis frecuente

de EMR en MO. El elevado valor pronóstico independiente de este parámetro, aunque requiere ser comprobado en series más amplias de pacientes con MM tratados dentro y fuera de ensayos clínicos, podría ser debido a que, más que informar sobre la carga tumoral del paciente en un determinado momento, sea un reflejo de la (potencial) capacidad de diseminación de la enfermedad.

-CONCLUSIONES-

En relación con el primer objetivo, orientado al diseño, desarrollo y validación de un nuevo método de citometría de flujo estandarizado y altamente sensible para la monitorización de enfermedad mínima residual (EMR) en médula ósea (MO) de pacientes con mieloma múltiple (MM) una vez iniciado el tratamiento:

1. El método de citometría de flujo de nueva generación (NGF) desarrollado supera las limitaciones actuales de las técnicas inmunofenotípicas convencionales en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad y análisis objetivo de los datos, incrementando el valor pronóstico de la detección de EMR en el MM. Por todo ello, la detección de EMR en MO mediante NGF, se ha convertido en el (nuevo) método de referencia de citometría de flujo para la evaluación de EMR en MO en el MM.
2. Los niveles de sensibilidad y especificidad alcanzados con el método de citometría de flujo de nueva generación desarrollado, son equiparables a los proporcionados por las técnicas de secuenciación masiva para análisis de EMR en MO de pacientes con MM, con la ventaja de tener una mayor aplicabilidad, ser más rápido y estandarizado, y permitir evaluar simultáneamente la calidad de la muestra.

En relación con el segundo objetivo, dirigido a evaluar la posible utilidad clínica y pronóstica del nuevo método de citometría de flujo de nueva generación para la detección y cuantificación al diagnóstico, de células plasmáticas tumorales circulantes (CPTC) en la sangre de pacientes con distintas neoplasias de células plasmáticas (CP):

3. La presencia al diagnóstico de CPTC en la sangre de pacientes con neoplasias de CP, detectadas mediante citometría de flujo de nueva generación, se asocia con un patrón de afectación sistémica de la enfermedad, estando presentes en la mayoría de los pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y en la práctica totalidad de los enfermos con MM quiescente (MMQ) y activo (MM), mientras que son infrecuentes en pacientes con plasmocitoma solitario y MM macrofocal. Además, el número de CPTC se incrementa progresivamente desde estas últimas entidades y la GMSI, al MMQ y el MM activo.
4. El hallazgo de un número elevado de CPTC en sangre mediante citometría de flujo de nueva generación, permite discriminar con elevada precisión entre pacientes con GMSI y

MM, asociándose con un comportamiento clínico adverso en ambas entidades, independientemente de la respuesta alcanzada con el tratamiento en el MM.

5. A nivel biológico, las CPTC de pacientes con neoplasias de CP muestran un perfil fenotípico de célula quiescente y más inmadura que su contrapartida medular, lo cual apoyaría la hipótesis de que puedan constituir un compartimiento celular enriquecido en células madre tumorales con un importante papel en la diseminación de la enfermedad, tanto dentro de la MO, como a órganos extramedulares.

En relación con el tercer objetivo, centrado en determinar la posible utilidad clínica y pronóstica del empleo de la citometría de flujo de nueva generación para el rastreo de CPTC en sangre periférica de pacientes con MM tras tratamiento, respecto a la monitorización de EMR en MO y del componente monoclonal (CM) en suero:

6. En alrededor de una cuarta parte de todos los pacientes tratados con MM, incluyendo una quinta parte de los pacientes que alcanzan respuesta completa (RC) con el tratamiento, se detecta la presencia de CPTC en sangre mediante citometría de flujo de nueva generación, constituyendo este parámetro una poderosa herramienta pronóstica a la hora de identificar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de sufrir una recaída temprana e inminente de su enfermedad.
7. La presencia de CPTC en la sangre de los pacientes tratados con MM mediante citometría de flujo de nueva generación, refleja de forma sistemática la persistencia de EMR en MO, independientemente de la respuesta alcanzada y de la fase del tratamiento en la que se analice. Por todo ello, la presencia de CPTC en la sangre de pacientes tratados con MM, podría ser de gran utilidad para orientar sobre la conveniencia de realizar o no un estudio adicional de EMR en MO en estos enfermos.
8. El análisis secuencial de la presencia de CPTC en sangre de pacientes tratados con MM mediante citometría de flujo de nueva generación, proporciona información pronóstica complementaria a la obtenida a través de la monitorización del CM sérico con técnica de inmunofijación, debiendo confirmarse estos resultados en series más amplias de pacientes con un mayor seguimiento.

Referencias bibliográficas

1. Abbas, Abul; Lichtman, Andrew and Pillai S: Cellular and Molecular Immunology (ed 9th). Philadelphia, PA, 2017
2. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H: B-cell biology and development, in Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013, pp 959–971
3. Manz RA, Radbruch A: Plasma cells for a lifetime? Eur J Immunol 32:923–927, 2002
4. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al: Human peripheral blood B-Cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. Cytom Part B - Clin Cytom 78:S47–S60, 2010
5. Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, et al: The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. Blood 99:2154–2161, 2002
6. Nagasawa T: Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. Nat Rev Immunol 6:107–116, 2006
7. Ho F, Lortan JE, McClennan ICM, et al: Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. Eur J Immunol 16:1297–1301, 1986
8. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al: Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell. Nat Rev Immunol 6:741–750, 2006
9. Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, et al: Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. J Allergy Clin Immunol 141:2208–2219, 2018
10. Benner R, Hijmans W, Haaijman JJ: The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. Clin Exp Immunol 46:1–8, 1981
11. Chu VT, Berek C: The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. Immunol Rev 251:177–188, 2013
12. Terstappen LWMM, Johnsen S, Segers-Nolten MJ, et al: Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. Blood 76:1739–1747, 1990
13. Tangye SG: Thucydides and longer-lived plasma cells. Blood 125:1684–1685, 2015
14. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, et al: Control systems and decision making for antibody production. Nat Immunol 11:681–688, 2010
15. Mesin L, Di Niro R, Thompson KM, et al: Long-Lived Plasma Cells from Human Small Intestine Biopsies Secrete Immunoglobulins for Many Weeks In Vitro. J Immunol 187:2867–2874, 2011
16. Cooper MD: B Lymphocytes. N Engl J Med 317:1452–1456, 1987
17. Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM: Regulation of germinal center B-cell differentiation. Immunol Rev 270:8–19, 2016
18. Suan D, Sundling C, Brink R: Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. Curr Opin Immunol 45:97–102, 2017
19. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, et al: Plasma cell development and survival. Immunol Rev 237:140–159, 2010
20. Kjeldsen MK, Perez-Andres M, Schmitz A, et al: Multiparametric flow cytometry for identification and fluorescence activated cell sorting of five distinct B-cell subpopulations in normal tonsil tissue. Am J Clin Pathol 136:960–969, 2011
21. Berkowska MA, van der Burg M, van Dongen JJM, et al: Checkpoints of B cell differentiation: Visualizing Ig-centric processes. Ann N Y Acad Sci 1246:11–25, 2011
22. Cho SF, Anderson KC, Tai YT: Targeting B cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: Potential uses of BCMA-based immunotherapy. Front Immunol 9, 2018
23. Shapiro-Shelef M, Calame KC: Regulation of plasma-cell development. Nat Rev Immunol 5:230–242, 2005
24. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al:

- BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. *J Exp Med* 199:91–97, 2004
25. Chu VT, Beller A, Nguyen TTN, et al: The Long-Term Survival of Plasma Cells. *Scand J Immunol* 73:508–511, 2011
26. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, et al: Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23:367–386, 2005
27. Wols HAM, Underhill GH, Kansas GS, et al: The Role of Bone Marrow-Derived Stromal Cells in the Maintenance of Plasma Cell Longevity. *J Immunol* 169:4213–4221, 2002
28. Jego G, Robillard N, Puthier D, et al: Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94:701–712, 1999
29. Defrance T, Taillardet M, Genestier L: T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* 23:330–336, 2011
30. Shlomchik MJ, Weisel F: Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* 247:52–63, 2012
31. LeBien TW, Tedder TF: B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112:1570–80, 2008
32. De Silva NS, Klein U: Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 15:137–148, 2015
33. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G: B cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol* 11:137–154, 2016
34. Xu Z, Zan H, Pone EJ, et al: Immunoglobulin class-switch DNA recombination: Induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 12:517–531, 2012
35. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, et al: Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102:553–563, 2000
36. Stavnezer J, Schrader CE: IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *J Immunol* 193:5370–5378, 2014
37. Hwang JK, Alt FW, Yeap L-S: Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination, in *Mobile DNA III*. 2015, pp 325–348
38. Yu X, Tsibane T, McGraw PA, et al: Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* 455:532–536, 2008
39. Kometani K, Kurosaki T: Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 33:64–69, 2015
40. Mond JJ, Vos Q, Lees A, et al: T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7:349–354, 1995
41. Harada H, Kawano MM, Huang N, et al: Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81:2658–63, 1993
42. Llinàs L, Lázaro A, de Salort J, et al: Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry. *Immunol Lett* 134:113–121, 2011
43. Robillard N, Wuillème S, Moreau P, et al: Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. *Front Immunol* 5:137, 2014
44. Matesanz-Isabel J, Sintes J, Llinàs L, et al: New B-cell CD molecules. *Immunol Lett* 134:104–112, 2011
45. Kalina T, Fišer K, Pérez-Andrés M, et al: CD maps—dynamic profiling of CD1–CD100 surface expression on human leukocyte and lymphocyte subsets. *Front Immunol* 10:2434, 2019
46. Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Brieva JA: Differential expression of SLAMS and other modulatory molecules by human plasma cells during normal maturation. *Immunol Lett* 134:122–128, 2011
47. Rudolf-Oliveira RCM, Auat M, Cardoso CC, et al: Determination of normal expression patterns of CD86, CD210a, CD261, CD262, CD264, CD358, and CD361 in peripheral blood and bone marrow cells by flow cytometry. *Immunol Lett* 194:44–55, 2018
48. Clavarino G, Delouche N, Vettier C, et al: Novel strategy for phenotypic characterization of Human B lymphocytes from precursors to

effector cells by flow cytometry. *PLoS One* 11:1–16, 2016

49. De Vos J, Hose D, Rème T, et al: Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunol Rev* 210:86–104, 2006

50. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, et al: An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 114:5173–5181, 2009

51. Paiva B, Gutiérrez NC, Chen X, et al: Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia* 26:1862–1869, 2012

52. Caraux A, Klein B, Paiva B, et al: Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138 plasma cells. *Haematologica* 95:1016–1020, 2010

53. Blanco E, Perez-Andres M, Sanoja-Flores L, et al: Selection and validation of antibody clones against IgG and IgA subclasses in switched memory B-cells and plasma cells. *J Immunol Methods* 475:112372, 2019

54. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Gis Bataille R: Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 105:4845–4848, 2005

55. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, et al: Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytom Part B - Clin Cytom* 80 B:318–323, 2011

56. Robillard N, Jego G, Pellat-Deceunynck C, et al: CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 4:1521–1526, 1998

57. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, et al: Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytom Part B Clin Cytom* 90:61–72, 2016

58. Pellat-Deceunynck C, Bataille R: Normal and malignant human plasma cells: Proliferation,

differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells, Mol Dis* 32:293–301, 2004

59. Pinto D, Montani E, Bolli M, et al: A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* 121:4110–4114, 2013

60. Jennings CD, Foon KA: Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90:2863–2892, 1997

61. Arana P, Paiva B, Cedena MT, et al: Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: A PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials. *Leukemia* 32:971–978, 2018

62. Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, et al: Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *Cytom Part B - Clin Cytom* 78:231–238, 2010

63. Mei HE, Wirries I, FrölichFr D, et al: A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow. *Blood* 125:1739–1748, 2015

64. Slifka MK, Ahmed R: Long-term humoral immunity against viruses: Revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol* 4:394–400, 1996

65. Tellier J, Nutt SL: Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. *Eur J Immunol* 49:30–37, 2019

66. Gutzeit C, Chen K, Cerutti A: The enigmatic function of IgD: some answers at last. *Eur J Immunol* 48:1101–1113, 2018

67. Späth PJ: Structure and function of immunoglobulins. *Sepsis* 3:197–218, 1999

68. Landsverk OJB, Snir O, Casado RB, et al: Antibody-secreting plasma cells persist for decades in human intestine. *J Exp Med* 214:309–317, 2017

69. Pihlgren M, Friedli M, Tougne C, et al: Reduced Ability of Neonatal and Early-Life Bone Marrow Stromal Cells to Support Plasmablast Survival. *J Immunol* 176:165–172, 2006

70. Butler JE, Zhao Y, Sinkora M, et al: Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol* 33:321–333, 2009
71. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127:2375–2390, 2016
72. McKenna R.W, Kyle R.A, Kuehli W.M, Grogan T.M, Harris N.L CR.: Plasma cells neoplasms, in World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue IARC (ed 4th). Lyon, 2008, pp 200–208
73. Swerdlow Steven H., Campo Elias, Harris Nancy Lee, et al: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS -. 2017
74. Palumbo AAK: Multiple myeloma. *N Engl J Med* 364:1046–1060, 2011
75. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al: Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim* 3:17046, 2017
76. Sykes DB, Schroyens W, O'Connell C: The TEMPI syndrome - A novel multisystem disease. *N Engl J Med* 365:475–477, 2011
77. Rosado FG, Oliveira JL, Sohani AR, et al: Bone marrow findings of the newly described TEMPI syndrome: when erythrocytosis and plasma cell dyscrasia coexist. *Mod Pathol* 28:367–372, 2015
78. Kyle RA, Child JA, Anderson K, et al: Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: A report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 121:749–757, 2003
79. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M: Multiple myeloma. *Lancet* 385:2197–2208, 2015
80. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al: International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: Spotlight review. *Leukemia* 23:2210–2221, 2009
81. Morgan GJBAW and FED: The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 12:335–348, 2012
82. López-Corral L, Gutiérrez NC, Vidriales MB, et al: The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin Cancer Res* 17:1692–1700, 2011
83. Boyle EM, Davies FE, Leleu X, et al: Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica* 99:605–612, 2014
84. Kyle RA, Rajkumar SV: Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 351:1860–1873, 2004
85. Dhodapkar M V: Perspectives MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood* 128:2599–2606, 2016
86. Görgün GT, Whitehill G, Anderson JL, et al: Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood* 121:2975–2987, 2013
87. Terpos E, Christoulas D, Gavriatopoulou M: Biology and treatment of myeloma related bone disease. *Metabolism* 80:80–90, 2018
88. Panaroni C, Yee AJ, Raje NS: Myeloma and Bone Disease. *Curr Osteoporos Rep* 15:483–498, 2017
89. Kumar S, Witzig TE, Greipp PR, et al: Bone marrow angiogenesis and circulating plasma cells in multiple myeloma. *Br J Haematol* 122:272–274, 2003
90. Kyle RA, Vincent Rajkumar S: Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 134:573–589, 2006
91. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al: Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 354:1362–1369, 2006
92. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al: A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 346:564–569, 2002
93. Cohen HJ, Crawford J, Rao MK, et al: Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *Am J Med* 104:439–444, 1998
94. Rajkumar SV, Lacy MQ, Kyle RA: Monoclonal gammopathy of undetermined significance and

smoldering multiple myeloma. *Blood Rev* 21:255–265, 2007

95. Bladé J: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 355:2765–2770, 2006

96. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al: International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 15:e538–e548, 2014

97. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, et al: Long-term follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 378:241–249, 2018

98. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, et al: Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* 375:1721–1728, 2010

99. Kristinsson SY, Tang M, Pfeiffer RM, et al: Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of infections: A population-based study. *Haematologica* 97:854–858, 2012

100. Gertz MA: Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis: 2020 Update on Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Am J Hematol* 91:ajh.25819, 2020

101. Bhat A, Selmi C, Naguwa SM, et al: Currents Concepts on the Immunopathology of Amyloidosis. *Clin Rev Allerg Immunol* 38:97–106, 2010

102. Muchtar E, Jevremovic D, Dispenzieri A, et al: The prognostic value of multiparametric flow cytometry in AL amyloidosis at diagnosis and at the end of first-line treatment. *Blood* 129:82–87, 2017

103. Puig N, Paiva B, Lasa M, et al: Flow cytometry for fast screening and automated risk assessment in systemic light-chain amyloidosis. *Leukemia* 33:1256–1267, 2019

104. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos M-V: Smoldering multiple myeloma. *Blood* 125:3069–75, 2015

105. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al: Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 356:2582–2590, 2007

106. Pérez-Persona E, Vidriales M-B, Mateo G, 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* 110:2586–92, 2007

107. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68:7–30, 2018

108. Caers J, Garderet L, Kortüm KM, et al: European myeloma network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: What to use and when. *Haematologica* 103:1772–1784, 2018

109. Fahey JL, Scoggins R, Utz JP, et al: Infection, antibody response and gamma globulin components in multiple myeloma and macroglobulinemia. *Am J Med* 35:698–707, 1963

110. Pratt G, Goodyear O, Moss P: Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 138:563–579, 2007

111. Guillerey C, Nakamura K, Vuckovic S, et al: Immune responses in multiple myeloma: Role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies. *Cell Mol Life Sci* 73:1569–1589, 2016

112. Bataille R, Harousseau J: Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 336:1657–1664, 1997

113. Sørrig R, Klausen TW, Salomo M, et al: Risk factors for blood stream infections in multiple myeloma: A population-based study of 1154 patients in Denmark. *Eur J Haematol* 101:21–27, 2018

114. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist U-H, et al: Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica* 100:107–113, 2015

115. Augustson BM, Begum G, Dunn JA, et al: 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* 23:9219–9226, 2005

116. Brioli A, Klaus M, Sayer H, et al: The risk of

infections in multiple myeloma before and after the advent of novel agents: a 12-year survey. *Ann Hematol* 98:713–722, 2019

117. Fan J, Hou J, Du J, et al: Macrofocal Multiple Myeloma Is a Particular Subgroup of Multiple Myeloma. *Blood* 126:1855 LP-1855, 2015

118. Dimopoulos MA, Pouli A, Anagnostopoulos A, et al: Macrofocal multiple myeloma in young patients: A distinct entity with favorable prognosis. *Leuk Lymphoma* 47:1553–1556, 2006

119. Katodritou E, Kastiris E, Gatt ME, et al: Real-World Data on Incidence, Clinical Characteristics and Outcome of Patients with Macrofocal Multiple Myeloma (MFMM) in the Era of Novel Therapies: A Study of the Greco-Israeli Collaborative Myeloma Working Group. *Blood* 132:3295–3295, 2018

120. Rasche L, Buros A, Weinhold N, et al: The Clinical Impact of Macrofocal Disease in Multiple Myeloma Differs Between Presentation and Relapse. *Blood* 128:4431–4431, 2016

121. Dimopoulos MA, Mouloupoulos LA, Maniatis A, et al: Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood* 96:2037–44, 2000

122. Gundesen MT, Lund T, Moeller HEH, et al: Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr Oncol Rep* 21:1–10, 2019

123. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED: Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 133:813–818, 1974

124. Gonsalves WI, Rajkumar SV, Go RS, et al: Trends in survival of patients with primary plasma cell leukemia: a population-based analysis. *Blood* 124:907–912, 2014

125. Jurczynszyn A, Castillo JJ, Avivi I, et al: Secondary plasma cell leukemia: a multicenter retrospective study of 101 patients. *Leuk Lymphoma* 60:118–123, 2019

126. Ravi P, Kumar SK, Roeker L, et al: Revised diagnostic criteria for plasma cell leukemia: results of a Mayo Clinic study with comparison of outcomes to multiple myeloma. *Blood Cancer J* 8:1–6, 2018

127. Musto P, Statuto T, Valvano L, et al: An update on biology, diagnosis and treatment of

primary plasma cell leukemia. *Expert Rev Hematol* 12:245–253, 2019

128. García-Sanz R, Orfão A, González M, et al: Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 93:1032–1037, 1999

129. Fernández De Larrea C, Kyle RA, Durie BGM, et al: Plasma cell leukemia: Consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 27:780–791, 2013

130. Weber DM: Solitary bone and extramedullary plasmacytoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 373–376, 2005

131. Oriol A: Multiple myeloma with extramedullary disease. *Adv Ther* 28:1–6, 2011

132. Kilciksiz S, Karakoyun-Celik O, Agaoglu FY, et al: A Review for Solitary Plasmacytoma of Bone and Extramedullary Plasmacytoma. *Sci World J* 2012:1–6, 2012

133. Mouloupoulos LA, Dimopoulos MA, Weber D, et al: Magnetic resonance imaging in the staging of solitary plasmacytoma of bone. *J Clin Oncol* 11:1311–1315, 1993

134. Soutar R, Lucraft H, Jackson G, et al: Guidelines on the diagnosis and management of solitary plasmacytoma of bone and solitary extramedullary plasmacytoma. *Clin Oncol* 16:405–413, 2004

135. Katodritou E, Terpos E, Symeonidis AS, et al: Clinical features, outcome, and prognostic factors for survival and evolution to multiple myeloma of solitary plasmacytomas: A report of the Greek myeloma study group in 97 patients. *Am J Hematol* 89:803–808, 2014

136. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al: Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol* 33:2863–2869, 2015

137. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al: International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 17:e328–e346, 2016

- 138.** Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, et al: Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 106:812–817, 2005
- 139.** Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, et al: Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 27:208–212, 2013
- 140.** 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* 117:5573–5581, 2011
- 141.** Kumar S, Rajkumar SV, Kyle RA, et al: Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Oncol* 23:5668–5674, 2005
- 142.** Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, et al: Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 111:785–789, 2008
- 143.** Lakshman A, Vincent Rajkumar S, Buadi FK, et al: Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria. *Blood Cancer J* 8:59, 2018
- 144.** De Larrea CF, Isola I, Pereira A, et al: Evolving M-protein pattern in patients with smoldering multiple myeloma: Impact on early progression. *Leukemia* 32:1427–1434, 2018
- 145.** Rosiñol L, Bladé J, Esteve J, et al: Smoldering multiple myeloma: Natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol* 123:631–636, 2003
- 146.** Ravi P, Kumar S, Larsen JT, et al: Evolving changes in disease biomarkers and risk of early progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Cancer J* 6:e454, 2016
- 147.** Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R, et al: Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: Comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* 148:110–114, 2009
- 148.** Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, et al: Lenalidomide plus dexamethasone versus observation in patients with high-risk smoldering multiple myeloma (QuiRedex): long-term follow-up of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17:1127–1136, 2016
- 149.** Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, et al: Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 369:438–447, 2013
- 150.** Lonial S, Jacobus S, Fonseca R, et al: Randomized Trial of Lenalidomide Versus Observation in Smoldering Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 38:1126–1137, 2020
- 151.** Holland J, Trenkner DA, Wasserman TH, et al: Plasmacytoma. Treatment results and conversion to myeloma. *Cancer* 69:1513–1517, 1992
- 152.** Jackson A, Howard Scarffe J: Prognostic significance of osteopenia and immunoparesis at presentation in patients with solitary myeloma of bone. *Eur J Cancer Clin Oncol* 26:363–371, 1990
- 153.** Hill QA, Rawstron AC, De Tute RM, et al: Outcome prediction in plasmacytoma of bone: A risk model utilizing bone marrow flow cytometry and light-chain analysis. *Blood* 124:1296–1299, 2014
- 154.** Paiva B, Chandia M, Vidriales MB, et al: Multiparameter flow cytometry for staging of solitary bone plasmacytoma: New criteria for risk of progression to myeloma. *Blood* 124:1300–1303, 2014
- 155.** Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al: Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol* 30:989–995, 2012
- 156.** Tovar N, Rodríguez-Lobato LG, Cibeira MT, et al: Bone marrow plasma cell infiltration in light chain amyloidosis: impact on organ involvement and outcome. *Amyloid* 25:79–85, 2018
- 157.** Muchtar E, Dispenzieri A, Kumar SK, et al: Immunoparesis in newly diagnosed AL amyloidosis is a marker for response and survival. *Amyloid* 24:40–41, 2017
- 158.** Durie BGM, Salmon SE: A clinical staging

system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36:842–854, 1975

159. Bataille R, Durie BGM, Grenier J: Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *Br J Haematol* 55:439–447, 1983

160. Bataille R, Durie BGM, Grenier J, et al: Prognostic factors and staging in multiple myeloma: A reappraisal. *J Clin Oncol* 4:80–87, 1986

161. Greipp PR, Miguel JS, Dune BGM, et al: International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23:3412–3420, 2005

162. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al: Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101:4569–4575, 2003

163. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, et al: High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med* 115:931–935, 1991

164. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, et al: High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. *Eur J Haematol* 85:114–119, 2010

165. Koulieris E, Panayiotidis P, Harding SJ, et al: Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol* 1:9, 2012

166. Levin A, Hari P, Dhakal B: Novel biomarkers in multiple myeloma. *Transl Res* 201:49–59, 2018

167. Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, et al: Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 88:1780–7, 1996

168. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, et al: Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 106:2276–2279, 2005

169. Gonsalves WI, Rajkumar SV, Gupta V, et al:

Quantification of clonal circulating plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma: implications for redefining high- risk myeloma. *Leukemia* 28:2060–2065, 2014

170. An G, Qin X, Acharya C, et al: Multiple myeloma patients with low proportion of circulating plasma cells had similar survival with primary plasma cell leukemia patients. *Ann Hematol* 94:257–264, 2015

171. Granell M, Calvo X, Garcia-Guiñón A, et al: Prognostic impact of circulating plasma cells in patients with multiple myeloma: Implications for plasma cell leukemia definition. *Haematologica* 102:1099–1104, 2017

172. Bae MH, Park C-J, Kim BH, et al: Increased circulating plasma cells detected by flow cytometry predicts poor prognosis in patients with plasma cell myeloma. *Cytometry B Clin Cytom* 94:493–499, 2018

173. Atkin C, Richter A, Sapey E: What is the significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance? *Clin Med J R Coll Physicians London* 18:391–396, 2018

174. Hillengass J, Fechtner K, Weber M-A, et al: Prognostic Significance of Focal Lesions in Whole-Body Magnetic Resonance Imaging in Patients With Asymptomatic Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 28:1606–1610, 2010

175. Merz M, Hielscher T, Wagner B, et al: Predictive value of longitudinal whole-body magnetic resonance imaging in patients with smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 28:1902–1908, 2014

176. Siontis B, Kumar S, Dispenzieri A, et al: Positron emission tomography-computed tomography in the diagnostic evaluation of smoldering multiple myeloma: Identification of patients needing therapy. *Blood Cancer J* 5:e364–e364, 2015

177. Varettoni M, Corso A, Pica G, et al: Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple myeloma: A longitudinal study on 1003 consecutive patients. *Ann Oncol* 21:325–330, 2010

178. Pour L, Sevcikova S, Greslikova H, et al: Soft-tissue extramedullary multiple myeloma prognosis is significantly worse in comparison to

bone-related extramedullary relapse. *Haematologica* 99:360–364, 2014

179. Lee SE, Kim JH, Jeon YW, et al: Impact of extramedullary plasmacytomas on outcomes according to treatment approach in newly diagnosed symptomatic multiple myeloma. *Ann Hematol* 94:445–452, 2014

180. Bladé J, Fernández De Larrea C, Rosiñol L, et al: Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: Incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *J Clin Oncol* 29:3805–3812, 2011

181. Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V, et al: Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood* 109:1692–700, 2007

182. Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Tabernero MD, et al: Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 91:3366–3367, 1998

183. Rajkumar SV, Kumar S: Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* 91:101–119, 2016

184. Miller A, Asmann Y, Cattaneo L, et al: High somatic mutation and neoantigen burden are correlated with decreased progression-free survival in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 7:e612, 2017

185. Blum A, Bazou D, O’Gorman P: Smoldering multiple myeloma: prevalence and current evidence guiding treatment decisions. *Blood Lymphat Cancer Targets Ther* Volume 8:21–31, 2018

186. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, et al: Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: Incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantatio. *Blood* 108:1724–1732, 2006

187. Witzig TE, Kyle RA, O’Fallon WM, et al: Detection of peripheral blood plasma cells as a predictor of disease course in patients with smouldering multiple myeloma. *Br J Haematol*

87:266–272, 1994

188. Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, et al: High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 27:680–5, 2013

189. Gonsalves WI, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al: Quantification of circulating clonal plasma cells via multiparametric flow cytometry identifies patients with smoldering multiple myeloma at high risk of progression. *Leukemia* 31:130–135, 2017

190. Vagnoni D, Travaglini F, Pezzoni V, 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* 170:523–531, 2015

191. Periago A, Campillo JA, Mrowiec A, et al: Circulating aberrant plasma cells allow risk stratification of patients with myeloma. *Am J Hematol* 91:E353–E355, 2016

192. Chakraborty R, Muchtar E, Kumar SK, et al: Serial measurements of circulating plasma cells before and after induction therapy has an independent prognostic impact in patients with multiple myeloma undergoing upfront autologous transplantation. *Haematologica* 102:1439–1445, 2017

193. Witzig TE, Dhodapkar M V, Kyle RA, et al: Quantitation of circulating peripheral blood plasma cells and their relationship to disease activity in patients with multiple myeloma. *Cancer* 72:108–113, 1993

194. Billadeau D, Quam L, Thomas W, et al: Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood* 80:1818–1824, 1992

195. Huhn S, Weinhold N, Nickel J, et al: Circulating tumor cells as a biomarker for response to therapy in multiple myeloma patients treated within the GMMG-MM5 trial. *Bone Marrow Transplant* 1–5, 2017

196. Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, et al: Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry* 26:113–120, 1996

197. Vij R, Mazumder A, Klinger M, et al: Deep Sequencing Reveals Myeloma Cells in Peripheral Blood in Majority of Multiple Myeloma Patients. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 14:131–139, 2014
198. Touzeau C, Pellat-Deceunynck C, Gastinne T, et al: Reactive plasmacytoses can mimic plasma cell leukemia: Therapeutical implications. *Leuk Lymphoma* 48:207–208, 2007
199. Gounari E, Tsavdaridou V, Koletsis T, et al: Utility of hematology analyzer and flow cytometry in timely and correct detection of circulating plasma cells: Report of three cases. *Cytometry B Clin Cytom* 90:531–537, 2016
200. Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, et al: 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* 88:289–296, 1996
201. Gonsalves WL, Jevremovic D, Nandakumar B, et al: Enhancing the R-ISS classification of newly diagnosed multiple myeloma by quantifying circulating clonal plasma cells. *Am J Hematol* 95:310–315, 2020
202. Gertz MA, Witzig TE, Pineda AA, et al: Monoclonal plasma cells in the blood stem cell harvest from patients with multiple myeloma are associated with shortened relapse-free survival after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 19:337–342, 1997
203. Chakraborty R, Muchtar E, Kumar SK, et al: Risk stratification in myeloma by detection of circulating plasma cells prior to autologous stem cell transplantation in the novel agent era. *Blood Cancer J* 6:1–6, 2016
204. Oberle A, Brandt A, Voigtlaender M, et al: Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. *Haematologica* 102:1105–1111, 2017
205. Foulk B, Schaffer M, Gross S, et al: Enumeration and characterization of circulating multiple myeloma cells in patients with plasma cell disorders. *Br J Haematol* 180:71–81, 2018
206. Swennenhuis JF, van Dalum G, Zeune LL, et al: Improving the CellSearch® system. *Expert Rev Mol Diagn* 16:1291–1305, 2016
207. Witzig TE, Meyers C, Therneau T, et al: A prospective study of CD38/45 flow cytometry and immunofluorescence microscopy to detect blood plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 38:345–350, 2000
208. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al: Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 93:431–438, 2008
209. Schmidt-Hieber M, Pérez-Andrés M, Paiva B, et al: CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica* 96:328–332, 2011
210. Korthals M, Sehnke N, Kronenwett R, et al: Molecular Monitoring of Minimal Residual Disease in the Peripheral Blood of Patients with Multiple Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 19:1109–1115, 2013
211. Chapman JR, Thoren KL: Tracking of low disease burden in multiple myeloma: Using mass spectrometry assays in peripheral blood. *Best Pract Res Clin Haematol* 33:101142, 2020
212. Drayson M, Morgan G, Jackson G, et al: Prospective Study of Serum FLC and Other M-Protein Assays: When and How to Measure Response? *Clin Lymphoma Myeloma* 9:S56, 2012
213. Bai Y, Orfao A, Chim CS: Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol* 181:11–26, 2018
214. Puig N, Balanzategui A, Martínez J, et al: Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* 28:391–397, 2014
215. Paiva B, Dongen JJM Van, Orfao A: New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood* 125:3059–3069, 2015
216. Yao Q, Bai Y, Orfao A, et al: Upgraded Standardized Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Sequencing in Multiple

Myeloma. *J Mol Diagnostics* 22:679–684, 2020

217. Mishima Y, Paiva B, Shi J, et al: The Mutational Landscape of Circulating Tumor Cells in Multiple Myeloma. *Cell Rep* 19:218–224, 2017

218. Garcés J-J, Simicek M, Vicari M, et al: Transcriptional profiling of circulating tumor cells in multiple myeloma: a new model to understand disease dissemination. *Leukemia* 34:589–603, 2020

219. Ledergor G, Weiner A, Zada M, et al: Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nat Med* 24:1867–1876, 2018

220. Manier S, Park J, Capelletti M, et al: Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun* 9:1–11, 2018

221. Ghobrial IM: Myeloma as a model for the process of metastasis: Implications for therapy. *Blood* 120:20–30, 2012

222. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, et al: Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol* 97:46–55, 1997

223. Paiva B, Paino T, Sayagues J-M, et al: Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood* 122:3591–3598, 2013

224. Kumar S, Rajkumar SV, Greipp PR, et al: Cell proliferation of myeloma plasma cells: Comparison of the blood and marrow compartments. *Am J Hematol* 77:7–11, 2004

225. Azab AK, Hu J, Quang P, et al: Hypoxia promotes dissemination of multiple myeloma through acquisition of epithelial to mesenchymal transition-like features. *Blood* 119:5782–5794, 2012

226. Lohr JG, Kim S, Gould J, et al: Genetic interrogation of circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution. *Sci Transl Med* 8, 2016

227. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*

113:5412–5417, 2009

228. Merlini G: Determining the significance of MGUS. *Blood* 123:305–307, 2014

229. Salem KZ, Ghobrial IM: The road to cure in multiple myeloma starts with smoldering disease. *Expert Opin Orphan Drugs* 3:653–661, 2015

230. Mateos MV, San Miguel JF: New approaches to smoldering myeloma. *Curr Hematol Malig Rep* 8:270–276, 2013

231. Mateos MV, González-Calle V: Smoldering Multiple Myeloma: Who and When to Treat. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 17:716–722, 2017

232. Mateos M-V, González-Calle V: Timing of treatment of smoldering myeloma: early treatment. *Blood Adv* 2:3045–3049, 2018

233. Korde N, Roschewski M, Zingone A, et al: Treatment with carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone with lenalidomide extension in patients with smoldering or newly diagnosed multiple myeloma. *JAMA Oncol* 1:746–754, 2015

234. Mailankody S, Kazandjian D, Korde N, et al: Baseline mutational patterns and sustained MRD negativity in patients with high-risk smoldering myeloma. *Blood Adv* 1:1911–1918, 2017

235. Kumar SK: Timing of treatment of smoldering myeloma: delay until progression. *Blood Adv* 2:3050–3053, 2018

236. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I: Multiple Myeloma: Clinical Updates From the American Society of Hematology Annual Meeting 2018. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 19:e324–e336, 2019

237. Liebross RH, Ha CS, Cox JD, et al: Clinical course of solitary extramedullary plasmacytoma. *Radiother Oncol* 52:245–249, 1999

238. Martin T, Huff CA: Multiple Myeloma: Current Advances and Future Directions. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 19:255–263, 2019

239. Brenner H, Gondos A, Pulte D: Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood* 111:2521–2526, 2008

240. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al: Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 111:2516–2520,

- 241.** Moreau P, Attal M, Hulin C, et al: Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 394:29–38, 2019
- 242.** Facon T, Kumar S, Plesner T, et al: Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone for untreated Myeloma. *N Engl J Med* 380:2104–2115, 2019
- 243.** Landgren O, Iskander K: Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes. *J Intern Med* 281:365–382, 2017
- 244.** Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al: Continued improvement in survival in multiple myeloma: Changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* 28:1122–1128, 2014
- 245.** Park JE, Miller Z, Jun Y, et al: Next-generation proteasome inhibitors for cancer therapy. *Transl Res* 198:1–16, 2018
- 246.** Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar S V, et al: New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 28:525–542, 2014
- 247.** Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, et al: The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev* 36:561–584, 2017
- 248.** Rajkumar SV, Hayman S, Gertz MA, et al: Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol* 20:4319–4323, 2002
- 249.** Kyle RA, Rajkumar SV: Treatment of multiple myeloma: An emphasis on new developments. *Ann Med* 38:111–115, 2006
- 250.** Pulte ED, Dmytrijuk A, Nie L, et al: FDA Approval Summary: Lenalidomide as Maintenance Therapy After Autologous Stem Cell Transplant in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Oncologist* 23:734–739, 2018
- 251.** Fouquet G, Bories C, Guidez S, et al: Pomalidomide for multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 7:719–731, 2014
- 252.** Mateos M V., Dimopoulos MA, Cavo M, et al: Daratumumab plus bortezomib, melphalan, and prednisone for untreated myeloma. *N Engl J Med* 378:518–528, 2018
- 253.** Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al: Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 373:1207–1219, 2015
- 254.** Gormley NJ, Ko CW, Deisseroth A, et al: FDA drug approval: Elotuzumab in combination with lenalidomide and dexamethasone for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 23:6759–6763, 2017
- 255.** Radhakrishnan SV, Bhardwaj N, Luetkens T, et al: Novel anti-myeloma immunotherapies targeting the SLAM family of receptors. *Oncoimmunology* 6:e1308618, 2017
- 256.** Afifi S, Michael A, Azimi M, et al: Role of histone deacetylase inhibitors in relapsed refractory multiple myeloma: A focus on vorinostat and panobinostat. *Pharmacotherapy* 35:1173–1188, 2015
- 257.** Costello C, Davies FE, Cook G, et al: INSIGHT MM: A large, global, prospective, non-interventional, real-world study of patients with multiple myeloma. *Futur Oncol* 15:1411–1428, 2019
- 258.** Vesole DH, Tricot G, Jagannath S, et al: Autotransplants in multiple myeloma: What have we learned? *Blood* 88:838–847, 1996
- 259.** Mateos M-V, Ocio EM, Paiva B, et al: Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev* 29:387–403, 2015
- 260.** Kumar SK, Anderson KC: Immune therapies in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 22:5453–5460, 2016
- 261.** Martin T, Strickland S, Glenn M, et al: Phase I trial of isatuximab monotherapy in the treatment of refractory multiple myeloma. *Blood Cancer J* 9, 2019
- 262.** Deeks ED: Venetoclax: First Global Approval. *Drugs* 76:979–987, 2016
- 263.** Vogl DT, Dingli D, Cornell RF, et al: Selective

inhibition of nuclear export with oral selinexor for treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 36:859–866, 2018

264. San Miguel JF, Paiva B, Lasarte JJ: Engineering Anti-myeloma Responses Using Affinity-Enhanced TCR-Engineered T Cells. *Cancer Cell* 28:281–283, 2015

265. Cohen AD: CAR T Cells and Other Cellular Therapies for Multiple Myeloma: 2018 Update. *Am Soc Clin Oncol Educ book Am Soc Clin Oncol Annu Meet e6–e15*, 2018

266. Seckinger A, Delgado JA, Moser S, et al: Target Expression, Generation, Preclinical Activity, and Pharmacokinetics of the BCMA-T Cell Bispecific Antibody EM801 for Multiple Myeloma Treatment. *Cancer Cell* 31:396–410, 2017

267. Rasche L, Kortüm KM, Raab MS, et al: The impact of tumor heterogeneity on diagnostics and novel therapeutic strategies in multiple myeloma. *Int J Mol Sci* 20, 2019

268. Rajkumar SV: Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 93:1091–1110, 2018

269. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H: The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 114:3139–3146, 2009

270. Wang M, Delasalle K, Feng L, et al: CR represents an early index of potential long survival in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 45:498–504, 2010

271. Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, et al: Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 31:4529–4535, 2013

272. Chee CE, Kumar S, Larson DR, et al: The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood* 114:2617–2618, 2009

273. Moreau P: PET-CT in MM: A new definition of CR. *Blood* 118:5984–5985, 2011

274. Dimopoulos MA, Hillengass J, Usmani S, et al: Role of magnetic resonance imaging in the management of patients with multiple myeloma: A consensus statement. *J Clin Oncol* 33:657–664,

2015

275. Martinez-Lopez J, Blade J, Mateos M-V, et al: Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood* 118:529–534, 2011

276. Van De Velde HJK, Liu X, Chen G, et al: Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica* 92:1399–1406, 2007

277. Gay F, Larocca A, Wijermans P, et al: Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: Analysis of 1175 patients. *Blood* 117:3025–3031, 2011

278. Lonial S, Anderson KC: Association of response endpoints with survival outcomes in multiple myeloma. *Leukemia* 28:258–268, 2014

279. Sonneveld P: Should minimal residual disease negativity not be the end point of myeloma therapy? *Blood Adv* 1:522–525, 2017

280. Lahuerta JJ, Martinez-Lopez J, De la Serna J, et al: Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 109:438–446, 2000

281. Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, et al: Minimal residual disease in multiple myeloma: Bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 12:286–295, 2015

282. Landgren O, Devlin S, Boulad M, et al: Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: A meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 51:1565–1568, 2016

283. Putkonen M, Kairisto V, Juvonen V, et al: Depth of response assessed by quantitative ASO-PCR predicts the outcome after stem cell transplantation in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 85:416–423, 2010

284. Paiva B, Cervero J, Mateo G, et al: Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 112:4017–4023, 2008

- 285.** Rawstron AC, Child JA, De Tute RM, et al: Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: Impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX study. *J Clin Oncol* 31:2540–2547, 2013
- 286.** Rasche L, Alapat D, Kumar M, et al: Combination of flow cytometry and functional imaging for monitoring of residual disease in myeloma. *Leukemia* 33:1713–1722, 2019
- 287.** Rawstron AC, Gregory WM, De Tute RM, et al: Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: Independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* 125:1932–1935, 2015
- 288.** San Miguel JFS, Almeida J, Mateo G, et al: Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: A tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 99:1853–1856, 2002
- 289.** Rawstron AC, Davies FE, Dasgupta R, et al: Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: The relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 100:3095–3100, 2002
- 290.** Lahuerta J-J, Paiva B, Vidriales M-B, et al: Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three PETHEMA/GEM Clinical Trials. *J Clin Oncol* 35:2900–2910, 2017
- 291.** Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales MB, et al: Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 29:1627–1633, 2011
- 292.** Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, 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* 119:687–691, 2012
- 293.** Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, et al: Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytom Part B Clin Cytom* 78:239–252, 2010
- 294.** Pellat-Deceunynck C et al: Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res* 55:3647–3653, 1995
- 295.** Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, et al: Ki-67 Proliferation Index. Correlation with prognostic parameters and outcome in multiple myeloma. *Am J Clin Oncol* 27:8–13, 2004
- 296.** Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al: EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26:1908–1975, 2012
- 297.** Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, et al: Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytom Part B - Clin Cytom* 90:61–72, 2016
- 298.** Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al: 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* 152:1655–1665, 1998
- 299.** Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, et al: 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* 19:449–455, 2005
- 300.** Ribatti D: The discovery of plasma cells: An historical note. *Immunol Lett* 188:64–67, 2017
- 301.** Gonsalves WI, Timm MM, Rajkumar SV, et al: The prognostic significance of CD45 expression by clonal bone marrow plasma cells in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leuk Res* 44:32–39, 2016
- 302.** Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, et al: Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: A study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose

therapy. *J Clin Oncol* 26:2737–2744, 2008

303. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, et al: Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytom Part B - Clin Cytom* 90:91–100, 2016

304. Tai YT, Dillon M, Song W, et al: Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood* 112:1329–1337, 2008

305. Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, et al: Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: A mechanism for growth and survival. *Blood* 103:689–694, 2004

306. Tai YT, Li XF, Breitzkreutz I, et al: Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res* 66:6675–6682, 2006

307. Turley H, Jones M, Erber W, et al: VS38: a new monoclonal antibody for detecting plasma cell differentiation in routine sections. *J Clin Pathol* 47:418–22, 1994

308. Mizuta S, Kawata T, Kawabata H, et al: VS38 as a promising CD38 substitute antibody for flow cytometric detection of plasma cells in the daratumumab era. *Int J Hematol* 110:322–330, 2019

309. Banham a H, Turley H, Pulford K, et al: The plasma cell associated antigen detectable by antibody VS38 is the p63 rough endoplasmic reticulum protein. *J Clin Pathol* 50:485–9, 1997

310. Paiva B, Puig N, Cedena MT, et al: Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia* 31:382–392, 2017

311. Bataille R, Jego G, Robillard N, et al: The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 91:1234–1240, 2006

312. Shin SJ, Lee H, Jung G, et al: Expression of CD99 in multiple myeloma: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 170 cases. *Korean J Pathol* 48:209–216, 2014

313. Raja KRM, Kovarova 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* 149:334–351, 2010

314. Moreaux J, Hose D, Reme T, et al: CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 108:4194–4197, 2006

315. Tazawa S, Shiozawa E, Homma M, et al: CD200 Expression on Plasma Cell Myeloma Cells is Associated with the Efficacies of Bortezomib, Lenalidomide and Thalidomide. *J Clin Exp Hematop* 55:121–126, 2015

316. Flanders A, Stetler-Stevenson M, Landgren O: Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity. *Blood* 122:1088–1089, 2013

317. Wood BL: Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom* 90:47–53, 2016

318. Arroz M, Came N, Lin P, et al: Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytom Part B - Clin Cytom* 0:1–9, 2015

319. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, et al: Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: A comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 90:1365–1372, 2005

320. Bakkus MHC, Bouko Y, Samson D, et al: Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br J Haematol* 126:665–674, 2004

321. Takamatsu H, Takezako N, Zheng J, et al: Prognostic value of sequencing-based minimal residual disease detection in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem-cell transplantation. *Ann Oncol* 28:2503–2510, 2017

322. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations:

Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257–2317, 2003

323. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al: Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 123:3073–3079, 2014

324. Martinez-Lopez J, Sanchez-Vega B, Barrio S, et al: Analytical and clinical validation of a novel in-house deep-sequencing method for minimal residual disease monitoring in a phase II trial for multiple myeloma. *Leukemia* 31:1446–1449, 2017

325. Waldschmidt JM, Anand P, Knoechel B, et al: Comprehensive characterization of circulating and bone marrow-derived multiple myeloma cells at minimal residual disease. *Semin Hematol* 55:33–37, 2018

326. Moor I, Bacher VU, Jeker B, et al: Peripheral flow-MRD status at the time of autologous stem cell collection predicts outcome in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 53:1599–1602, 2018

327. Cowan AJ, Stevenson PA, Libby EN, et al: Circulating Plasma Cells at the Time of Collection of Autologous PBSC for Transplant in Multiple Myeloma Patients is a Negative Prognostic Factor Even in the Age of Post-Transplant Maintenance Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 24:1386–1391, 2018

328. Mazzotti C, Buisson L, Maheo S, et al: Myeloma MRD by deep sequencing from circulating tumor DNA does not correlate with results obtained in the bone marrow. *Blood Adv* 2:2811–2813, 2018

329. Pugh TJ: Circulating Tumour DNA for Detecting Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma. *Semin Hematol* 55:38–40, 2018

330. Dingli D, Nowakowski GS, Dispenzieri A, et al: Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma : a simple risk stratification system. *Blood* 107:3384–3388, 2006

331. Gonsalves WI, Morice WG, Rajkumar V, et al: Quantification of clonal circulating plasma cells in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* 167:500–505, 2014

332. Thoren KL: Mass spectrometry methods for

detecting monoclonal immunoglobulins in multiple myeloma minimal residual disease. *Semin Hematol* 55:41–43, 2018

333. Moore LM, Cho S, Thoren KL: MALDI-TOF mass spectrometry distinguishes daratumumab from M-proteins. *Clin Chim Acta* 492:91–94, 2019

334. Eveillard M, Rustad E, Roshal M, et al: Comparison of MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peripheral blood and bone marrow-based flow cytometry for tracking measurable residual disease in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 1–4, 2020

335. Mills JR, Barnidge DR, Dispenzieri A, et al: High sensitivity blood-based M-protein detection in sCR patients with multiple myeloma. *Blood Cancer J* 7:e590–e590, 2017

336. Caers J, Withofs N, Hillengass J, et al: The role of positron emission tomography-computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma. *Haematologica* 99:629–637, 2014

337. Hillengass J, Bäuerle T, Bartl R, et al: Diffusion-weighted imaging for non-invasive and quantitative monitoring of bone marrow infiltration in patients with monoclonal plasma cell disease: A comparative study with histology. *Br J Haematol* 153:721–728, 2011

338. Goyal G, Rajkumar SV, Lacy MQ, et al: Impact of prior diagnosis of monoclonal gammopathy on outcomes in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 33:1273–1277, 2019

339. Paiva B, Vídriales MB, Rosiñol L, et al: A multiparameter flow cytometry immunophenotypic algorithm for the identification of newly diagnosed symptomatic myeloma with an MGUS-like signature and long-term disease control. *Leukemia* 27:2056–2061, 2013

340. Rodríguez-Otero P, Mateos MV, Martínez-López J, et al: Predicting long-term disease control in transplant-ineligible patients with multiple myeloma: impact of an MGUS-like signature. *Blood Cancer J* 9, 2019

341. Rajkumar SV, Harousseau J-L, Durie B, et al: Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus

Panel 1. Blood 117:4691–4695, 2011

342. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, et al: Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 106:4050–4053, 2005

343. Rajkumar SV, Rosiñol L, Hussein M, et al: Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol* 26:2171–2177, 2008

344. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, et al: Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 11:29–37, 2010

345. Kumar SK, Lee JH, Lahuerta JJ, et al: Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: A multicenter international myeloma working group study. *Leukemia* 26:149–157, 2012

346. Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, et al: Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* 124:3043–3051, 2014

347. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, et al: Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: Sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol* 26:5775–5782, 2008

348. Barlogie B, Anaissie E, Haessler J, et al: Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma. *Cancer* 113:355–359, 2008

349. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al: International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 20:1467–1473, 2006

350. Paiva B, Puig N, García-Sanz R, et al: Is this the time to introduce minimal residual disease in multiple myeloma clinical practice? *Clin Cancer Res* 21:2001–2008, 2015

351. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, et al: Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: A meta-analysis. *JAMA Oncol* 3:28–35, 2017

352. Anderson KC: Should minimal residual disease negativity be the end point of myeloma therapy? *Blood Adv* 1:517–521, 2017

353. Avet-Loiseau H, Ludwig H, Landgren O, et al: Minimal Residual Disease Status as a Surrogate Endpoint for Progression-free Survival in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Studies: A Meta-analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 1–8, 2019

354. De Tute RM, Rawstron AC, Gregory WM, et al: Minimal residual disease following autologous stem cell transplant in myeloma: Impact on outcome is independent of induction regimen. *Haematologica* 101:e69–e71, 2016

355. Silvennoinen R, Lundan T, Kairisto V, et al: Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 4, 2014

356. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, et al: Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytom Part B Clin Cytom* 90:26–30, 2016

357. Van Dongen JJM, Van Der Velden VHJ, Brüggemann M, et al: Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 125:3996–4009, 2015

358. Royston DJ, Gao Q, Nguyen N, et al: Single-tube 10-fluorochrome analysis for efficient flow cytometric evaluation of minimal residual disease in plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 146:41–49, 2016

359. Paiva B, Pérez-Andrés M, Vídriales MB, et al: Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia* 25:697–706, 2011

360. Massagué J, Obenauf AC: Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529:298–306, 2016

- 361.** Márk Á, Varga G, Timár B, et al: The effect of microenvironmental factors on the development of myeloma cells. *Hematol Oncol* 35:741–745, 2017
- 362.** An G, Xu Y, Shi L, et al: t (11; 14) multiple myeloma: A subtype associated with distinct immunological features, immunophenotypic characteristics but divergent outcome. *Leuk Res* 37:1251–1257, 2013
- 363.** Cherry BM, Costello R, Zingone A, et al: Immunoparesis and monoclonal gammopathy of undetermined significance are disassociated in advanced age. *Am J Hematol* 88:89–92, 2013
- 364.** Heaney JL, Campbell JP, Iqbal G, et al: Characterisation of immunoparesis in newly diagnosed myeloma and its impact on progression-free and overall survival in both old and recent myeloma trials. *Leukemia* 32:1727–1738, 2018
- 365.** Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, et al: Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 105:1614–1621, 2005
- 366.** Bladé J, Dimopoulos M, Rosiñol L, et al: Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: Current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations. *J Clin Oncol* 28:690–697, 2010
- 367.** Tete SM, Bijl M, Sahota SS, et al: Immune defects in the risk of infection and response to vaccination in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Front Immunol* 5, 2014
- 368.** Paiva B, Corchete LA, Vidriales M-B, et al: Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood* 127:1896–1906, 2016
- 369.** Ghobrial IM, Dc W: Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for the therapy. *Blood* 120:20–30, 2012
- 370.** Vande Broek I, Vanderkerken K, Van Camp B, et al: Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. *Clin Exp Metastasis* 25:325–334, 2008
- 371.** Rosenberg AS, Bainbridge Bs S, Pahwa R: Investigation into the interference of the monoclonal antibody daratumumab on the free light chain assay. *Clin Biochem* 49:1202–1204, 2016
- 372.** Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al: International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 23:215–224, 2009
- 373.** Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al: Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 31:2094–2103, 2017
- 374.** Paiva B, Puig N, Cedena M-T, et al: Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 38:1–10, 2019
- 375.** Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Pérez-Andrés M, et al: Detection of Circulating Tumor Plasma Cells in Monoclonal Gammopathies: Methods, Pathogenic Role, and Clinical Implications. *Cancers* 2020 12:1499, 2020
- 376.** Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJ, et al: EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 26:1986–2010, 2012
- 377.** Menéndez P, del Cañizo MC, Orfao A: Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 15:53–61, 2001
- 378.** Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, et al: Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clin Chem* 44:944–949, 1998

-Anexo I-

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL ARTÍCULO 1

“Citometría de flujo de nueva generación para la detección sensible y estandarizada de enfermedad mínima residual en el mieloma múltiple”

En esta sección se recogen: 1) los materiales y métodos suplementarios, haciendo especial hincapié en la metodología empleada en la selección de los anticuerpos monoclonales asociados a fenotipo de célula plasmática (CP) y los fluorocromos que se evaluaron durante el diseño del panel de 8-colores de la nueva herramienta de citometría de flujo de nueva generación (NGF); 2) el tipo y concentración de las soluciones empleadas en los protocolos de preparación y tinción de muestras, así como en las poblaciones celulares identificadas durante el proceso de estandarización de la NGF; 3) las especificaciones técnicas respecto a los distintos anticuerpos monoclonales testados durante todas las fases del estudio; 4) las características técnicas de los citómetros de flujo y los programas informáticos empleados en el trabajo; 5) la contribución específica (en número de muestras y fases del estudio) por cada centro participante en el trabajo; 6) las características clínicas y de laboratorio, el tipo de tratamiento administrado y los puntos de monitorización de enfermedad mínima residual (EMR) de los pacientes incluidos en la fase de validación de la NGF; 7) los resultados suplementarios respecto a las modificaciones puntuales en los fluorocromos o los clones de los anticuerpos testados en cada ronda de rediseño y perfeccionamiento de la combinación de 8-colores de la NGF; 8) las diferencias en los niveles de intensidad media de fluorescencia entre los distintos anticuerpos testados en la identificación de CP mediante lisis masiva (NGF) vs. lisis “FACS” (utilizada en la citometría de flujo convencional); 9) comparación de la capacidad resolutive de algunos clones de CD38 para identificar CP normales en muestras tratadas con terapia monoclonal anti-CD38; 10) ejemplo ilustrativo de la utilidad de la combinación de EMR mediante citometría de flujo de nueva generación para identificar subpoblaciones residuales normales de línea B, eritroide y mieloide de médula ósea.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary methods

Immunophenotypic studies for selection of plasma cell (PC)-associated markers. A total of 19 BM samples were used in this section of the study: five to evaluate the performance of CD138-HV450 *vs.* BV421, four to compare the anti-Lambda-APCH7 and anti-Lambda-APCC750 conjugates, 2 for evaluation of the CD138-HV500C reagent, two to evaluate the performance of CD81-APCH7 *vs.* CD81-APCC750, two for the comparison between CD27-V500C and CD27-BV510, two to assess the performance of CD45 PerCPCy5.5 and another two for the initial comparison of multi-epitope CD38-FITC *vs.* the CD38-FITC conjugate of LD38 clone.

Design and evaluation of sample preparation protocols. For the evaluation of different sample preparation protocols, whole BM and PB samples were stained in parallel with the CD138-HV450 CD45-PacO CD56-PE CD5-PerCPCy5.5 CD19-PECy7 CD3-APC antibody combination, selected to assess potential selective plasma cell loss *vs.* other major (e.g. CD3⁺ T-cells) and minor (e.g. CD5⁺ dendritic cells) subsets of cells coexisting in the sample. Samples were evaluated under five different conditions that included: i) the EuroFlow SOP for staining of 50µl of sample with cell surface markers ³⁷⁶, and ii) four different ammonium chloride-based bulk-lysis procedures followed by staining of 5x10⁶ cells in 100µl/tube (final concentration of 5x10⁴ cells/µl). The four different bulk-lysis conditions concerned two different concentrations (0.5% and 4%) of bovine serum albumin (BSA, SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO) in phosphate buffered saline (PBS; pH=7.4) washing solution, each followed or not by a FACSLyse-based (BD Biosciences, San Jose, CA) lysing and fixation step for residual red cell lysis and nucleated cell fixation. The selected protocol was further adapted to stain 10⁷ cells/tube.

The relative distribution (and absolute count) of the major cell populations identified (i.e. eosinophils, neutrophils, monocytes, mature lymphocytes, nucleated red cells and PC) were compared between the four bulk-lysis procedures evaluated against the reference FACSLyse EuroFlow SOP (www.EuroFlow.org).

All antibody reagents in the final Version 5 of the NGF MM-MRD panel (Table 1) were re-titrated for application in the bulk-lysis standard operating sample preparation protocol (SOP)

described below, to ensure that saturating conditions were achieved after staining $\geq 10^7$ cells/tube, with optimal resolution between positive and negative cell populations.

Instrument characteristics and calibration and data acquisition and analysis. Data acquisition was performed at each center (Supplementary Table 1) using FACSCanto-II instruments (BD Biosciences) equipped with 3-lasers, 8-fluorescence detectors, equivalent dichroic mirrors and filters, and the FACSDiVa software (BD Biosciences). All instruments were calibrated and monitored following the EuroFlow SOP for instrument set-up³⁷⁶. For data analysis the Infinicyt software was used using previously described approaches³⁷⁶.

Stained cells were measured at intermediate (or low) speed using and FSC threshold at 10,000 channels (arbitrary units 0 to 262,144). For all statistical analysis, the Software Package for Social Sciences (SPSS Version 23; IBM, Armonk, NY), was used.

Supplementary results

Optimization of the two 8-color MM MRD antibody combinations. From the initial Version 1, until version 3, the suboptimal CD138-PacO reagent was replaced in Version 2 by CD138-HV500C due to the greater MFI of the later reagent (MFI: 2,858 vs. 3,153); in turn, in Version 3, the suboptimal CD81-APCH7 (MFI: 4,055) and Cylgλ-APCH7 (MFI: 2,157) reagents were both replaced by CD81-APCC750 and Cylgλ-APCC750 (MFI: 6,524 and 16,786, respectively). For Version 4, the CD138-HV500C (MFI: 3,153), CD27-PerCPCy5.5 (MFI: 23,966) and CD45-PacB (MFI: 6,798) fluorochrome positions were replaced by CD138-HV450 (MFI: 4,218), CD27-HV500C (MFI: 3,750) and CD45-PerCPCy5.5 (MFI: 68,902), respectively. Finally, in Version 5, CD138-HV450, CD27-HV500C and CD38-FITC were replaced by the optimal CD138-BV421 (MFI: 36,052) and CD27-BV510 (MFI: 13,655) conjugates, and the multi-epitope CD38-FITC antibody conjugate (MFI: 107,772), respectively. The later CD38 reagent showed an equivalent performance to that of the original CD38 antibody clone (MFI: 91,057) in diagnostic MM samples, but a much better resolution in BM samples from MM patients who had received Daratumumab therapy (MFI: 3,905 vs. 350, respectively). Moreover, CD229 was excluded from tube 2, since extensive testing showed that CD229 was insufficient to identify all aPC in 4/49 (8%) MM cases tested, and it was not specific for PC, being also (strongly) expressed on plasmacytoid dendritic cells and a subset of lymphocytes³⁰³. Finally, CD200-APC demonstrated a low contribution as potential MRD marker since it was heterogeneously expressed in normal BM PC from 28/28 samples evaluated (median percentage of CD200⁺ nPC of 49%; range: 40%-68%), as well as in 8/20 (40%) cases with aPC populations (median % of CD200⁺ aPC of 100%; range: 58%- 100%).

Of note, significantly higher MFI values were observed for CD38 ($P<.001$), CD56 ($P<.001$) and CD19 ($P=.04$), but not for CD27, CD45 and CD138. Despite this, no impact on the identification of both normal vs. aberrant/clonal PC was observed, neither during manual expert-based gating or automated data analysis.

Subsequently, we evaluated the performance of the two tube 8-color NGF panel vs. three different single-tube 10-color panels (Table 1) in a total of 5 MM BM samples measured in an LSR Fortessa X20 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer. Similar overall results were achieved but associated with a poorer performance of the anti-Lambda BV605 and CD117 BV605 conjugates vs. reagents present in the 8-color combinations due to a poor resolution of positive

populations, especially the PCs. Version 3 constituted the best performing combination tested and is currently under further prospective evaluation.

References

303. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, et al: Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytom Part B – Clin Cytom* 90:91–100, 2016
376. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJ, et al: EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 26:1986–2010, 2012

Supplementary Table 1. Number of patient and control samples evaluated in the study.

Study phase	Type of sample				Participating Centers	Total
	PCD Patients		Controls			
	BM	PB	BM	PB		
Antibody panel designed (Version 1)	63		31		USAL, EMC, UNIKIEL, IPOLFG, SUM	94
Antibody performance evaluation (Versions 2 to 5)	19				USAL	19
Evaluation of sample preparation protocols	7	5	1	5	USAL, UNIKIEL, IPOLFG	18
Validation of NGF vs. 2 nd generation flow	228 ^{a,b}		16		USAL, UNAV	244
Validation NGF vs. NGS	31 ^a				USAL, UNAV	10 ^a
Automated PC gating ^c	110		14		USAL, UNAV	224
Total	327	5	48	5		385

PCD, plasma cell disorders; BM, bone marrow; PB, peripheral blood; USAL, University de Salamanca, Salamanca, Spain; Erasmus MC, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands; UNIKIEL, University Hospital of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; IPOLFG, Portuguese Institute of Oncology, Lisbon, Portugal; SUM, Medical University of Silesia in Katowice, Zabrze, Poland; UNAV, Clinica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; NGF, next generation flow; NGS, next generation sequencing; MM, multiple myeloma.

(a) 21 samples were evaluated simultaneously by NGF, 2nd generation flow and NGS.

(b) correspond to 176 patients evaluated at different time points during the study.

© patient and control samples used for automated PC gating evaluation are included within the evaluation of NGF vs. 2nd generation flow.

Supplementary Table 2. Antibody clones and reagents used in this study and their source.

Marker	Clone	Fluorochrome conjugate	Manufacturer	Catalogue number	Usage in this study
CD5	L17F12	PerCPCy5.5	BD Biosciences	341109	SPE
CD3	SK7	APC	BD Biosciences	345767	SPE
CD19	J3-119	PECy7	Beckman Coulter	IM3628	SPE; 2 nd GF; NGF (V1-5); 10C panel (V1-3)
CD27	L128	PerCPCy5.5	BD Biosciences	656643	2 nd GF; NGF (V1-3)
	M-T271	HV500C	BD Biosciences	561223	NGF (V4)
	O323	BV510	BioLegend	302835	NGF (V5); 10C panel (V1-3)
CD38	LD38	FITC	Cytognos SL	CYT-38F	2 nd GF; NGF (V1-4); 10C panel (V1,2)
	MultiEpitope	FITC	Cytognos SL	CYT-38F2	NGF (V5); 10C panel (V3)
CD56	C5.9	PE	Cytognos SL	CYT-56PE	SPE; 2 nd GF; NGF (V1-5); 10C panel (V3)
CD45	HI30	PacO	Invitrogen	MHCD4530	SPE
		PerCPCy5.5	BioLegend	304028	NGF (V4,5); 10C panel (V1,2)
		BV605	BD Biosciences	564048	10C panel (V3)
	T29/33	PacB	Dako	PB986	2 nd GF; NGF (V1-3)
CD81	JS-81	APCH7	BD Biosciences	656647	2 nd GF; NGF (V1,2)
	M38	APCC750	Cytognos SL	CYT-81AC750	NGF (V3-5)
		APCA700	Cytognos SL	Custom conjugate	10C panel (V3)
CD117	104D2	APC	BD Biosciences	333233	2 nd GF; NGF (V1-5); 10C panel (V1)
		BV605	BD Biosciences	562687	10C panel (V1,3)
CD138	B-A38	OC515	Cytognos SL	CYT-138OC	2 nd GF
		PacO	ExBio	PO-520	NGF (V1)
	MI15	HV500C	BD Biosciences	650659	NGF (V2,3)
		HV450	BD Biosciences	562098	SPE, NGF (V4)
		BV421	BD Biosciences	562935	NGF (V5); 10C panel (V1-3)
CD200	OX104	APC	eBioscience	17-9200	APE
CD229	Ly-9	PerCPCy5.5	eBioscience	Custom conjugate	NGF (V2,3)
Igκ	polyclonal	APC	Dako	C0222	NGF (V1-5)
		APCC750	Cytognos SL	Custom conjugate	10C panel (V3)
	G20-193	AF700	BD Biosciences	561319	10C panel (V2)
Igλ	1-155-2	APCH7	BD Biosciences	656648	NGF (V1,2)
	polyclonal	APCC750	Cytognos SL	CYT-LAC750	NGF (V3-5)
		PerCPCy5.5	Cytognos SL	CYT-LAMBDAC	10C panel (V3)
	JDC12	BV605	BD Biosciences	563292	10C panel (V3)

Cat, catalogue; SPE, sample preparation experiments; 2ndGF, 2nd generation flow; NGF, next generation flow; 10C, 10-color; APE, antibody performance evaluation. PerCP, peridinin-chlorophyll-protein; Cy5.5, cyanin5.5; APC, allophycocyanin; PE, phycoerythrin; Cy7, cyanin7; HV500C, BV510, brilliant violet 510; Horizon V500C; FITC, fluorescein isothiocyanate; PacO, pacific orange, BV605, brilliant violet 605; PacB, pacific blue; H7, Hillite 7; C750, C750 dye; A700, Alexa fluor 700; OC515, Orange cytognos 515; HV450, Horizon V450; BV421, brilliant violet 421; Ig, immunoglobulin

Supplementary Table 3. Diagnostic clinical and laboratory features of MM patients who reached VGPR, CR or sCR and were investigated for MRD by NGF (n=110)

Variable	
Sex	
Male	53%
Female	47%
Median age (range)	
	62 (37-86)
ISS stage	
I	50%
II	23%
III	27%
R-ISS stage	
I	23%
II	61%
III	16%
HR-CA by iFISH	
No	67%
Yes	17%
NA	16%
Serum β 2-microglobulin (mg/L)	
≤ 3.5	74%
> 3.5	26%
LDH	
Normal	78%
High	22%
M-component	
IgG	66%
IgA	23%
IgD	1%
BJ	3%
Oligosecretory	7%

ISS, international staging system; R-ISS, revised ISS; HR-CA, High risk chromosomal abnormalities include del(17/17p), t(4;14), t(14;16) and/or, t(14;20); iFISH, interphase fluorescent in situ hybridization; NA, not available; LDH, lactate dehydrogenase; BJ, Bence-Jones

Supplementary Table 4. Distribution of MM patient BM samples according to the type of treatment received and the corresponding MRD time points

	Treatment line	MRD time points		
		After induction	Maintenance	At the end of therapy
VGPR, CR/sCR (n=110)		30	22	58
Newly-diagnosed patients				
HDT-ASCT	Front line	22	2	40
Non-transplant candidates	Front line	3	6	4
Relapsed/refractory patients				
	≥ 2 nd line	5	14	14
PD, PR or SD (n=52)		7	20	25
Newly diagnosed patients				
HDT-ASCT	Front line	1	2	7
Non-transplant candidates	Front line		4	3
Relapsed/refractory patients				
	≥ 2 nd line	6	14	15

HDT-ASCT includes treatment with Pis, Pis+classical drugs or Pis+IMiDs with or without MoAbs, or Pis+classical drugs+IMiDs followed by HDT-ASCT. Non-transplant candidates received treatment with Pis+classical drugs or Pis+IMiDs with or without MoAbs, IMiDs or IMiDs+MoAbs. ≥2nd line of treatment included classical drugs, Pis, Pis+classical drugs with or without MoAbs, Pis+IMiDs with or without classical drugs, IMiDs with or without MoAbs, MoAbs, and allo-SCT.

MM, multiple myeloma; BM, bone marrow; MRD, minimal residual disease; VGPR, very good partial response; CR, complete response; sCR, stringent CR; HDT, high dose therapy; ASCT, autologous stem cell transplant; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease; Pis, proteasome inhibitors; IMiDs, immunomodulatory drugs; MoAbs, humanized monoclonal antibodies; allo-SCT, allogeneic stem cell transplant

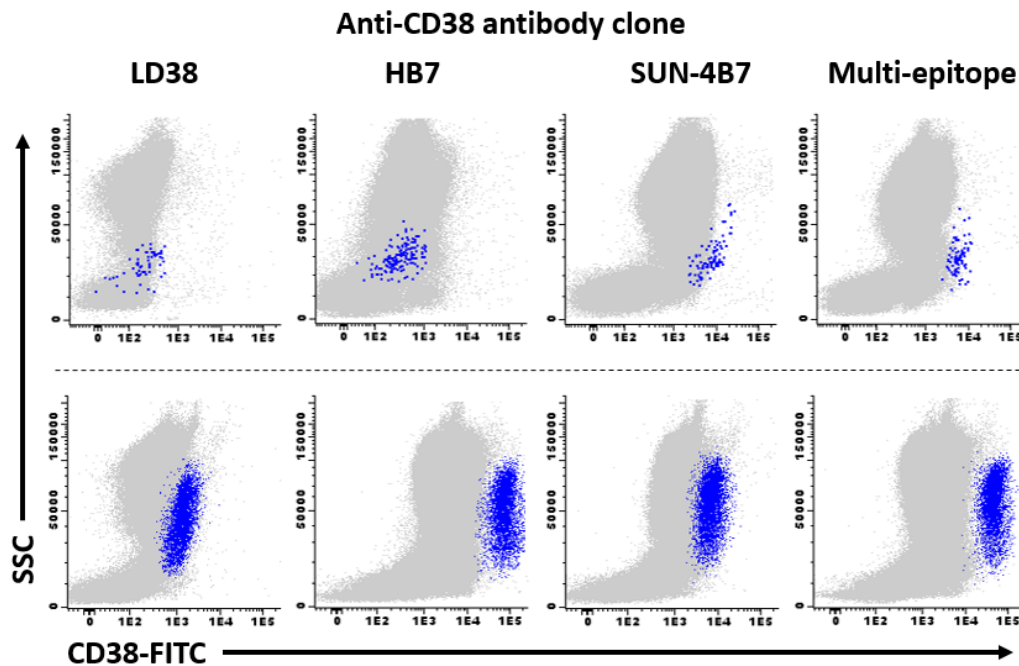
Supplementary Table 5. Impact of sample preparation and staining of 10^7 cells/tube on the median fluorescence intensity obtained for plasma cell populations with the FACS-Lyse vs. the A1 bulk-lysis protocol highlighting the need for re-titration of multiple reagents.

Antibody reagent	FACS-Lyse EuroFlow diagnostic protocol	A1 Bulk-Lysis protocol (staining 10^7 cells/tube)	Reagent titer ($\mu\text{L}/\text{test}$)	Final reagent titer ($\mu\text{L}/\text{test}$)
CD38-FITC	59,372 (26,662-65,976)	53,516 (22,685-55,983)	5	6
CD56-PE	1,563 (601-2,401)	1,520 (482-2,964)	5	2
CD45-PerCP-Cy5.5	2,372 (2,139-3,489)	2,040 (1,782-3,085)	20	10
CD19-PECy7	8,018 (4,121-11,878)	5,840 (3,216-9,508)	5	5
CD81-APC C750	8,195 (6,872-8,779)	5,413 (5,241-5,778)	2	10
CD138-PacB	14,010 (6,308-19,294)	11,283 (7,040-14,226)	5	*
CD27-HV500-C	4,995 (4,339-6,105)	4,209 (3,509-4,932)	1.25	**

Results expressed as median fluorescence intensity (range) for the positive reference cell population (arbitrary units scaled from 0 to 262,144).

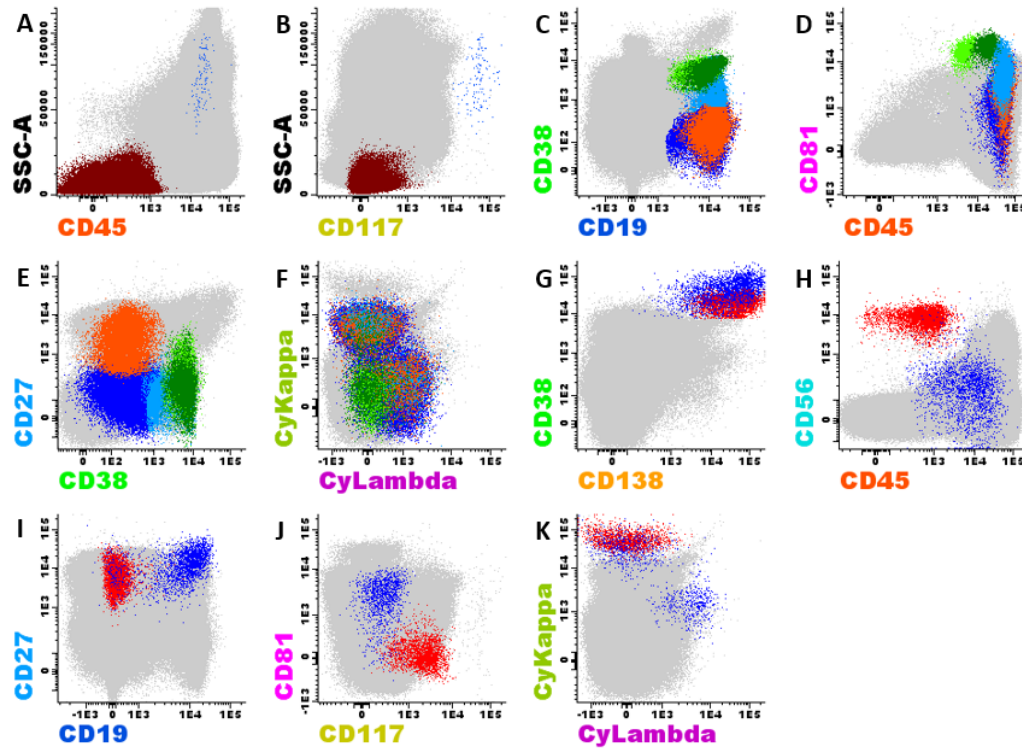
*This amount corresponds to the final reagent in Version 5 (CD138-BV421): 2 $\mu\text{L}/\text{test}$. **This amount corresponds to the final reagent in version 5 (CD27-BV510): 10 $\mu\text{L}/\text{test}$.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Performance of 4/9 different FITC-conjugated CD38 antibody clones evaluated in two MM BM samples after anti-CD38 monoclonal antibody therapy. Upper panels show the staining pattern of the 4 different clones in a MM MRD sample from a patient treated with Daratumumab. In turn, the lower panels correspond to an MGUS BM sample from a patient studied at diagnosis incubated *ex-vivo* with the Isatuximab antibody (prior to staining). Of note, from the different clones tested, the best performance corresponded (in both cases) to the multi-epitope CD38 reagent. PC populations were identified in all dot plots based on their CD138, CD45 and light scatter profile, and they are depicted as blue dots; other BM cells are shown as grey dots. LD38, HB7 and multi-epitope conjugates are commercially available reagents. The SUN-4B7 clone was kindly provided by F. Malavasi (Lab of Immunogenetics, Department of Medical Sciences, University of Torino Medical School, Torino, Italy).

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Illustrating example of the utility of the NGF antibody panel for the identification of normal residual B-cells populations, PC and other non-B-cell lineage cells in a representative BM from an MRD⁺ MM patient. In panels A and B CD45⁻ SSC^{lo} nucleated red blood cells (brown dots) and CD117^{hi} mast cells (blue dots) are shown. In turn, in panels C to F different normal/residual B-cell populations are identified including i) CD19⁺ CD38^{hi} CD45^{lo} and CD45^{int} B-cell precursors (light and dark green dots), ii) CD19⁺ CD38^{lo} immature B-lymphocytes (light blue dots), iii) CD19⁺ CD38⁻ CD27⁻ naïve B-cells (dark blue dots) and, CD19⁺ CD38⁻ CD27⁺ memory B-lymphocytes (orange dots). Finally, in panels G to K normal (polyclonal) plasma cells (blue dots) and aberrant (clonal) PC (red dots) are identified. In all panels, grey events correspond to other BM cells.

-Anexo II-

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL ARTÍCULO 2

“Utilidad clínica de la citometría de flujo de nueva generación como técnica mínimamente invasiva para la detección de células plasmáticas tumorales circulantes en la sangre de pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto y mieloma múltiple al diagnóstico”

En esta sección se recogen: 1) los materiales y métodos suplementarios, haciendo especial hincapié en la descripción de la metodología empleada en el procesamiento de las muestras de sangre periférica, así como en el volumen de muestra requerido para alcanzar los niveles de sensibilidad reportados y en los paneles de anticuerpos monoclonales (clones y casa comercial) empleados en la técnica de citometría de flujo de nueva generación (NGF); 2) las características clínicas de los pacientes incluidos en el trabajo; 3) la distribución (en números absolutos, relativos y proporcionales) de las células plasmáticas (CP) normales y tumorales en sangre periférica, dentro de cada subgrupo clínico de neoplasias de CP; 4) un ejemplo ilustrativo de las diferencias inmunofenotípicas detectadas mediante NGF entre las CP normales y tumorales de sangre periférica respecto a su contrapartida medular; 5) la distribución de las CP tumorales circulantes (en números absolutos) en sangre de pacientes con mieloma múltiple quiescente, según el riesgo de progresión maligna medido por los sistemas de estratificación pronóstica comúnmente usados en la rutina clínica actual.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary methods

PATIENTS AND METHODS

Immunophenotypic detection of circulating tumor plasma cells (CTPC). Briefly, peripheral blood (PB) (median volume of 5.1 mL; range: 2.1-12.8 mL) was mixed with 50 mL of an ammonium chloride (NH₄CL) lysing solution and incubated for 15 minutes at room temperature (RT) to lyse non-nucleated red cells. Then, nucleated cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 0.09% sodium azide (NaN₃); for surface membrane (Sm) staining only, washed cells were subsequently stained with the different antibodies for 30 minutes at RT in the darkness. Afterward, 2 mL of the FACS lysing solution - Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA,- was added to the cell pellet, mixed, and another incubation was performed for 10 minutes (RT). Identification of cytoplasmic immunoglobulins (Cylg) was performed according to the EuroFlow standard operating procedure for simultaneous staining of cell surface membrane (Sm) and cytoplasmic (Cy) markers using the Fix&Perm reagent kit (An der Grub, Vienna, Austria) (for more detailed protocol information please see www.EuroFlow.org). In tube 1 of the EuroFlow-IMF MM minimal residual disease (MRD) antibody panel³⁷³, cells were stained for: CD138-BV421, CD27-BV510, CD38ME-FITC, CD56-PE, CD45-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, CD117-APC and CD81-APCC750; while in tube 2, the CD138-BV421, CD27-BV510, CD38-FITC, CD56-PE, CD45-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, Cy-IgKappa (κ)-APC and CylgLambda (λ)-APCC750 stainings, were used (Supplemental Table 3).

Supplemental Table 1. Clinical and laboratory features of PCN patients distributed according to the distinct diagnostic disease categories.

Clinical and laboratory features	SP (n=17)	macrofocalMM (n=4)	MGUS (n=150)	SMM (n=25)	MM (n=68)	
Male/female (%)	78%/22%	75%/25%	51%/49%	48%/52%	54%/48%	
Age (years)*	74 (45-86)	86 (74-89)	69 (28-97)	69 (55-82)	69 (40-94)	
Hemoglobin (g/L)*	130 (86-169)	122 (114-126)	146 (75-184)	139 (92-158)	107 (77-163)	
Serum M-component (g/L)*	4.7 (0-28)	5.2 (3.6-5.2)	6 (0-118)	21 (6-86)	27 (1.6-40,660)	
Heavy chain:	IgA ⁺	0%	25%	30%	40%	20%
	IgG ⁺	61%	25%	66%	60%	54%
	IgH ⁻	39%	50%	4%	0%	26%
Light chain:	κ ⁺	86%	75%	62%	52%	68%
	λ ⁺	14%	25%	38%	48%	32%
Serum FLC ratio*	2.9 (0.04-129)	161.9 (1.1-332)	1.2 (0.02-142)	1.9 (0-130)	23.9 (0-53,714)	

Results expressed as percentage of cases or as *median values and range between brackets. IgM-MGUS cases were excluded from this study. PCN, plasma cell neoplasm; SP, solitary plasmacytoma; macrofocalMM, macrofocal MM; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; SMM, smoldering MM; MM, multiple myeloma; M-component, monoclonal component; FLC, free light chain; Ig, immunoglobulin.

Supplemental Table 2. Clinical and laboratory features of macrofocalMM patients (n=4)

	CASE 1	CASE 2	CASE 3	CASE 4
Gender	M	M	F	M
Age (years)	89	85	74	87
Overall survival (months)	10.8 (D)	3 (A)	29.5 (A)	6.9 (D)
Hemoglobin (g/L)	114	119	125	126
Serum calcium (mg/dL)	10.3	8.7	9.4	9.5
Serum creatinine (mg/dL)	2.3	0.7	0.8	1.1
Serum albumin (g/dL)	3	3.4	4.7	3.9
N. of focal lesions on MRI studies	>5	2	>10	>5
% BM PC involvement by morphology	7%	17%	2%	3%
% tumor PC/ all BM PC by FCM	16%	47%	20%	73%

macrofocalMM, macrofocal multiple myeloma; BM, bone marrow; PC, plasma cell; N, number; MRI, magnetic resonance imaging; FCM, flow cytometry; D, dead; A, alive.

Supplemental Table 3. Antibody clones and fluorochrome-conjugated reagents used for the identification and characterization of PC in newly-diagnosed PCN patients and their source.

MARKER	FLUOROCHROME	CLONE	MANUFACTURER
CD138	BV421	MI15	BD
CD27	BV510	323	Biolegend
CD38	BV510	HIT2	BD
CD45	BV650	HI30	BD
CD19	BV786	SJ25C1	BD
CD38	FITC	Multiepitope	Cytognos
Vs38c	FITC	Vs38c	Dako
CD56	PE	C5.9	Cytognos
Ki67	PE	B56	BD
CD20	PECF594	2H7	BD
CD45	PerCP-Cy5.5	HI30	Biolegend
anti-Kappa	PerCP-Cy5.5	Polyclonal	Cytognos
anti-Lambda	PerCP-Cy5.5	Polyclonal	Cytognos
CD19	PE-Cy7	J3-119	BC
CD56	PE-Cy7	N901 (HLDA6)	BC
CD117	APC	104D2	BD
CD81	APC	JS-81	BD
anti-Kappa	APC	Polyclonal	Dako
CD81	APC-C750	M38	Cytognos
anti-Kappa	APC-C750	Polyclonal	Cytognos
anti-Lambda	APC-C750	Polyclonal	Cytognos

PC, plasma cell; PCN, PC neoplasm; BV, brilliant violet; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, R-phycoerythrin; PECF594, PECF-dye 594; PerCP-Cy5.5, peridinin-chlorophyll protein-cyanine 5.5; PE-Cy7, PE-cyanine 7; APC, allophycocyanine; APC-C750, APC-dye 750; BC, Beckman Coulter (Hialeah, FL); BioLegend (London, UK); Cytognos SL, (Salamanca, Spain); BD, Becton/Dickinson Biosciences (San Jose, CA); Dako (Glostrup, Denmark).

Supplemental Table 4. Distribution of circulating tumor PC in PB of PCN patients grouped per diagnostic subtype of the disease.

Variable	Value	SP (n=17)	macrofocalMM (n=4)	MGUS (n=150)	SMM (n=25)	MM (n=68)
% of tumor PC from all PB leucocytes	Median	<0.0001%	<0.0001%	0.0002%	0.004%	0.04%
	Range	(<0.0001%-0.002%)	(<0.0001%-0.0001%)	(<0.0001%-0.16%)	(0.0001%-0.2%)	(0.0002%-12.6%)
	<i>p</i> value	0.007#; <0.001*	<0.01*	<0.001*	0.005**	-
Number of tumor PC/μL of PB	Median	<0.001	<0.001	0.008	0.16	1.9
	Range	(<0.001-0.1)	(<0.001-0.01)	(<0.001-9.8)	(0.005-12.9)	(0.007-339.9)
	<i>p</i> value	0.007#; <0.001*	<0.01*	<0.001*	0.005**	-
% of tumor PC from all PB PC	Median	0%	0%	0.8%	15.8%	47.9%
	Range	(0%-3.9%)	(0%-1.4%)	(0%-94.2%)	(0.4%-92.4%)	(0.2%-99.9%)
	<i>p</i> value	0.002#; <0.001*	<0.01*	<0.001*	0.05**	-

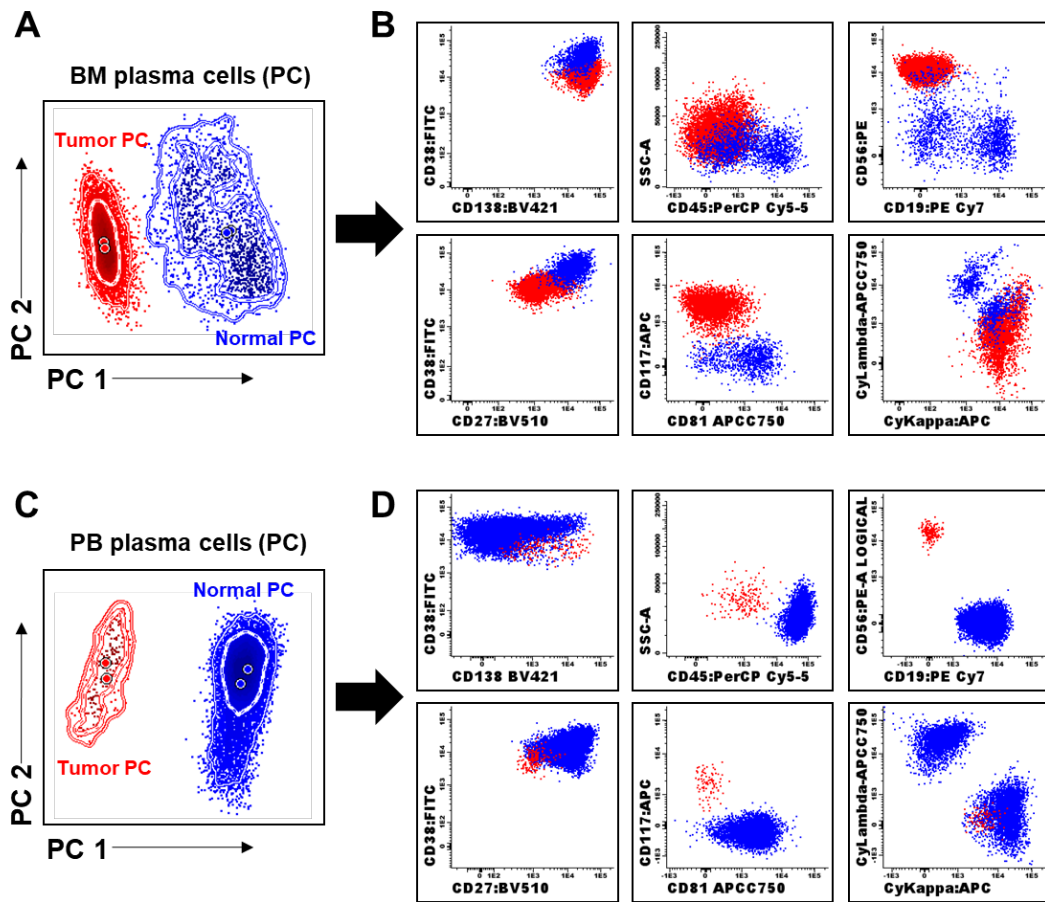
Results expressed as median values (range). #*p*-value vs. MGUS; **p*-value vs. MM and SMM; ***p*-value vs. MM. PC, plasma cell; PB, peripheral blood; PCN, PC neoplasm; SP, solitary plasmacytoma; macrofocalMM, macrofocal MM; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; SMM, smoldering MM; MM, multiple myeloma.

Supplemental Table 5. Distribution of NPC in the PB of HD and PCN patients grouped per diagnostic subtype of the disease.

Variable	Value	HD	SP	macrofocalMM	MGUS	SMM	MM
		(n=71)	(n=17)	(n=4)	(n=150)	(n=25)	(n=68)
% of normal PC from all PB leucocytes	Median	0.029%	0.028%	0.04%	0.014%	0.020%	0.023%
	Range	(0.002%-0.19%)	(0.005%-0.1%)	(0.008%-0.09%)	(0.0007%-0.3%)	(0.0004%-0.2%)	(0.001%-0.5%)
	<i>p</i> value	-	-	-	<0.001 [‡] ; 0.001 [*]	-	-
Number of normal PC/ μ L of PB	Median	1.9	1.4	3.3	0.8	1.0	1.3
	Range	(0.14-16)	(0.05-9.8)	(0.7-5.7)	(0.04-18.8)	(0.01-14.8)	(0.08-16)
	<i>p</i> value	-	-	-	<0.001 [‡] ; 0.001 [*]	0.005 [‡]	-

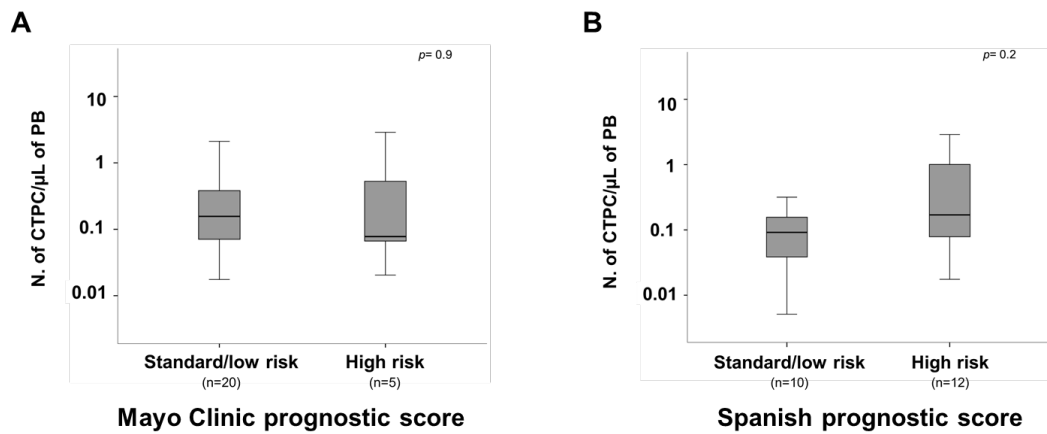
Results expressed as median values (range). [‡]*p*-value vs. HD; ^{*}*p*-value vs. MM. PC, plasma cell; NPC, normal PC PB, peripheral blood; HD, healthy donor; PCN, PC neoplasm; SP, solitary plasmacytoma; macrofocalMM, macrofocal MM; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; SMM, smoldering MM; MM, multiple myeloma.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1. Illustrating example of the immunophenotypic features of normal PC (blue dots) and tumor PC (red dots) from paired BM (Panel A and B) and PB (Panel C and D) samples from a representative newly-diagnosed MM patient. Principal Component 1 (PC) vs. PC2 analysis of the overall immunophenotype of normal (blue dots) vs. tumor (red dots) PC in paired BM (Panel A) and PB (Panel C) samples for the 8-markers included in tube 1 plus CylgKappa/CylgLambda (tube 2) of the NGF EuroFlow-IMF MM MRD antibody panel. In the right panels, conventional bidimensional dot plots illustrating the specific phenotypic and light scatter patterns observed for BM (Panel B) and PB (Panel D) normal (blue dots) and tumor (red dots) PC are shown. PB, peripheral blood; BM, bone marrow; PC, plasma cell; MM, multiple myeloma; Cylg, cytoplasmic immunoglobulin; NGF, next generation flow; IMF, International Myeloma Foundation; MRD, minimal residual disease.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2. Absolute CTPC counts in PB of SMM patients grouped according to the Mayo Clinic prognostic index (Panel A) and the Spanish prognostic score (Panel B). Boxes extend from the 25th to the 75th percentile values; the line in the middle and vertical lines correspond to the median value and the 10th and 90th percentiles, respectively. PC, plasma cell; CTPC; circulating tumor PC; PB, peripheral blood; SMM, smoldering multiple myeloma.

-Anexo III-

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL

ARTÍCULO 3

“Monitorización de células plasmáticas tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con mieloma múltiple tras tratamiento mediante citometría de flujo de nueva generación”

En esta sección se recogen: 1) los materiales y métodos suplementarios, haciendo especial hincapié en el tipo de esquema terapéutico administrado y la respuesta clínica alcanzada tras su aplicación, en los pacientes con mieloma múltiple (MM) incluidos en este estudio; 2) la descripción de las combinaciones de anticuerpos monoclonales y los reactivos usados en la técnica de citometría de flujo de nueva generación (NGF) e inmunofijación, respectivamente; 3) la descripción de los métodos estadísticos utilizados y la definición del punto basal de seguimiento para el cálculo de las curvas de supervivencia de los pacientes con MM incluidos en este estudio; 4) los resultados respecto a la distribución de los pacientes con MM que mostraron células plasmáticas tumorales circulantes (CPTC) en sangre tras la terapia y los números absolutos de estas CPTC, de acuerdo a la respuesta clínica alcanzada con el tratamiento (RC vs. ≠RC); 5) el impacto pronóstico (supervivencia libre de progresión) asociado con la detección de CPTC en sangre vs. el estudio de enfermedad mínima residual (EMR) en muestras pareadas de médula ósea, según la fase (durante o final) de tratamiento donde se realizó el análisis; 6) las características clínicas basales de los pacientes con MM incluidos en este estudio; 7) la distribución de casos positivos y negativos para CPTC en sangre respecto a la presencia vs. ausencia de EMR en médula ósea y del resultado de inmunofijación en suero, agrupado según la respuesta clínica alcanzada (RC vs. ≠RC) y la fase (durante o final) de tratamiento donde se realizó el análisis; 8) medianas y rangos de los recuentos de CP tumorales en sangre y MO de las muestras pareadas estudiadas en este trabajo, tanto en la serie global de pacientes como según la respuesta clínica alcanzada con el tratamiento (RC vs. ≠RC).

Blood (2019), 134:24
DOI: 10.1182/blood.2019002610.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary methods

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples. Multiple myeloma (MM) patients were treated out of clinical trials and grouped according to time of minimal residual disease (MRD) assessment²¹⁵ into: (1) cases evaluated during (active) treatment (n=30) -immediately prior to autologous stem cell transplantation (ASCT) or after induction (high-dose therapy based on: bortezomib+ thalidomide+ dexamethasone (VTD), bortezomib+ lenalidomide+ dexamethasone (VRD), carfilzomib+ lenalidomide+ dexamethasone (KRD), bortezomib+ cyclophosphamide+ dexamethasone (VCD) or bortezomib+ melphalan+ prednisone (VMP) regimens)- and, (2) after the end of (active) ASCT therapy (n=107). Overall, 118/137 patients received or were candidates to undergo an ASCT. At the time of bone marrow (BM) MRD plus blood circulating tumor plasma cells (CTPC) analyses, patients were categorized by the 2016 International Myeloma Working Group (IMWG) response criteria¹³⁷ into: cases in stringent CR (sCR)/CR (n=71), very good partial response (VGPR; n=33), partial response (PR; n=10), stable disease (SD; n=2), and progressive disease (PD; n=21). Those 54 patients in whom sequential follow-up blood samples were evaluated for both serum immunofixation (sIF) and CTPC (median interval between sequential analyses of 10 months) included: (1) MM cases in which either blood CTPC or sIF were persistently negative (negative/negative; 36 and 29 cases, respectively) or they turned negative after a first positive evaluation (positive/negative; 6 and 11 cases, respectively); and (2) MM patients who were either CTPC or sIF positive in the last evaluation, regardless of their previous status (negative/positive, 6 and 5 cases, respectively; and, positive/positive, 6 and 9 cases, respectively).

Prior to entering the study, written informed consent was given by each patient according to the Declaration of Helsinki. All samples were received and processed at the different participating centers (USAL-HUSA, UFRJ-IPPMG).

Immunophenotypic and immunofixation studies. Blood and BM aspirated samples were collected in tubes containing EDTA as anticoagulant and prepared following the EuroFlow bulk-lysis, surface membrane (sm)-only and sm-plus-cytoplasmic (cy) standard EuroFlow staining

procedures, as described elsewhere. The 2-tube/8-color EuroFlow MM MRD antibody panel “allows confirmation in a second independent measurement, of the clonal nature of suspicious (low numbers of) tumor plasma cells (TPC), through evaluation of the cytoplasmic kappa/lambda restriction of phenotypically aberrant PC which has previously proved to be required in a significant number of cases”³⁷³. As previously described in detail, in tube 1, cells were stained for: CD138-BV421, CD27-BV510, CD38ME-FITC, CD56-PE, CD45-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, CD117-APC and CD81-APCC750; while in tube 2, the CD138-BV421, CD27-BV510, CD38-FITC, CD56-PE, CD45-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, Cy-immunoglobulin (Ig) Kappa-APC and CyIgLambda-APCC750 staining were used. Stained cells were measured in FACSCanto II flow cytometers - Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA- using the FASCDiVa software (BD). The percentage of tumor plasma cells (TPC) defined on immunophenotypic grounds was determined from all BM and blood nucleated cells, respectively, while absolute blood CTPC counts were calculated using a dual-platform approach, as previously described³⁷⁷. For flow cytometry data analysis, the *Infinicyt* software (version 2.0; Cytognos SL, Salamanca, Spain), was used. CTPC-negativity and MRD-negativity were defined as absence of TPC in blood or BM by NGF with a limit of detection of $<2 \times 10^{-6}$, respectively; while CTPC-positivity and MRD-positivity indicated presence of TPC in blood or BM by NGF above this cutoff level.

In parallel to CTPC NGF analyses, sIF using HYDRAGEL kits (HYDRASYS system, Sebia, Barcelona, Spain)³⁷⁸ was performed to detect the tumor M-component in fresh serum samples collected in tubes without anticoagulant, following the recommendations of the manufacturer.

Statistical methods. Crosstab tables were used to compare the distribution of cases presenting TPC by next generation flow (NGF) in paired blood vs. BM samples, and to assess the relationship between the blood CTPC status by NGF and sIF status. The Fisher’s Exact test and the Wilcoxon test were applied to calculate the statistical significance of differences observed between groups for (paired) categorical and continuous variables, respectively. The Kaplan–Meier method and either the (two-sided) log-rank or the post-hoc tests were used to plot and compare progression-free survival (PFS) curves between two or more than two patient groups, respectively. PFS was calculated as the time lapse from assessment of response (BM MRD plus first blood CTPC analysis), to either disease progression or death for any reason. PFS hazard ratio (HR) values were estimated using Cox regression modelling by the forward Wald-stepwise method, after the

proportional hazard assumption was checked for each covariable. Those covariables that showed (statistically) significant impact on PFS in multivariate analysis, were used to build a prognostic score. Statistical significance was set at p -values <0.05 . For all statistical analyses, the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 23; IBM, Armonk, NY), was used.

Supplementary results

Blood CTPC vs. BM MRD status. At time of analysis of blood CTPC plus BM MRD and sIF, 52% of all MM patients were in CR or sCR (71/137), while the other cases (66/137; 48%) reached lower quality of response to therapy (p.ej. VGPR, PR, SD, PD) independently of their sIF status (4 were sIF⁻). Of note, those sCR/CR cases who had CTPC in blood at time of analysis, showed median percentage and absolute CTPC counts significantly lower than those observed within non-CR CTPC⁺ cases ($p=0.001$): 0.0002% (range: $<0.0001\%$ -0.007%) and 17 CTPC/mL of blood (range: <5 -457 CTPC/mL) vs. 0.005% (range: $<0.0001\%$ -0.6%) and 241 CTPC/mL of blood (range: <5 -18,352 CTPC/mL), respectively (Supplemental Table 3).

Prognostic impact of PB CTPC vs. BM MRD. Overall, the blood CTPC status emerged as a prognostic factor independent of the phase of treatment at which it was assessed with median PFS of 17 vs. 50 months for CTPC⁺ vs. CTPC⁻ cases analyzed during therapy ($p=0.001$; Supplemental Figure 1A) and of 6 vs. 32 months for those evaluated after discontinuation of active treatment ($p<0.0001$; Supplemental Figure 1D). Similarly, positivity for BM MRD showed a significant impact on PFS (vs. BM MRD⁻ cases) once assessed during or at the end of active treatment with median PFS of 19 vs. 46 months ($p=0.02$; Supplemental Figure 1B) and of 18 vs. 46 months ($p<0.0001$; Supplemental Figure 1E), respectively. Of note, the distribution of cases presenting blood CTPC according to their BM MRD and sIF status, was similar in MM patients investigated during and after active treatment vs. the whole series (Supplemental Table 4).

References

137. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17(8):e328–e346.
215. Paiva B, Dongen JJM Van, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood.* 2015;125(20):3059–3069.
373. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017;31(10):2094–2103.
377. Menéndez P, del Cañizo MC, Orfao A. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2001;15(1):53–61.
378. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, Blanckaert N. Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clin. Chem.* 1998;44(5):944–949.

Supplemental table 1. Baseline MM patient characteristics (n=137).

Patients Characteristics	Distribution
Age, years, median (range)	63 (40-85)
Sex, males/females, (%)	58% / 42%
Hemoglobin, g/dL, median (range)	11.6 (4-16.3)
Serum calcium, mg/dL, median (range)	9.6 (7.1-14)
Serum creatinine, mg/dL, median (range)	0.9 (0.4-13.9)
Serum albumin, g/dL, median (range)	3.9 (2.6-5.1)
Serum β_2 -microglobulin, mg/L, median (range)	3.3 (1.1-33.3)
Bone marrow-plasma cell FISH, n (%)	96 (70%)
Abnormal cytogenetic profile*	45 (47%)
• t(4;14)	13 (21.3%)
• t(11;14)	7 (11.4%)
• t(14;16)	4 (6.5%)
• Del(17p)	13 (21.3%)
• Del(13q)	5 (8.2%)
• 1q gains	8 (13%)
• IgH translocation with unknow partner/deletion	9 (15%)
• Monosomy 13	2 (3.3%)
Normal FISH	51 (53%)

* ≥ 2 abnormal cytogenetic mutations could be present at the same patient. MM, multiple myeloma; y, years old; FISH, fluorescent in situ hybridization; t, translocation; Del, deletion; IgH, immunoglobulin heavy chain.

Supplemental Table 2. Blood CTPC status *vs.* BM MRD and serum IF status of MM patients (n=137) classified according to response to therapy

BM MRD status	Blood CTPC status			<i>P</i>
	Negative	Positive	Total	
Negative	46/137 (34%)	0/137 (0%)	46/137 (34%)	<0.0001
Positive	55/137 (40%)	36/137 (26%)	91/137 (66%)	
Total	101/137 (74%)	36/137 (26%)	137/137 (100%)	
Serum IF status				
Negative	60/137 (44%)	15/137 (11%)	75/137 (55%)	0.08
Positive	41/137 (30%)	21/137 (15%)	62/137 (45%)	
Total	101/137 (74%)	36/137 (26%)	137/137 (100%)	
BM MRD Negative				
sIF Negative	36/46 (78%)	0/46 (0%)	36/46 (78%)	-
sIF Positive	10/46 (22%)	0/46 (0%)	10/46 (22%)	
Total	46/46 (100%)	0/46 (0%)	46/46 (100%)	
BM MRD Positive				
sIF Negative	24/91 (26%)	15/91 (17%)	39/91 (43%)	1.0
sIF Positive	31/91 (34%)	21/91 (23%)	52/91 (57%)	
Total	55/91 (60%)	36/91 (40%)	91/91 (100%)	
From sCR/CR MM Cases				
BM MRD Negative	36/71 (51%)	0/71 (0%)	36/71 (51%)	<0.0001
BM MRD Positive	23/71 (32%)	12/71 (17%)	34/71 (49%)	
Total	59/71 (83%)	12/71 (17%)	71/71 (100%)	

CTPC, circulating tumor plasma cells; BM, bone marrow; MRD, minimal residual disease; sIF, serum immunofixation; MM, multiple myeloma; CR, complete response; sCR, stringent complete response; sCR/CR MM cases includes sCR and CR cases.

Supplemental Table 3. Relative and absolute CTPC counts in blood *vs.* BM MRD levels for the whole MM patient cohort (n=137) and for MM cases classified according to response to therapy (sCR/CR *vs.* non-CR cases).

Patient group	CTPC cases detected	N. of CTPC/ mL of Blood	% of CTPC in blood	% of TPC in BM	<i>p</i> (% Blood CTPC <i>vs.</i> % BM MRD)
Whole MM series (n=137)	CTPC - (n=101)	NA	NA	0.0001 (<0.0001-1.8)	-
	CTPC + (n=36)	86 (<5-18,352)	0.0014 (<0.0001-0.6)	0.14 (0.0005-14.3)	<0.0001
	Total	<5 (<5-18,352)	<0.0001 (<0.0001-0.6)	0.002 (<0.0001-14.3)	<0.0001
MM sCR/CR cases (n=71)	CTPC - (n=59)	NA	NA	<0.0001 (<0.0001-1.8)	-
	CTPC + (n=12)	17* (<5-457)	0.0002* (<0.0001-0.007)	0.07 (0.0008-1.6)	0.002
	Subtotal	<5* (<5-457)	<0.0001* (<0.0001-0.007)	<0.0001* (<0.0001-1.8)	<0.0001
MM Non-sCR/CR cases (n=66)	CTPC - (n=42)	NA	NA	0.004 (<0.0001-0.2)	-
	CTPC + (n=24)	241 (<5-18,352)	0.005 (<0.0001-0.6)	0.2 (0.0005-14.3)	<0.0001
	Subtotal	<5 (<5-18,352)	<0.0001 (<0.0001-0.6)	0.02 (<0.0001-14.3)	<0.0001

**P* <0.01 *vs.* MM cases who did not reach sCR/CR.

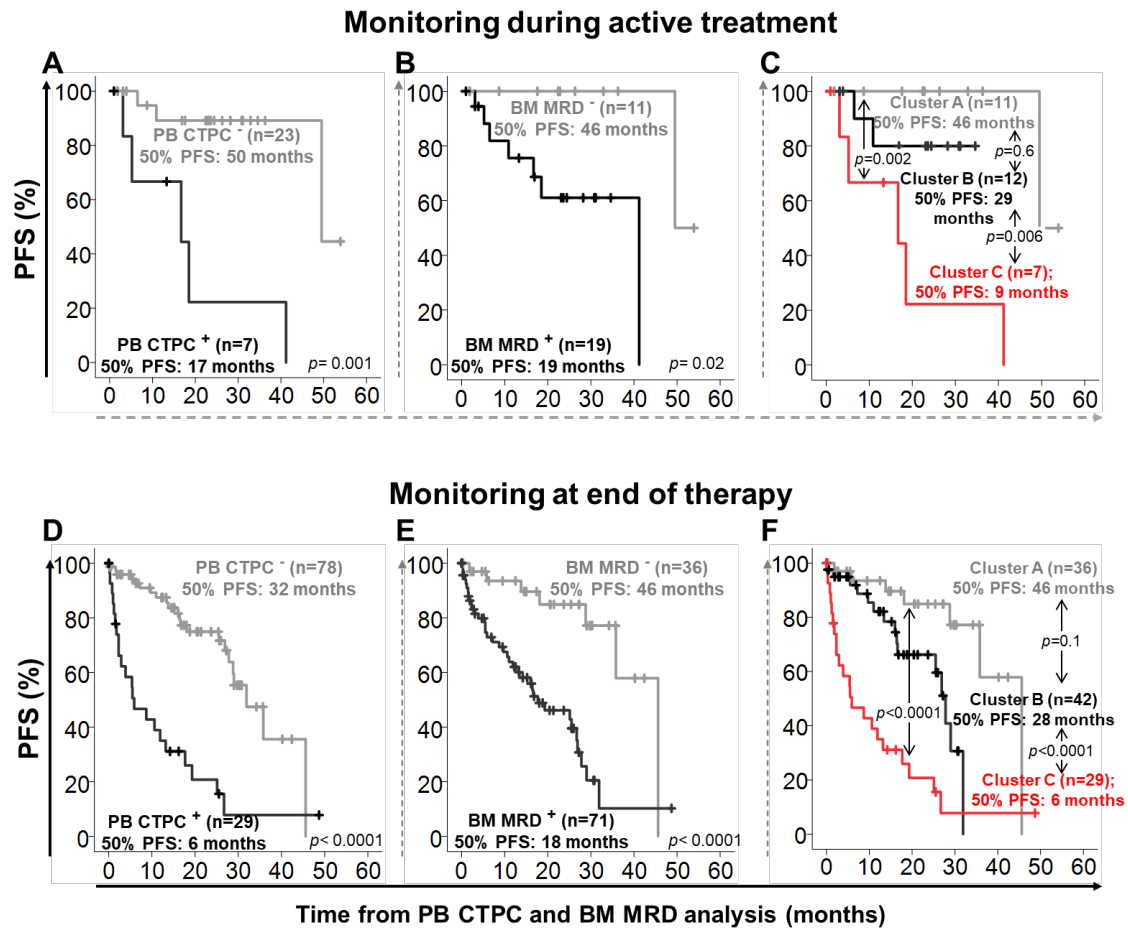
Results expressed as median (range) values. NA, not applicable; N; number; CTPC, circulating tumor plasma cell; TPC, tumor plasma cell; BM, bone marrow; MRD, minimal residual disease; MM, multiple myeloma; Non-sCR/CR MM patients includes VGPR, PR, SD, PD cases; sCR/CR MM cases includes sCR and CR cases; CR, complete response; sCR, stringent complete response; PR, partial response; VGPR, very good partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease.

Supplementary Table 4. Blood CTPC status vs. BM MRD and serum IF status of MM patients during (n=30) and after active (n=107) treatment.

From during active treatment patients				
	Blood CTPC status			
BM MRD status	Negative	Positive	Total	<i>P</i>
Negative	11/30 (37%)	0/30 (0%)	11/30 (37%)	0.03
Positive	12/30 (40%)	7/30 (23%)	19/30 (63%)	
Total	23/30 (77%)	7/30 (23%)	30/30 (100%)	
Serum IF status				
Negative	17/30 (57%)	3/30 (10%)	20/30 (67%)	0.2
Positive	6/30 (20%)	4/30 (13%)	10/30 (33%)	
Total	23/30 (77%)	7/30 (23%)	30/30 (100%)	
BM MRD negative				
sIF negative	10/11 (91%)	0/11 (0%)	9/11 (91%)	-
sIF positive	1/11 (9%)	0/11 (0%)	1/11 (9%)	
Total	11/11 (100%)	0/11 (0%)	11/11 (100%)	
BM MRD positive				
sIF negative	7/19 (37%)	3/19 (16%)	10/19 (53%)	0.7
sIF positive	5/19 (26%)	4/19 (21%)	9/19 (47%)	
Total	12/19 (63%)	7/19 (37%)	19/19 (100%)	
From after active treatment patients				
BM MRD status				
Negative	36/107 (34%)	0/107 (0%)	36/107 (34%)	<0.0001
Positive	42/107 (39%)	29/107 (27%)	71/107 (66%)	
Total	78/107 (73%)	29/107 (27%)	107/107 (100%)	
Serum IF status				
Negative	42/107 (39%)	12/107 (11%)	54/107 (50%)	0.2
Positive	36/107 (34%)	17/107 (16%)	53/107 (50%)	
Total	78/107 (73%)	29/107 (27%)	107/107 (100%)	
BM MRD negative				
sIF negative	26/36 (72%)	0/36 (0%)	26/36 (72%)	-
sIF positive	10/36 (28%)	0/36 (0%)	10/36 (28%)	
Total	36/36 (100%)	0/36 (0%)	36/36 (100%)	
BM MRD positive				
sIF negative	16/71 (22%)	12/71 (17%)	28/71 (39%)	0.8
sIF positive	26/71 (37%)	17/71 (24%)	43/71 (61%)	
Total	42/71 (59%)	29/71 (41%)	71/71 (100%)	

CTPC, circulating tumor plasma cells; BM, bone marrow; MRD, minimal residual disease; sIF, serum immunofixation; MM, multiple myeloma.

Supplementary Figure 1



Supplemental Figure 1. PFS curves of MM patients grouped according to their PB CTPC, BM MRD status and both PB CTPC and BM MRD status during active treatment (A to C, respectively) and at the end of active therapy (D to F, respectively). (C and F) Cluster A (grey line) represents cases that were simultaneous negative for paired BM MRD and PB CTPC; Cluster B (black line) represents BM MRD positive and PB CTPC negative cases; and, Cluster C (red line) represents cases that were simultaneous positive for BM MRD and PB CTPC. PB, peripheral blood; BM, bone marrow; MRD; minimal residual disease; NGF, next generation flow; PFS, progression-free survival; CTPC, circulating tumor plasma cell; NR, not reached; MM, multiple myeloma.