



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGÍA**

**FACTORES PRONÓSTICOS EN EL MIELOMA
MÚLTIPLE EN FASE ASINTOMÁTICA Y
SINTOMÁTICA**

**TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
Verónica González de la Calle**

Salamanca, 2018

La presente Tesis Doctoral corresponde a un compendio de tres trabajos previamente publicados que se especifican a continuación:

1. Bence Jones proteinuria in smoldering multiple myeloma as a predictor marker of progression to symptomatic multiple myeloma.

Verónica González-Calle, Julio Dávila, Fernando Escalante, Alfonso García de Coca, Carmen Aguilera, Rosa López, Abelardo Bárez, José María Alonso, Roberto Hernández, José Mariano Hernández, Pilar de la Fuente, Noemí Puig, Enrique María Ocio, Norma Carmen Gutiérrez, Ramón García-Sanz y María Victoria Mateos.

Leukemia. 2016;30(10):2026-31. doi:10.1038/leu.2016.123

2. Evaluation of Revised International Staging System (R-ISS) for transplant-eligible multiple myeloma patients.

Verónica González-Calle, Abigail Slack, Niamh Keane, Susan Luft, Kathryn E. Pearce, Rhett P. Ketterling, Tania Jain, Sintosebastian Chirackal, Craig Reeder, Joseph Mikhael, Pierre Noel, Angela Mayo, Roberta H. Adams, Gregory Ahmann, Esteban Braggio, Keith A. Stewart, Leif Bergsagel, Scott A. Van Wier, y Rafael Fonseca.

Annals of Hematology. Publicado *online* el 6 de abril de 2018. doi:10.1007/s00277-018-3316-7

3. Recovery of polyclonal immunoglobulins one year after autologous stem cell transplantation as a long-term predictor marker of progression and survival in multiple myeloma.

Verónica González-Calle, Seila Cerdá, Jorge Labrador, Eduardo Sobejano, Beatriz González-Mena, Carmen Aguilera, Enrique María Ocio, María Belén Vidriales, Noemí Puig, Norma Carmen Gutiérrez, Ramón García-Sanz, José María Alonso, Rosa López, Carlos Aguilar, Alfonso García de Coca, Roberto Hernández, José Mariano Hernández, Fernando Escalante y María-Victoria Mateos.

Haematologica. 2017;102(5):922-31. doi:10.3324/haematol.2016.158345

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a las personas que marcaron mi trayectoria académica, en especial a la Profesora Soledad Badillo, por contagiarnos su interés y entusiasmo por la vida a través de la Biología, y a los Dres. Ata González, Rafael Martínez, Celina Benavente y por supuesto, al Profesor San Miguel, por descubrirme el apasionante campo de la Hematología.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a mis directoras y maestras, las Dras. Mariví Mateos y Norma Gutiérrez, por su constante ayuda y por ser un ejemplo a seguir en su dedicación asistencial, docente e investigadora. Por ser las primeras personas que me tendieron la mano y me guiaron, con generosidad y entrega, por el camino de la investigación. Su consejo y su experiencia han supuesto para mí un gran aprendizaje tanto a nivel profesional como personal. A los Dres. Ramón García Sanz y Mónica Cabrero, por impulsarme en el salto al otro lado del charco. A la Dra. Lola Caballero por compartir su infinito conocimiento y al Dr. Marcos González, por su confianza.

También quiero agradecer al personal del Servicio de Hematología su buen recibimiento y apoyo diario, especialmente a los residentes y enfermeras, a mis compañeros del grupo cooperativo de Gammapatías Monoclonales de Castilla y León y, por supuesto, a los pacientes, ya que este trabajo no habría sido posible sin cada uno de ellos.

A mis amigas María e Itziar por los buenos momentos pasados y estar siempre *un poco menos lejos*. A la "Vieja Guardia" por las aventuras y risas compartidas. Y a "Rizadiñas" por acogerme tan bien en esta fría ciudad.

Finalmente, gracias a mi familia, a mis padres por su cariño, por ser un ejemplo a seguir y por apoyarme siempre en mis decisiones. Y, en especial, a Antonio, por ser el mejor compañero en este viaje, por llenarlo de música y ser un apoyo incondicional diario, y por innumerables motivos...GRACIAS.

A mi familia

'Science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation of life. In so far as it goes, it is based on fact, experience, and experiment... I agree that faith is essential to success in life. In my view, all that is necessary for faith is the belief that by doing our best we shall come nearer to success and that success in our aims (the improvement of the lot of mankind, present and future) is worth attaining'.

--Rosalind Franklin in a letter to her father, Ellis Franklin.

Summer 1940.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
1. Generalidades sobre las gammapatías monoclonales	11
1.1 Criterios diagnósticos de las gammapatías monoclonales	12
1.2 Biología de la célula plasmática tumoral	15
1.3 Inmunoglobulinas: caracterización y estudio	22
1.4 Caracterización inmunofenotípica y genética de la célula mielomatosa	27
2. Mieloma asintomático	29
2.1 Riesgo de progresión a MM	29
2.2 Factores pronósticos	30
2.3 Modelos de estratificación pronóstica	34
2.4 Manejo clínico	36
3. Mieloma múltiple	37
3.1 Tratamiento	37
3.2 Factores pronósticos al diagnóstico	42
3.3 Modelos de estratificación pronóstica	44
3.4 Factores pronósticos tras el trasplante autólogo	47
4. Referencias de la Introducción	55
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO	71
OBJETIVOS	75
RESULTADOS	79
5. Trabajo 1. La proteinuria de Bence Jones en pacientes con mieloma asintomático como predictor de progresión a mieloma	81
5.1 Resumen trabajo 1	82
6. Trabajo 2. Evaluación del modelo pronóstico R-ISS en pacientes con mieloma múltiple candidatos a trasplante autólogo.	91
6.1 Resumen trabajo 2	92
7. Trabajo 3. La recuperación de las inmunoglobulinas policlonales al año del trasplante autólogo como marcador pronóstico de supervivencia a largo plazo en el mieloma múltiple	105
7.1 Resumen trabajo 3	106
CONCLUSIONES	125
SUMMARY (MENCIÓN INTERNACIONAL)	129
FINANCIACIÓN RECIBIDA PARA ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN	146
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	150

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre las gammopatías monoclonales

Las gammopatías monoclonales son un grupo de trastornos caracterizados por la acumulación de células plasmáticas (CP) clonales en la médula ósea (MO) que producen una inmunoglobulina (Ig) monoclonal denominada componente monoclonal (CM) o paraproteína, detectable en suero y/u orina.

La célula protagonista del mieloma múltiple (MM), la CP, fue representada y caracterizada morfológicamente por primera vez en 1890 por el médico español Santiago Ramón y Cajal (Figura 1) aunque el nombre de célula plasmática le fue asignado posteriormente por Waldeyer ¹.

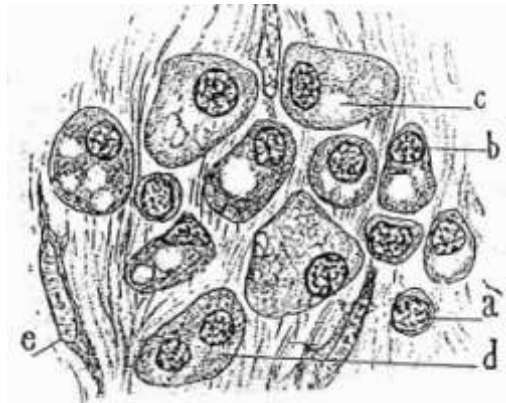


Figura 1. Dibujo de las células plasmáticas realizado por Ramón y Cajal, Manual de Anatomía Patológica, 1890

En 1845, el Dr. Bence-Jones, un patólogo químico inglés, analizó la orina del primer paciente descrito con MM, el señor McBean, y, aunque no llegó a identificar la proteína que lleva su nombre, en el certificado de defunción de McBean consta como desencadenante de su muerte la "atrofia por albuminuria" ². Años más tarde, en 1880, se utilizó por primera vez el término proteinuria de Bence Jones (BJ). En 1921, un profesor de la Universidad Johns Hopkins y su ayudante descubrieron que las proteínas de BJ eran diferentes a las proteínas séricas normales y describieron dos grupos distintos: I y II. Posteriormente en 1956, en Nueva York, Korngold y Lipiari, relacionaron estructuralmente las proteínas de BJ y las proteínas séricas del MM y describieron la

presencia de dos proteínas diferentes en la orina que nombraron como Kappa y Lambda tomando la primera letra de cada uno de sus apellidos ¹.

En 1948, Astrid Fagraeus demostró por primera vez que los anticuerpos o Igs son producidos por las CP ³. En los años 60, Edelman y Porter descubrieron la estructura de los anticuerpos, motivo por el cual recibieron en 1972 el premio Nobel ⁴. Además, en 1968 se descubrió que las proteínas de BJ tenían la misma secuencia de aminoácidos que la cadena ligera de las proteínas séricas IgG de un paciente con MM ⁵.

1.1 Criterios diagnósticos de las gammopatías monoclonales

Clásicamente se han diferenciado tres entidades: la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), el mieloma asintomático también denominado *smoldering* o quiescente (MMQ) y el mieloma múltiple (MM).

El MM es el paradigma de gammapatía monoclonal. Representa el 1% de todos los tipos de cáncer y aproximadamente el 10% de las neoplasias hematológicas. La incidencia es de 4-5 casos por 100.000 habitantes al año en los países occidentales. Es una enfermedad que afecta a personas de edad avanzada, con una mediana de edad al diagnóstico de 70 años ⁶. Sin embargo, también afecta a personas jóvenes, siendo un tercio de los pacientes menores de 65 años.

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que la práctica totalidad de los MM están precedidos de una GMSI ^{7, 8}. La GMSI se trata de una entidad premaligna, relativamente frecuente entre la población mayor de 70 años de países occidentales (3-5%) ^{9, 10}, aunque con un riesgo bajo de progresión a MM, 1% al año ¹¹.

El MMQ es también una gammapatía monoclonal asintomática, definida en 1980 por Kyle y Greipp al observar una serie de seis pacientes con criterios de mieloma múltiple que nunca desarrollaron sintomatología clínica relacionada con el mismo ¹². El 11-14% de los pacientes con mieloma son asintomáticos según los registros nacionales de MM de Suecia ¹³ y Dinamarca ¹⁴, con una incidencia ajustada a la edad de 0,44 casos por 100.000 habitantes. Globalmente, el riesgo de progresión a MM es mayor que

en la GMSI, del 10% al año, por lo que es considerado un estadio intermedio entre la GMSI y el MM, si bien el riesgo de progresión no es el mismo a lo largo del tiempo ¹⁵.

En el año 2003, el *International Myeloma Working Group* (IMWG) publicó los criterios diagnósticos que permitieron definir cada una de estas entidades ¹⁶. Estos criterios fueron actualizados en 2009 ¹⁷ y 2014 ¹⁸. Los criterios anteriores a 2014 diferencian el MM de la GMSI y el MMQ en función de la presencia de la sintomatología relacionada con el daño orgánico (Tabla 1). Dicha sintomatología se recoge bajo el acrónimo CRAB e incluye hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia, y lesiones óseas que producen dolor óseo, siendo éste el síntoma más típico en los pacientes con MM ¹⁹. La insuficiencia renal está presente en el 20-25% de los casos y es de origen multifactorial, si bien la causa más frecuente es la eliminación renal de cadenas ligeras de inmunoglobulinas (Igs) y el consecuente daño renal por precipitación en los túbulos renales o nefropatía cast ²⁰. La anemia es también de origen multifactorial y está presente hasta en el 50% de los casos.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de gammopatías monoclonales (2003). Kyle et al. ¹⁶

Característica	GMSI	MMQ	MM
CMs	< 3g/dL y	≥ 3g/dL y/o	Presente y
CP en MO	< 10 %	≥ 10%	Presentes ^b / plasmocitoma
Daño orgánico ^a	Ausente	Ausente	Presente

a. Daño orgánico relacionado:

- Sintomatología CRAB: Hipercalcemia: calcio sérico > 0,25 mmol/L (> 1 mg/dL) del límite alto de la normalidad o 2,75 mmol/L (> 11 mg/dL); insuficiencia renal: creatinina sérica > 177 µmol/L (> 2 mg/dL); anemia: hemoglobina > 2g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad, o hemoglobina < 10 g/dL; y lesiones óseas líticas u osteoporóticas que condicionen fracturas por compresión.
- Sintomatología de hiperviscosidad, amiloidosis o infecciones recurrentes bacterianas (> 2 episodios en 1 año). Este criterio fue eliminado de los criterios de 2009.

b. Aunque normalmente es ≥ 10%, en los criterios de 2003 no es imprescindible, incorporándose en los criterios diagnósticos de 2009.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de las gammopatías monoclonales (2014). Modificado de Rajkumar et al.¹⁸

Característica	GMSI	MMQ	MM
CMs	< 3g/dL y	≥ 3g/dL y/o	Presente o ausente ^b
CP en MO	< 10 %	10 - 60 %	≥ 10% o plasmocitoma confirmado histológicamente
MDE ^a	Ausentes	Ausentes	Presentes

a. MDE: eventos que definen el mieloma:

- Sintomatología CRAB: Hipercalcemia: calcio sérico > 0,25 mmol/L (> 1 mg/dL) del límite alto de la normalidad o 2,75 mmol/L (> 11 mg/dL); insuficiencia renal: creatinina sérica > 177 μmol/L (> 2 mg/dL) o aclaramiento de creatinina < 40 ml/min; anemia: hemoglobina > 2g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad, o hemoglobina < 10 g/dL; lesiones óseas: una o más lesiones osteolíticas (≥ 5 mm)^{18, 19} detectadas en la serie ósea, tomografía computarizada (TC) o tomografía por emisión de positrones (PET-TC), o
- al menos uno de los biomarcadores de malignidad: ≥ 60% de CP en MO, ratio de cadena ligera libre implicada/no implicada ≥ 100, o > 1 lesión focal en estudio de resonancia magnética (RM) de cuerpo entero o de columna vertebral.

b. Incluye a los MM no secretores.

La actualización de los criterios diagnósticos en 2014 incluyó importantes novedades (Tabla 2)¹⁸. De acuerdo a estos criterios, el MM se define por la presencia de alguno de los eventos que definen el mieloma (MDE) y una infiltración medular de CP ≥ 10%. Este nuevo concepto, MDE, engloba no solo la sintomatología clásica CRAB, sino también biomarcadores que, aún en ausencia de daño orgánico, predicen un riesgo inminente de desarrollar MM y por ello, su presencia determina la necesidad de tratamiento. Los biomarcadores incluidos dentro de los MDE son los siguientes: ≥ 60% CP en MO, ratio de cadenas ligeras libres en suero (sFLC) ≥ 100 y > 1 lesión focal ósea detectada por resonancia magnética (RM). La incorporación de estos biomarcadores se basó en los resultados obtenidos en al menos dos estudios independientes para cada

biomarcador. En dichos estudios se demostró que la presencia de cada biomarcador se asociaba con una probabilidad de progresión a MM a los 2 años superior al 80%²¹⁻²⁵. En consecuencia, otra de las novedades de los nuevos criterios diagnósticos es la redefinición de MMQ, pues incluye a los pacientes asintomáticos con CMs ≥ 3 g/dL y/o 10 - 60% de CP en MO y excluye a los pacientes asintomáticos con alguno de esos biomarcadores considerados actualmente MDE, de ahí que sea necesario determinar las sFLC y realizar una RM en todo paciente con MMQ para descartar lesiones óseas focales.

1.2 Biología de la célula plasmática tumoral

En los últimos años, la investigación de la biología del MM ha experimentado un progreso indiscutible gracias al desarrollo de las tecnologías genómicas, que han permitido caracterizar pormenorizadamente el genoma de la célula mielomatosa y desentrañar nuevos mecanismos patogénicos. Por otro lado, el descubrimiento de interacciones estrechas entre el micromedioambiente de la MO y las CP ha ayudado a entender algunos de los mecanismos de resistencia de la enfermedad, así como algunas de las manifestaciones clínicas de la misma.

1.2.1 La célula de origen en el MM

La célula que prolifera en la MO de los pacientes con MM es la CP tumoral. La CP se corresponde con el último estadio de diferenciación de los linfocitos B. A lo largo de este proceso de diferenciación se suceden una serie de eventos que permiten a la CP convertirse en una célula especializada en la producción de anticuerpos o Igs con alta especificidad y afinidad por su antígeno. Los puntos clave de este proceso son: el reordenamiento de los genes de la cadena pesada (*IGH*) y ligera de las Igs, que dan lugar a la formación del receptor de célula B en el precursor B de la MO; la hipermutación somática; y el cambio de clase o isotipo de la cadena pesada de las Igs, eventos que se producen tras el reconocimiento antigénico en el centro germinal del

Introducción

ganglio linfático. Finalmente, se produce la migración de la CP a la MO donde interaccionará con el estroma medular y se diferenciará a CP madura o de "larga vida". Los estudios de secuenciación del segmento variable V_H de *IGH* de la célula mielomatosa han demostrado que ésta tiene su origen en la célula B post-centro germinal, debido al gran número de mutaciones y a la ausencia de variación intraclonal que presenta^{26, 27}.

La existencia de la célula *stem* del MM es una cuestión controvertida. Hasta la fecha no se ha logrado la identificación, aislamiento o caracterización de esta célula iniciadora tumoral, con capacidad de autorrenovación y de resistencia al tratamiento. Sin embargo, los estudios realizados apoyan la hipótesis de que estas células podrían estar presentes en el compartimento de las CP tumorales²⁸. El desarrollo de técnicas como el análisis de célula única o *single cell analysis* podría ayudar en su identificación.

1.2.2 Complejidad genómica del MM

El MM es una neoplasia genéticamente compleja y heterogénea, en la que la concurrencia de eventos genómicos múltiples conduce al desarrollo y progresión tumoral. Los estudios iniciales de citogenética convencional y de hibridación *in situ* fluorescente (HISF) y los más modernos basados en *microarrays* y en secuenciación de nueva generación (NGS) han revelado la existencia de diversos tipos de alteraciones genéticas que se pueden categorizar en traslocaciones, variaciones en el número de copias (CNVs) y mutaciones puntuales.

En el MM, la mayoría de las traslocaciones afectan al cromosoma 14, específicamente al locus de *IGH* 14q32.33, uno de los genes más transcritos en la CP (Figura 2). La consecuencia del producto de fusión resultante es que determinados protooncogenes como *MMSET* o *FGFR3* en la t(4;14), *CCND3* en la t(6;14), *CCND1* en la t(11;14), *MAF* en la t(14;16) y *MAFB* en la t(14;20) pasan a ser regulados por el potente *enhancer* de *IGH*. Este aumento en la expresión de oncogenes podría conferir una ventaja selectiva a los subclones portadores de las traslocaciones²⁹. Además, estas

traslocaciones podrían ocasionar de forma directa o indirecta una desregulación de las ciclinas D, con la consecuente transición G1/S del ciclo celular, un evento molecular temprano común a todos los MM ^{29, 30}. En una proporción significativa de casos las traslocaciones afectan al oncogén *MYC* (15-20%).

Las CNVs abarcan desde deleciones o amplificaciones focales a eventos que afectan a regiones más amplias, como un brazo cromosómico o el cromosoma completo. Los MM hiperdiploides se caracterizan por la presencia de trisomías de los cromosomas impares: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, y/o 21. Otras CVNs frecuentes son la ganancia de 1q, pérdida de 1p, monosomía del 13 y deleción de 17p13. Las nuevas herramientas computacionales mejorarán la sensibilidad y permitirán la identificación de CNVs focales.

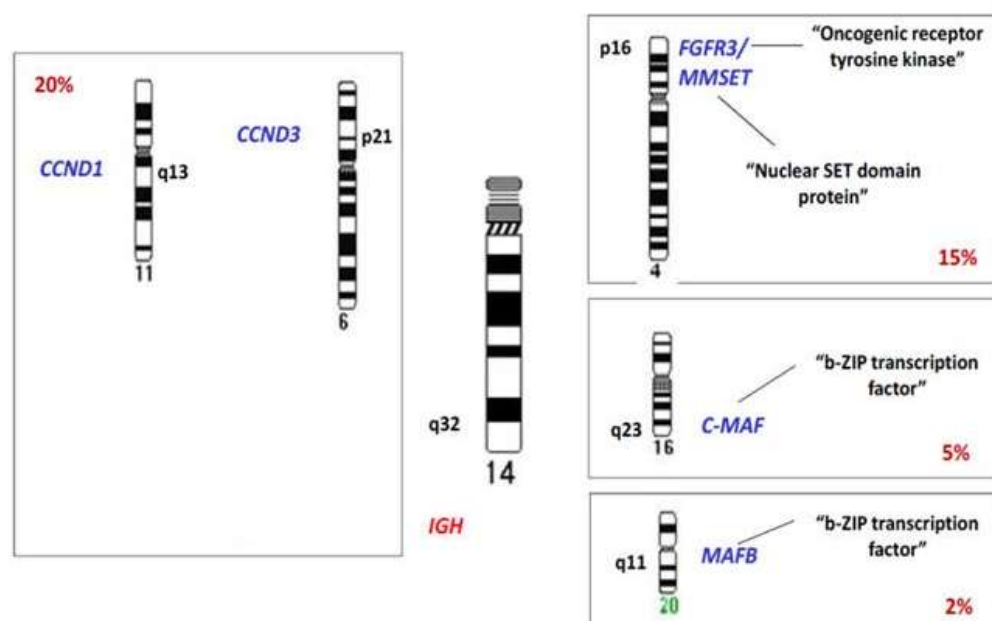


Figura 2. Traslocaciones más frecuentes del gen IGH en el mieloma múltiple

La secuenciación del exoma mediante NGS de casi 1.000 pacientes con MM ha confirmado la heterogeneidad mutacional en esta enfermedad ³¹⁻³³. Se han descrito unas 35 mutaciones no sinónimas por cada caso de MM. Además, a diferencia de otras neoplasias hematológicas, en el MM no existe una alteración única y específica, sino

Introducción

que se identifican varios genes recurrentemente mutados. Las vías de señalización que con mayor frecuencia presentan mutaciones en MM son la vía RAS/MAPK (*KRAS*, *NRAS* y *BRAF*) en el 40% de los casos, la vía NFκB (*TRAF3*, *CYLD* y *LTB*) en el 20%, y las vías de reparación de ADN (*TP53*, *ATM* y *ATR*) en el 15%. Otros genes recurrentemente mutados en MM son *PRDM1*, *IRF4*, *LTB* y *SP140*, los cuales están implicados en la diferenciación del linaje B. Los genes supresores de tumores *DIS3* y *FAM46C* también están frecuentemente mutados, aunque su papel en la oncogénesis del MM es todavía desconocido.

Las técnicas modernas de análisis genómico han demostrado que en el MM, como sucede en otras neoplasias, la población tumoral está constituida por una mezcla de subclones genéticamente diferentes^{34, 35}. El concepto de evolución intraclonal hace referencia a que los cambios genéticos propios de los diferentes subclones se producen dentro del mismo clon original definido por un reordenamiento *VDJH* inalterado durante la evolución de la enfermedad. Aunque hay mielomas que no muestran cambios genéticos en la recaída respecto al diagnóstico, el resto siguen fundamentalmente dos modelos de evolución genómica: uno integrado por los mielomas que en la recaída presentan cambios adicionales en el subclon mayoritario del diagnóstico, y otro en el que las recaídas contienen subclones que derivan de poblaciones minoritarias en el momento del diagnóstico no detectadas por técnicas convencionales^{35, 36}. Este último modelo se asemeja al esquema propuesto por Darwin para explicar el origen de las especies, de manera que las mutaciones se adquirirían al azar y serían seleccionadas en función de la ventaja proliferativa que confirieran. En este contexto de competición entre los distintos clones, la progresión del mieloma vendría definida por la expansión de un clon determinado que se convertiría en el dominante, bien por adaptarse mejor a nichos del microambiente o por resistir con mayor ventaja proliferativa las sucesivas estrategias terapéuticas³⁶. Los estudios de mutaciones mediante secuenciación en células mielomatosas únicas muestran una media de tres a seis subclones mayoritarios en el momento del diagnóstico del MM³⁴.

El panorama genético complejo del MM ya está presente en las fases tempranas, premalignas de la enfermedad, la GMSI y el MMQ. De hecho, tanto la GMSI como el MMQ reproducen en líneas generales el espectro de alteraciones citogenéticas y de mutaciones del MM sintomático ^{37, 38}. Aunque la GMSI y el MMQ son genéticamente menos complejos que el MM, la heterogeneidad clonal está presente desde los estadios premalignos. Por tanto, parece que la transición de GMSI a MM no se asocia con la aparición de nuevas alteraciones genéticas, sino más bien con una expansión del número de CP clonales genéticamente aberrantes que resulta en un cambio de la estructura clonal inicial ³⁹.

1.2.3 *Microambiente medular*

El microambiente medular está integrado por la matriz extracelular y diferentes tipos celulares como las células hematopoyéticas, células endoteliales, células mesenquimales, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos, entre otros. La interacción entre la CP tumoral y el microambiente de la MO juega un papel fundamental en el desarrollo y progresión del MM.

La comunicación que se establece entre estos componentes es bidireccional, a través de moléculas de adhesión, citocinas (CK) y sus receptores, y los recientemente identificados exosomas. Gracias a esta interacción se produce la activación de rutas de señalización que promueven la proliferación, crecimiento y resistencia a fármacos de las células mielomatosas, así como la angiogénesis, la osteolisis y la anemia características del MM. Sin embargo, esta comunicación también inhibe otros procesos, como la proliferación y diferenciación de las CP normales, lo cual lleva a una disminución de la producción de Igs policlonales, condición que se conoce como inmunoparesia ⁴⁰.

1.2.3.1 *Mecanismos implicados en la inmunoparesia*

Los mecanismos implicados en el desarrollo de la inmunoparesia son complejos y no se conocen en detalle ⁴⁰. El proceso de diferenciación de los linfocitos B hasta CP terminal y el de producción de anticuerpos en respuesta a antígenos están finamente

regulados por el microambiente medular y el sistema inmune. Por ello se han propuesto factores tanto celulares como humorales implicados en este fenómeno (Figura 3).

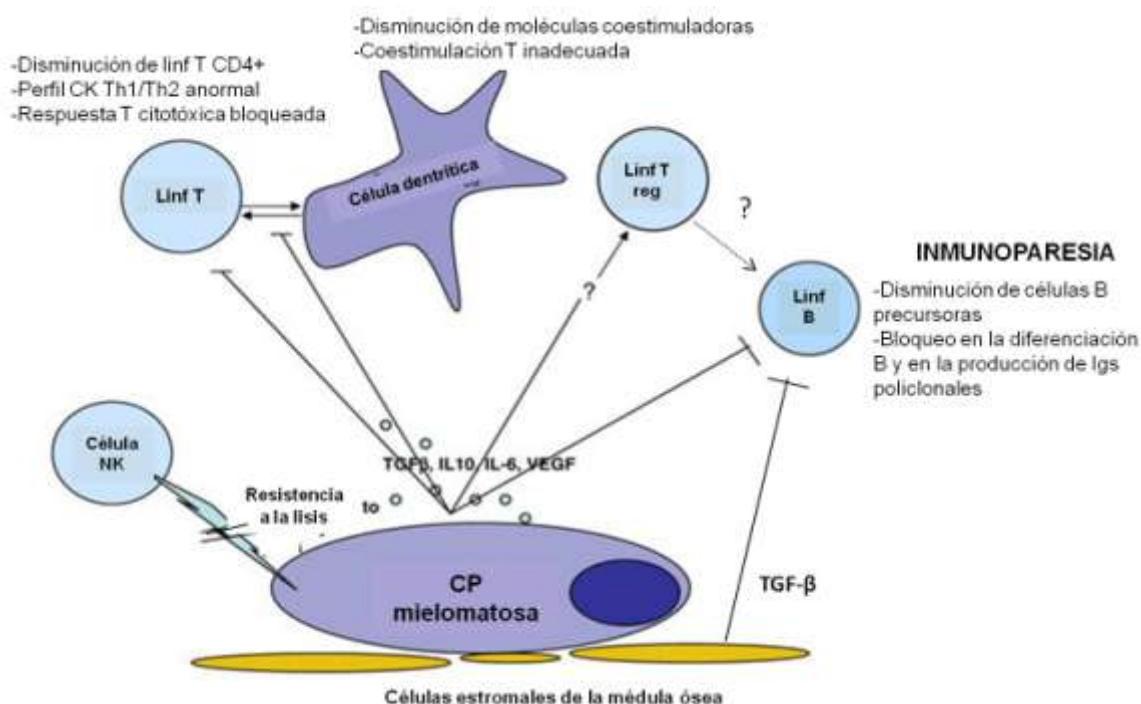


Figura 3. Mecanismos de evasión inmune de la célula mielomatosa. Modificado de Quach et al.⁴¹

(CK: citocinas; Th: linfocito T *helper*; T reg: T regulador; CP: célula plasmática; Linf: linfocito; NK: *natural killer*; TGF- β : factor de crecimiento transformante beta; IL: interleucina; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.)

- Factores dependientes de la célula mielomatosa

Varios estudios han atribuido a la célula mielomatosa el papel de célula supresora. De hecho, como célula tumoral utiliza mecanismos para evadir el sistema inmune⁴². Hay varias explicaciones plausibles acerca del mecanismo por el cual la célula mielomatosa produciría inmunoparesia.

A priori, una disminución de los niveles de Igs policlonales se explicaría por una disminución de las CP normales mediada por una disminución de los progenitores B o un bloqueo en la diferenciación. En ese sentido, se ha demostrado que los pacientes con MM tienen menos linfocitos B CD19+ circulantes que los individuos sanos; y que los precursores B normales estaban disminuidos tanto en SP como en MO en el momento

del diagnóstico y de la recaída, alcanzando unos niveles normales en el momento de la remisión ⁴³. Uno de los mecanismos responsables de que los precursores B estén disminuidos en el MM es la apoptosis de dichos linfocitos, inducida por las células mielomatosas bajo la presencia de células del estroma en la MO ⁴⁴. Así, se han detectado niveles altos de varias CK, como el factor de crecimiento transformante sérico beta 1 (TGF- β 1) que inhibe la proliferación y diferenciación de los linfocitos B ⁴⁵, y es producido tanto por las células mielomatosas como por las células del estroma ⁴⁶. Además se ha demostrado una asociación directa entre los niveles elevados de TGF- β 1 y la presencia de inmunoparesia ⁴⁷.

Por otro lado, la competición que se establece entre la célula mielomatosa y el resto de células del nicho medular, incluidas las CP normales, también explicaría que los estados avanzados de la enfermedad presenten mayor grado de inmunoparesia ⁴⁸.

- Factores dependientes de otras células

También se ha propuesto el papel de otras células del microambiente en el bloqueo de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, a través de la secreción de CK, como los macrófagos ⁴⁹, las células supresoras de origen mieloide ⁵⁰, células dentríticas ⁵¹ y linfocitos T ^{42, 49, 52}. De hecho, se han descrito niveles diferentes de linfocitos T en pacientes con MM respecto a individuos sanos, con una subsiguiente inadecuada producción de CK y probable alteración de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B ⁴². Además, se ha observado que los linfocitos T reguladores (Treg) CD4+ producen TGF- β 1, por lo que los niveles altos de Treg CD4+ podrían jugar también un papel clave en la inmunoparesia.

En resumen, tanto la célula mielomatosa como el microambiente medular desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de inmunoparesia. A través de la secreción de CK, como TGF- β , se produce una disminución de los precursores B y un bloqueo reversible en la diferenciación del linfocito B, que se correlaciona con el estadio de la enfermedad y en definitiva, con menos CP normales e Igs policlonales. Son necesarios estudios que ayuden a diseccionar en profundidad los mecanismos

implicados, pues podrían albergar claves sobre la patogenia del MM e identificación de potenciales dianas terapéuticas.

1.2.3.2 Importancia clínica de la inmunoparesia

La inmunoparesia se detecta en casi el 90% de los pacientes en el momento del diagnóstico^{53, 54}. Sin embargo, no es exclusiva de esta enfermedad y se ha descrito en otras patologías de la célula B como la macroglobulinemia de Waldenström o la leucemia linfática crónica⁴⁰. Esta inmunodeficiencia humoral podría condicionar un mayor riesgo de infecciones bacterianas, aunque este aspecto es controvertido⁴⁰.

La presencia de inmunoparesia permite predecir el riesgo de progresión en diferentes entidades asintomáticas como la GMSI⁵⁵⁻⁵⁷, la GMSI tipo Ig M⁵⁸ y el MMQ^{14, 55}. Además, varios estudios han demostrado su valor pronóstico en el MM, ya que se asocia con características agresivas de la enfermedad y condiciona una menor tasa de respuestas y acortamiento de la supervivencia⁵³. La repercusión clínica de la inmunoparesia también se ha observado en la amiloidosis AL⁵⁹⁻⁶¹.

1.3 Inmunoglobulinas: caracterización y estudio

La célula mielomatosa se trata de una célula B diferenciada y especializada en la producción de anticuerpos o Igs, que pueden ser detectados en sangre y/u orina. A continuación se detallará la estructura de las Igs con el fin de mejorar la comprensión de las pruebas realizadas en la evaluación del MM y el contenido de los trabajos incluidos en la presente tesis doctoral.

Las Igs son heterodímeros formados por 2 cadenas ligeras idénticas (IgL) y otras 2 pesadas (IgH) de mayor peso molecular y unidas entre sí por puentes disulfuro, (Figura 4). Desde el punto de vista funcional, ambas cadenas polipeptídicas están formadas por dos regiones distintas, una variable en el extremo aminoterminal que se corresponde con la zona de unión con el antígeno (Fab), y otra constante en el carboxiterminal (Fc), con función efectora como la activación del complemento y unión a receptores Fc. Hay 5 tipos de Igs: G, A, D, E y M, que se diferencian por su tamaño, carga, composición de

aminoácidos y contenido de carbohidratos. El subtipo de Ig se define por la región constante de la cadena pesada: G1, G2, G3, G4, A1, A2, M, D y E. Las regiones constantes de las cadenas ligeras también presentan pequeñas variaciones que distinguen los dos tipos de cadenas: kappa (κ) y lambda (λ)⁶².

Cada CP produce uno de los cinco tipos de cadena pesada y uno de los dos tipos de cadena ligera. Estas cadenas pesadas y ligeras se sintetizan en el interior de la CP y posteriormente se ensamblan y se secretan en forma de la llamada Ig intacta. Existe el doble de CP normales productoras de κ que de λ .

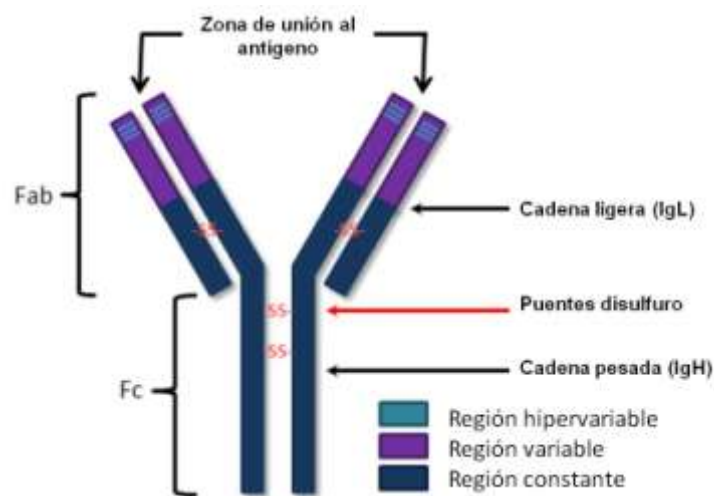


Figura 4. Estructura de una molécula de inmunoglobulina IgG. Modificado de: <http://myplace.frontier.com/~dffix/medmicro/igs.htm>

De acuerdo a las recomendaciones del IMWG^{63, 64}, el estudio de las Igs en suero y en orina debe ser incluido en la evaluación inicial de una gammopatía monoclonal.

1.3.1 Estudio de las inmunoglobulinas en el suero

- Electroforesis en agarosa o acetato de celulosa: permite la separación de las proteínas según su carga en cinco fracciones: albúmina, alfa 1, alfa 2, beta y gamma, que se representan en el proteinograma o trazado electroforético. La Ig monoclonal, CM o paraproteína producida por las células mielomatosas se observa como un pico habitualmente en la zona de las Igs (Figura 5). La electroforesis se puede realizar tanto en muestra de suero como en orina. La detección de cadenas ligeras y CM tipo Ig D

Introducción

requiere una técnica más sensible, como la electroforesis en gel de agarosa de alta resolución. En los últimos años, se ha incorporado en los laboratorios de diagnóstico clínico la electroforesis capilar que es más rápida y proporciona una elevada resolución, pues no necesita tinte a diferencia de la electroforesis convencional ⁶⁵.

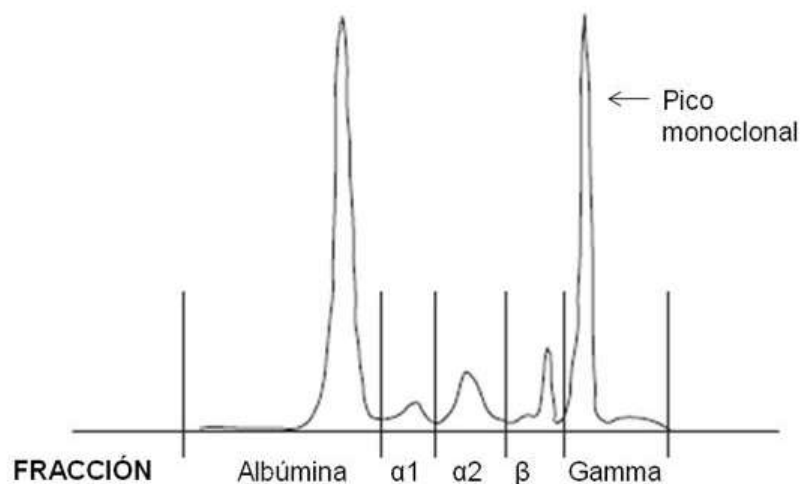


Figura 5. Proteinograma sérico en el mieloma múltiple. Modificado de Cidoncha et al. Med Integr 2001;38:127-32.

- Inmunofijación (IF): es una técnica empleada para la identificación del isotipo de la cadena ligera y pesada tanto en suero como en orina. Las proteínas también son separadas mediante su carga eléctrica, con la particularidad de que se enfrentan a antisueros mono-específicos frente a las distintas cadenas pesadas y ligeras de las Igs, y así se identifica el isotipo concreto. La inmunosustracción también permite identificar el isotipo del CM con gran exactitud, pero la IF es más sensible y, por ello, se utiliza para detectar el CM residual tras el tratamiento ⁶⁶.

Mediante la electroforesis se identifica un pico monoclonal en el 80% de los pacientes en el momento del diagnóstico, mientras que por IF se detecta en un 90% ¹⁶. El isotipo es IgG en el 60% de los casos, IgA en el 25-30%, e IgD en el 2%. Los mielomas IgE e IgM son excepcionales. El restante 10-15% sólo produce cadena ligera que habitualmente se excreta en orina y, por ello, se les denomina MM de cadenas ligeras o MM Bence Jones.

- Nefelometría: permite la detección, identificación y cuantificación no solo de proteínas monoclonales sino también de Ig policlonales y de la beta 2-microglobulina (β 2M). Los niveles de IgG, IgA, IgM se estiman utilizando anticuerpos (Ac) específicos frente a estas Igs, y el nefelómetro mide la desviación de la luz producida por la interacción entre el Ac y la Ig. Es la técnica de elección para la evaluación de la inmunoparesia.

- Detección de cadenas ligeras libres en suero (sFLC): se realiza mediante la utilización de Ac policlonales que reaccionan solo con los epítomos de la cadena ligera que están escondidos cuando esta cadena está unida a la pesada, de tal forma que cuando la cadena ligera está libre deja expuesto su sitio de unión a la cadena pesada, permitiendo entonces la unión de dichos Ac. La cuantificación tanto de cadena ligera libre κ como de λ se puede realizar mediante nefelometría o turbidimetría. Aunque son técnicas cuantitativas y presentan una gran sensibilidad, entre sus limitaciones destacan la variabilidad lote a lote y la necesidad de realizar diluciones manuales cuando hay una alta concentración de antígenos, para evitar falsos negativos ⁶⁷. Actualmente, la cuantificación de sFLC está indicada en la evaluación inicial de la GMSI y el MMQ, en el diagnóstico y seguimiento de la amiloidosis AL y el MM oligosecretor, y en los pacientes con MM que han alcanzado respuesta completa con inmunofijación negativa para definir la remisión completa estricta (RCe).

1.3.2 Estudio de la proteinuria de Bence Jones

La electroforesis en la orina sigue siendo necesaria para cuantificar el CM en orina y, por otro lado, para la identificación de la albuminuria y el despistaje de otras entidades con afectación renal como la amiloidosis.

La cadena ligera de las Igs tiene un tamaño molecular que le permite atravesar la membrana del glomérulo renal. Si la filtración renal de cadenas ligeras es muy abundante, se supera la capacidad de reabsorción y catabolismo de los túbulos renales, lo que motiva que las cadenas ligeras aparezcan en la orina. La presencia de la cadena

Introducción

ligera monoclonal de las Igs en la orina se denomina proteinuria de Bence Jones (BJ). Se estima que el 70-80% de los MM presentan proteinuria de BJ al diagnóstico ^{68, 69}, aunque también se puede detectar en pacientes con gammopatías monoclonales asintomáticas, como la GMSI o el MMQ ⁶⁹⁻⁷¹. En varios estudios se ha demostrado que la cantidad de proteinuria de BJ se correlaciona con la carga tumoral de pacientes con MM sintomático ^{72, 73}.

La evaluación de la proteinuria de BJ requiere la recogida de la orina de 24 horas para determinar la cantidad diaria excretada de proteína ⁷⁴. Después, la orina debe ser concentrada 200 veces y posteriormente se aplica la técnica de electroforesis e identificación del pico monoclonal (Figura 6) ⁶⁸. La determinación del tipo de cadena ligera monoclonal se lleva a cabo con Acs frente a κ y λ en orina concentrada. En caso de cantidades pequeñas de proteinuria es necesario realizar la IF ⁷⁵.

No todos los pacientes con proteinuria de BJ presentan daño renal. Algunos estudios en modelos animales han demostrado que la precipitación y formación de cristales depende más del punto isoeléctrico de la proteína de BJ que de la cantidad de proteína filtrada, de forma que en función de las propiedades físico-químicas del medio se puede producir o no la precipitación de la cadena ligera y, por tanto, el daño tubular renal ⁷⁶⁻⁷⁹.

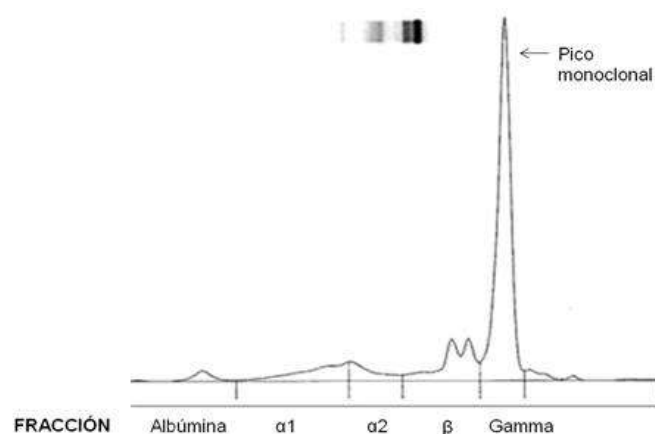


Figura 6. Proteinograma en orina: proteinuria de Bence Jones. Modificado de Cidoncha et al. Med Integr 2001;38:127-32.

1.4 Caracterización inmunofenotípica y genética de la célula mielomatosa

1.4.1 Estudio de médula ósea

El diagnóstico de MM requiere la realización de un aspirado de MO para demostrar mediante microscopía óptica la presencia de al menos 10% de CP. Dado que la infiltración de la MO puede ser parcheada y focal, si no se confirma esta infiltración y la sospecha de MM es alta se debe repetir el estudio. Además hay que confirmar el origen clonal de las CP, bien por inmunofenotipo, bien por inmunohistoquímica.

1.4.1.1 Estudio del inmunofenotipo

La citometría de flujo (CMF) permite identificar el inmunofenotipo de las células mielomatosas y diferenciarlo de las CP normales. En un primer paso se identifica el compartimento de las CPs en la MO por la sobreexpresión de CD38 y CD138; y a continuación se diferencia la CP normal de la célula mielomatosa o con fenotipo aberrante, por la sobreexpresión de CD56, ausencia de CD19 y/o CD45, y la expresión disminuida de CD38 características de la célula mielomatosa (Figura 7).

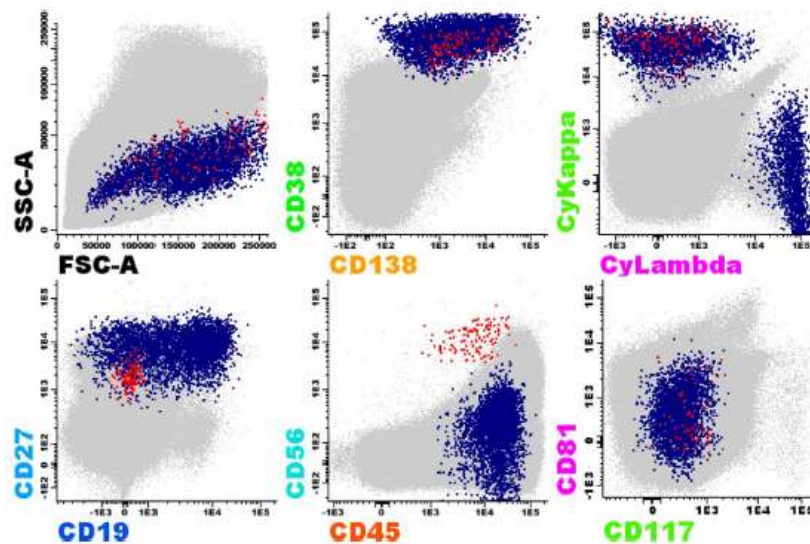


Figura 7. Diagrama de puntos con CP normales (azul) y CP clonales (rojo) sobre la celularidad total de la médula ósea (gris). Modificado de Flores-Montero et al. ⁸⁰

1.4.1.2 Estudio citogenético

El estudio citogenético del MM es fundamental para la estratificación pronóstica del MM. Si bien el cariotipo convencional proporciona información acerca de la ploidía y detecta cariotipos complejos, tiene importantes limitaciones que están haciendo que su utilización en la práctica clínica sea cada vez más escasa.

La HISF presenta la ventaja de que no se requieren mitosis de la célula mielomatosa para el análisis. Permite visualizar determinados fragmentos de ADN mediante su hibridación con sondas marcadas con fluorocromos y el posterior análisis en el microscopio de fluorescencia. La mayor limitación de la técnica es que se estudian regiones concretas para las que está diseñada la sonda y no abarca el genoma completo.

De acuerdo tanto a las recomendaciones del IMWG de 2009 ⁸¹, como a las de la *European Myeloma Network* (EMN) propuestas en 2012 ⁸², la HISF debe realizarse en los pacientes con MM de nuevo diagnóstico, y en la recaída en todos aquellos que tuvieran un estudio normal al diagnóstico o que no se estudiaron en dicho momento.

Antes de realizar la HISF se requiere la purificación de las células plasmáticas, habitualmente mediante el anticuerpo CD138. En todos los pacientes, el estudio de HISF debe incluir sondas para detectar la t(4;14) y la delección de 17p. No obstante, el panel de sondas debería ampliarse con el fin de analizar también la t(11;14), t(14;16), ganancias 1q y pérdidas de 1p en los pacientes candidatos a trasplante autólogo y a ensayos clínicos.

2. Mieloma asintomático

2.1 Riesgo de progresión a MM

El riesgo anual de progresión de mieloma asintomático (MMQ) a MM no se mantiene a lo largo del tiempo (Figura 8). En los primeros 5 años desde el diagnóstico es 10% al año, en los siguientes 5 años es 3% al año y tras 10 años desde el diagnóstico es 1% al año, equiparable al riesgo de la GMSI¹⁵. Por ello, es importante identificar aquellos pacientes que progresarán en los primeros 5 años y necesitarán, por tanto, un seguimiento periódico más estrecho.

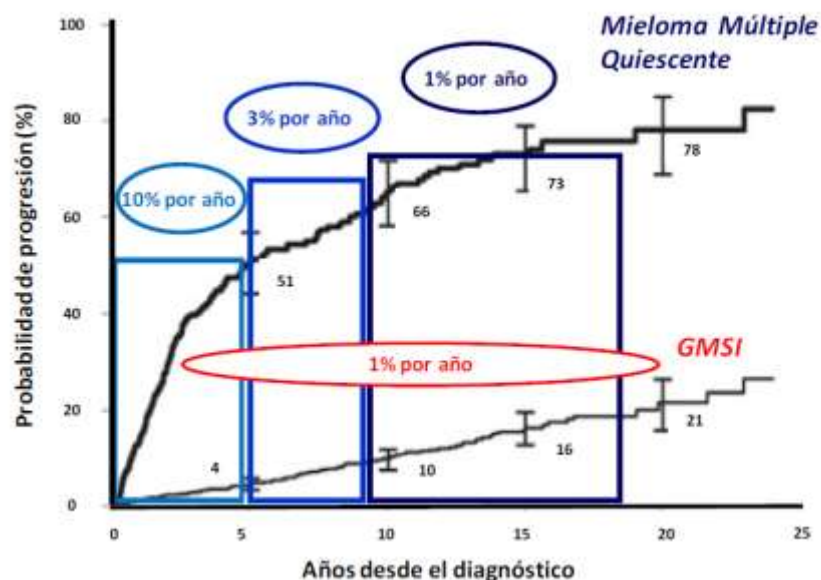


Figura 8. Riesgo de progresión de la GMSI y el MMQ a MM. Modificado de Kyle et al¹⁴.

2.2 Factores pronósticos

Destacados grupos de investigación han trabajado en la búsqueda de marcadores en el momento del diagnóstico del MMQ que permitan predecir el riesgo de progresión a MM. Los marcadores pronósticos que resultan de mayor interés son aquellos que permiten identificar pacientes con MMQ con una probabilidad de progresión a 2 años del diagnóstico del 50%, es decir MMQ de alto riesgo (Tabla 3), y los que identifican MMQ con una probabilidad de progresión superior al 80% a los 2 años del diagnóstico, los MMQ de muy alto riesgo. Entre los factores pronósticos publicados hasta la fecha

destaca un grupo relacionado con la masa tumoral, otro relacionado con el comportamiento del MMQ a lo largo del tiempo, así como marcadores de imagen y citogenéticos.

Tabla 3. Marcadores pronóstico para identificar MMQ de alto riesgo

Masa tumoral
<ul style="list-style-type: none"> - CP clonales en MO $\geq 10\%$ + CMs ≥ 3 g / dL - CP clonales en MO $\geq 10\%$ + CMs ≥ 3 g / dL + ratio sFLC anormal - $\geq 95\%$ de células plasmáticas aberrantes por CMF + inmunoparesia - CP circulantes de sangre periférica $> 5 \times 10^6$ / L
Patrón de la evolución del CM sérico y de la hemoglobina
<ul style="list-style-type: none"> - Tipo <i>evolving</i>: <ul style="list-style-type: none"> • Si CMs ≥ 3 g / dL al diagnóstico: aumento $\geq 10\%$ en los primeros 6 meses. • Si CMs < 3 g/dL al diagnóstico: aumento anual durante 3 años. - Incremento del CMs hasta ≥ 3 g/dL durante los 3 meses desde la determinación previa. - Disminución de la hemoglobina en $\geq 0,5$ g / dL en los primeros 12 meses desde el diagnóstico.
Marcadores de imagen
<ul style="list-style-type: none"> - RM: La enfermedad radiológica progresiva se define como la aparición de una nueva lesión focal o el aumento del diámetro de la lesión focal existente, y la aparición de infiltración difusa nueva o progresiva. - PET/TC positivo sin lesión osteolítica subyacente.
Alteraciones genéticas presentes en la célula mielomatosa
<ul style="list-style-type: none"> - t(4;14) - del(17p)

- Cantidad de CP en médula ósea y componente monoclonal sérico

El grupo de la Clínica Mayo publicó en 2007 uno de los estudios más relevantes realizados hasta la fecha sobre identificación de factores pronósticos en una serie de 276 pacientes diagnosticados de MMQ, con una mediana de seguimiento superior a 10 años ¹⁵. En dicho estudio demostraron que la presencia de una infiltración en MO por el 10% o más de CP junto con un CMs ≥ 3 g/dL en el momento del diagnóstico eran factores pronóstico independientes que predecían mayor riesgo de progresión a MM, con una mediana de tiempo hasta la progresión (TTP) de 2 años.

- Ratio de sFLC

El mismo grupo también evaluó el papel de las sFLC en la serie de pacientes mencionada. Una ratio anormal ($< 0,125$ o > 8) entre las cadena ligera implicada y la no implicada se asoció de forma independiente con un mayor riesgo de progresión a MM⁸³. Además, la ratio de sFLC ≥ 100 identificó pacientes con un riesgo muy alto de progresión ($> 80\%$ a 2 años), por lo que actualmente es considerado un nuevo criterio diagnóstico de MM^{22, 23, 84}. Sin embargo, este marcador no ha sido validado por otros grupos como el danés¹⁴.

- Inmunofenotipo de la célula plasmática clonal e inmunoparesia.

El grupo español de mieloma (GEM) evaluó en una serie de 93 pacientes el valor pronóstico del perfil inmunofenotípico de la CP al diagnóstico del MMQ⁵⁵. Se realizó un análisis mediante citometría de flujo (CMF) multiparamétrica que permitió discriminar las CP con inmunofenotipo normal (CPn) de las células mielomatosas o con fenotipo aberrante (CPa) dentro de la MO. Se demostró que una proporción de CPa $\geq 95\%$ dentro del compartimento de CP de la MO se asociaba de forma independiente con un mayor riesgo de progresión a MM. Asimismo, la presencia de inmunoparesia al diagnóstico de MMQ también se identificó como un biomarcador asociado a un TTP inferior en el análisis multivariante.

La presencia de $\geq 95\%$ CPa ha sido validada por otros grupos como marcador pronóstico⁸⁵. Próximamente, el análisis automatizado simplificará la diferenciación de la CPa de la CPn, por lo que podría ser factible su aplicación de forma generalizada.

La inmunoparesia como marcador pronóstico en el MMQ también ha sido validado por el grupo danés, demostrando que los pacientes con CMs ≥ 3 g/dL e inmunoparesia tienen un riesgo de progresión tres veces superior a aquellos pacientes con MMQ sin ninguna de estas características¹⁴.

- Cantidad de CPa circulantes en sangre periférica

El grupo de la Clínica Mayo también analizó el impacto pronóstico de la presencia de CPa circulantes, detectadas por inmunofluorescencia, en una serie de 91 pacientes

Introducción

con MMQ ⁸⁶. Demostraron que la presencia de $> 5 \times 10^6/L$ CPa se asociaba con un riesgo de progresión a 2 años significativamente mayor que niveles por debajo de $5 \times 10^6/L$ de CPa (71% vs. 24%). Este mismo grupo ha demostrado que la detección de ≥ 150 CPa circulantes (sobre un total de 150.000 eventos) mediante CMF es un factor pronóstico independiente que predice un TTP de tan solo 9 meses y un riesgo de progresión a 2 años del 78% ⁸⁷. Si estos resultados fuesen validados en un estudio independiente, podrían constituir en un futuro un nuevo criterio de MM, ya que identifica pacientes con un riesgo de progresión muy alto.

- Comportamiento del componente monoclonal sérico y de la hemoglobina

El grupo de Barcelona publicó en 2003 el primer estudio que demostró el papel pronóstico de la evolución del CM durante el seguimiento de los pacientes con MMQ. Se identificaron dos grupos, los MMQ *evolving*, que presentaron un incremento progresivo del CMs y una mediana de TTP inferior que los *non-evolving*, en los que el CMs permanecía estable a lo largo del tiempo (Tabla 3) ⁸⁸. Recientemente se han presentado datos actualizados sobre este estudio en una serie más amplia de pacientes y se han confirmado los hallazgos previos ⁸⁹. El 25% de los MMQ presentó un patrón *evolving*, con un riesgo de progresión a 2 años del 45% y una mediana de TTP significativamente inferior a la de los pacientes con un patrón *non-evolving* (3 vs. 19 años, respectivamente).

El grupo de la Clínica Mayo ha validado recientemente el patrón *evolving* del CM como factor predictor de progresión en casi 200 pacientes con MMQ ⁹⁰. Además, han observado que la evolución de la hemoglobina (Hb) también tiene impacto pronóstico, puesto que el patrón *evolving* de la Hb (descenso de 0,5 g/dL en el primer año) se asoció de forma independiente con un riesgo mayor de progresión a MM.

- Marcadores de imagen

La incorporación de las pruebas de imagen en la evaluación del MMQ ha contribuido a mejorar la estimación del riesgo de progresión. La presencia de lesiones focales o difusas a nivel óseo detectadas por RM al diagnóstico del MMQ se asocia con

un mayor riesgo de progresión a MM ²⁴. De hecho, la presencia de al menos dos lesiones focales detectadas por RM se relaciona con un riesgo de progresión superior al 80% a los 2 años y, por ello, se considera un MDE según los criterios diagnósticos de MM de 2014 (Tabla 2) ^{18, 24, 25}.

El grupo de Heidelberg también evaluó retrospectivamente el papel de la RM de cuerpo entero durante el seguimiento de 63 pacientes con MMQ. La detección de enfermedad radiológica progresiva definida como la aparición de lesiones focales nuevas, infiltración difusa o el incremento de las lesiones preexistentes se asoció de forma independiente con un mayor riesgo de progresión a MM ⁸⁵.

El papel pronóstico de la PET/TC también ha sido evaluado en pacientes con MMQ de nuevo diagnóstico en dos estudios independientes. Tanto el grupo italiano como el de la Clínica Mayo han demostrado que los pacientes con áreas hipercaptantes en la PET/TC, sin lesiones osteolíticas subyacentes, tienen un riesgo de progresión significativamente mayor que aquellos con PET/TC negativa: 50% vs. 30% de probabilidad de progresión a los 2 años, respectivamente ^{91, 92}.

- Alteraciones genéticas presentes en la célula mielomatosa

Determinadas alteraciones citogenéticas analizadas mediante HISF también han identificado pacientes con MMQ que tienen mayor riesgo de transformación. Así la t(4;14) o la del(17p) podrían considerarse de alto riesgo, puesto que se asociaron con una mediana de TTP de 24 meses en una serie de 351 pacientes con MMQ de la Clínica Mayo ⁹³. Estos hallazgos se han confirmado en una serie independiente en la que además la ganancia de 1q21 y la hiperdiploidía también se asociaban de forma independiente a un mayor riesgo de progresión a MM, con una mediana de TTP de casi 4 años en ambos casos ⁹⁴.

El grupo de Arkansas confirmó el valor de la firma de expresión génica de 70 genes (GEP70) a la hora de predecir el riesgo de progresión a MM en 331 pacientes con MMQ incluidos en el ensayo clínico S0120 ⁹⁵. Además, han propuesto un nuevo modelo basado en una firma de expresión génica de cuatro genes relacionados con el

control del ciclo celular (*RRM2*, *DTL*, *TMEM48* y *ASPM*) que permitiría identificar pacientes con MMQ que tienen un riesgo de progresión a 2 años superior al 80% ⁹⁶.

2.3 Modelos de estratificación pronóstica

Actualmente se dispone de varios modelos de estratificación pronóstica propuestos por diferentes grupos que incluyen marcadores con valor pronóstico independiente. Estos modelos permiten predecir con mayor precisión el riesgo de progresión a MM, informar mejor al paciente, y establecer estrategias de seguimiento adaptadas al riesgo ^{97, 98}.

Los modelos de la Clínica Mayo y del GEM son los únicos validados en el contexto de un ensayo clínico ^{99, 100} (Tabla 4). El modelo de la Clínica Mayo permite diferenciar tres grupos de MMQ con distinto riesgo de progresión a MM en función de la cuantía del CM y de la infiltración por CP de la MO (Tabla 4). El grupo de alto riesgo se define por la presencia de CMs ≥ 3 g/dL y $\geq 10\%$ de CP en MO, con una mediana de TTP de 2 años.

El modelo propuesto por el GEM también identifica tres grupos, de acuerdo a la proporción de CPa y la presencia de inmunoparesia. En los pacientes con $\geq 95\%$ CPa/CP MO e inmunoparesia, se estimó una mediana de TTP de 2 años, similar al grupo de alto riesgo identificado con el modelo propuesto por la Clínica Mayo (Tabla 4).

Tabla 4. Modelos de estratificación pronóstica en MMQ validados en estudios prospectivos

Modelo de riesgo	Grupo de riesgo	Mediana de TTP (años)
Clínica Mayo		
CMs \geq 3 g/dL y CP MO \geq 10%	Alto	2
CMs $<$ 3 g/dL y CP MO \geq 10%	Intermedio	8
CMs \geq 3 g/dL y CP MO $<$ 10%	Bajo	19
Grupo Español de Mieloma (GEM)		
\geq 95% CPa e inmunoparesia	Alto	1,9
\geq 95% CPa o inmunoparesia	Intermedio	6
Ninguno	Bajo	No alcanzada

Se han propuesto nuevos modelos de estratificación del riesgo que incorporan tanto características clínicas como biológicas ^{14, 83, 90, 94, 95, 101}.

La incorporación de la ratio anormal de sFLC al modelo de la Clínica Mayo descrito anteriormente permite identificar pacientes con MMQ de alto riesgo con una mediana de TTP de 1,9 años ⁸³. Recientemente el mismo grupo ha publicado un nuevo modelo de riesgo que identifica pacientes con MMQ con diferentes medianas de TTP de acuerdo a la presencia de CMs *evolving*, Hb *evolving* y $>$ 20% de infiltración por CP en la MO ⁹⁰. El grupo de Barcelona también ha propuesto un modelo de estratificación pronóstica basado en el comportamiento *evolving*, en el cual la presencia de un patrón *evolving*, \geq 20% de CP en MO e inmunoparesia, identifica un subgrupo de MMQ con un riesgo muy alto de progresión (82% a 2 años) ⁸⁹. El modelo del grupo danés también

incluyó la inmunoparesia y el CMs ≥ 3 g/dL para identificar tres grupos de riesgo ¹⁴. Finalmente, dos grupos han integrado marcadores genéticos en sus modelos: el de Heidelberg incluye la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo ⁹⁴ y el SWOG añade el GEP a variables ya conocidas ⁹⁵.

En el momento actual está en marcha un estudio internacional que pretende diseñar un modelo que integre todos los marcadores pronóstico identificados con el fin de mejorar y facilitar la evaluación pronóstica de los pacientes con MMQ.

2.4 Manejo clínico

En la actualidad, los pacientes con MMQ no reciben ningún tratamiento y únicamente se lleva a cabo un seguimiento hasta la progresión a MM (aparición de sintomatología CRAB).

Las estrategias de seguimiento recomendadas para el MMQ se establecen de acuerdo al riesgo de progresión a MM estimado mediante los modelos de estratificación pronóstica previamente detallados de la Clínica Mayo y el GEM:

- Riesgo bajo: se recomienda un seguimiento anual.
- Riesgo intermedio: se recomienda un seguimiento inicial cada 4-6 meses para descartar un comportamiento *evolving* y posteriormente cada 6 meses. Si tras varios años se observase estabilización del CMs se podría pasar a un control anual.
- Riesgo alto: se debe realizar un seguimiento estrecho cada 2-3 meses.

Actualmente se está investigando el beneficio del tratamiento precoz de los pacientes con MMQ de alto riesgo y el esquema óptimo de tratamiento. A ello ha contribuido la existencia de una estratificación pronóstica más precisa, la disponibilidad de tratamientos efectivos con un perfil de toxicidad aceptable y fundamentalmente, los resultados del primer estudio prospectivo donde se demostró el beneficio clínico del tratamiento precoz de los pacientes con MMQ de alto riesgo llevado a cabo por el GEM

Dicho estudio fue un ensayo clínico fase 3 que incluyó 119 pacientes con MMQ de alto riesgo que se aleatorizaron a recibir lenalidomida y dexametasona seguido de lenalidomida de mantenimiento en el grupo experimental, frente a la abstención en el grupo de control. Tras un período de seguimiento de 40 meses, la mediana de TTP en el grupo experimental fue significativamente más prolongada que en el de observación (no alcanzada vs. 21 meses). Los resultados han sido recientemente actualizados, con una mediana de seguimiento de 75 meses, y han confirmado que el beneficio se mantiene en el grupo que recibió lenalidomida ⁹⁹.

Actualmente se están llevando a cabo varios ensayos clínicos que están evaluando el papel de nuevos fármacos, como el carfilzomib o el ixazomib, y anticuerpos monoclonales anti-CD38 como el daratumumab ^{102, 103}. Los resultados de dichos estudios podrían confirmar definitivamente el beneficio del tratamiento precoz en los pacientes con MMQ de alto riesgo e incluso la posibilidad de curación y, por tanto, el cambio de paradigma en el tratamiento del MMQ ¹⁰³.

3. Mieloma múltiple

3.1 Tratamiento

El tratamiento del MM ha evolucionado significativamente en la última década gracias a la introducción de nuevos fármacos, como los inhibidores de proteasoma (IP) y los inmunomoduladores (IMiDs), en los esquemas de tratamiento tanto en el diagnóstico como en la recaída. Esto ha llevado a una mejora de la supervivencia de los pacientes con MM, con una mediana de 6 años para los pacientes mayores de 65 años, no candidatos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH), y de hasta 10 años en pacientes candidatos a TAPH ^{104, 105}.

Actualmente es una enfermedad incurable, aunque los recientes avances en el conocimiento de la biología de la enfermedad, las actualizaciones en la definición de la

enfermedad que permiten tratar pacientes de forma precoz, y el desarrollo de nuevos fármacos permiten vislumbrar la curación para algún subgrupo de pacientes con MM. De hecho, en los últimos cinco años se han aprobado seis fármacos para pacientes en recaída: IMiDs de tercera generación como la pomalidomida, IP de segunda generación como el carfilzomib y el ixazomib, anticuerpos monoclonales dirigidos contra la CP como el elotuzumab y el daratumumab, y el panobinostat, un inhibidor de la enzima histona deacetilasa. Debido a la disponibilidad de varias familias de nuevos fármacos que admiten combinaciones entre sí y con los fármacos convencionales como los alquilantes y esteroides, la elección de la estrategia óptima de tratamiento representa actualmente un reto en la práctica clínica ¹⁰⁶.

El esquema de tratamiento en pacientes con MM de nuevo diagnóstico se decide en función de la edad, comorbilidades y ECOG. Los pacientes con edad igual o inferior a 65 años son candidatos a TAPH, siempre que no presenten comorbilidades asociadas (ECOG \geq 3, patología cardíaca, respiratoria, etc.). En general, los pacientes con edad superior a 65 años no son considerados candidatos a TAPH, aunque en pacientes entre 66 y 70 años, con buen estado general y sin comorbilidades, se podría recomendar, puesto que alarga la supervivencia sin incrementar la mortalidad asociada al procedimiento ¹⁰⁷⁻¹¹¹.

3.1.1 Tratamiento del paciente candidato a trasplante autólogo

Los pacientes candidatos a TAPH reciben en primer lugar un tratamiento de inducción cuyo objetivo es alcanzar la mejor respuesta posible. Durante esta fase se extraen mediante aféresis las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) autólogas y se criopreservan hasta el momento de la infusión. Si la respuesta alcanzada tras cuatro o seis ciclos de inducción es adecuada, se procede a la realización del TAPH. Este procedimiento consiste en la administración de altas dosis de quimioterapia alquilante, habitualmente melfalán, con una infusión posterior de las CPH autólogas (Figura 9) ¹¹². ¹¹³. La recuperación de las tres series hematopoyéticas se produce generalmente a

partir del día +10 desde la infusión del producto que contiene las células mononucleadas y CD34+. Generalmente, se requiere una dosis mínima de 2×10^6 / Kg de CD34+ infundidas para asegurar el injerto ¹¹². La dinámica de la recuperación de las distintas poblaciones linfocitarias tanto en médula ósea como en sangre periférica tras el TAPH comenzó a estudiarse en los años 90 gracias a la disponibilidad de la CMF ¹¹⁴⁻¹¹⁸. En las primeras dos semanas tras el TAPH se produce una expansión tanto de linfocitos T CD8+ como de NK, lo cual permite una recuperación rápida de estas poblaciones, alcanzando niveles similares a los de individuos sanos al mes del TAPH ¹¹⁴. En ese mismo período se produce una disminución transitoria de linfocitos T reguladores (Treg). Sin embargo, la recuperación de los linfocitos B y de T CD4+ es más tardía, alcanzando niveles normales alrededor del año postrasplante. Esto condiciona un descenso del cociente CD4+/CD8+ durante el primer año del TAPH y una mayor susceptibilidad a infecciones ^{114, 115, 119}.

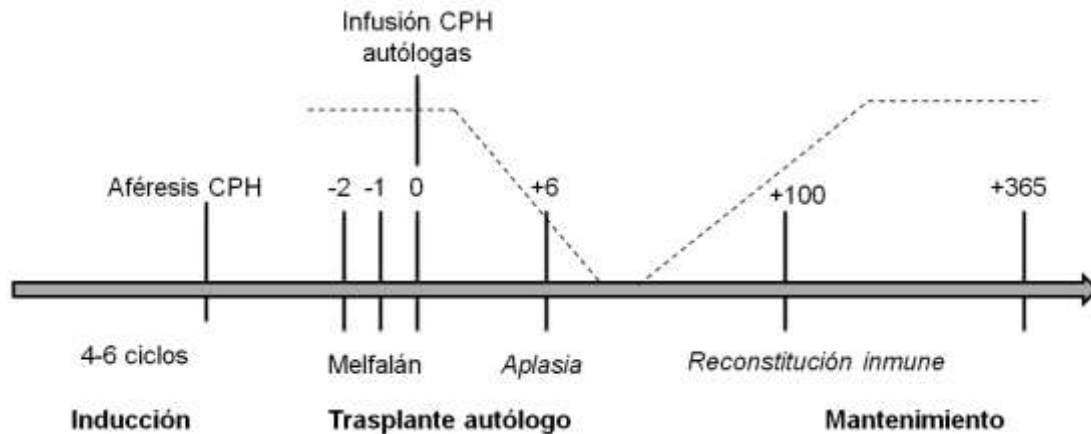


Figura 9. Esquema de tratamiento de los pacientes jóvenes con MM. En línea discontinua se representa el período de aplasia con la posterior recuperación de la hematopoyesis

El objetivo del TAPH es consolidar la respuesta alcanzada durante la inducción, pues permite administrar una quimioterapia mieloablativa que potencialmente elimina las

Introducción

células residuales del mieloma, acortando el período de aplasia y disminuyendo así los riesgos asociados (infecciones, hemorragias...).

El TAPH se introdujo en los esquemas de tratamiento del paciente joven con MM hace más de dos décadas. Existen cinco estudios aleatorizados publicados que comparan el TAPH frente a la quimioterapia convencional ¹²⁰⁻¹²⁴. Únicamente en dos de ellos el TAPH fue superior a la quimioterapia en términos de respuesta, supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) ^{120, 121}. Por el contrario, en los otros tres estudios, incluido el realizado por el Grupo Español de Mieloma (GEM), el TAPH no fue superior a la quimioterapia convencional en términos de supervivencia; no obstante, la tasa de respuestas completas (RC) fue significativamente superior en la rama de TAPH respecto a la poliquimioterapia (30% vs. 11%, P=0,002), con una mediana de SLP de 42 meses y de SG de 61 meses ¹²².

Los esquemas de inducción actuales basados en la combinación de IP con corticoides e IMiDs han permitido mejorar la calidad de la respuesta en la mayoría de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico, así como la tolerancia en comparación con los esquemas de poliquimioterapia convencional. En este contexto, se ha generado un debate sobre el beneficio e indicación del TAPH. Según los resultados de cuatro estudios prospectivos fase 3 que compararon esquemas de tratamiento con o sin TAPH (Tabla 5), los pacientes que reciben IMiDs o IP en la inducción se siguen beneficiando de las altas dosis de quimioterapia y TAPH, obteniendo una mejor tasa de respuestas y, una SLP más prolongada, con medianas estimadas de 43 - 50 meses. Aunque solo se han demostrado diferencias en la SG en dos de los cuatro estudios, con estos esquemas de inducción, TAPH y consolidación/mantenimiento se han logrado medianas de SG de hasta 80 meses ¹²⁵⁻¹²⁸, posicionando al TAPH como un eslabón clave de la estrategia de tratamiento de los pacientes jóvenes con MM.

Tabla 5. Ensayos clínicos fase 3 con trasplante autólogo en MM

Estudio	Esquema de tratamiento	≥ MBRP (%)	Mediana SLP (meses)	SG a 4 años (%)
		TAPH / No TAPH	TAPH / No TAPH	TAPH / NoTAPH
GIMEMA Palumbo et al. NEJM 2016.	Rd x4 Tandem TAPH vs. MPR x6 R vs. no R	59 vs. 63	43 vs. 22 *	81 vs. 65 *
Multicéntrico Gay et al. Lancet Oncol 2015.	Rd x4 1 o 2 TAPH vs. CRD x6 R vs. R-prd	54 vs. 50	43 vs. 29 *	77 vs. 68 *
IFM Attal et al. NEJM 2017.	VRD x3 TAPH-VRDx2 vs. VRDx5 R mantenimiento	88 vs. 78 *	50 vs. 36 *	81 vs. 82
EMN02/HO95 Cavo et al. JCO 2016.	VCDx3-4 TAPH (1 ó 2) vs. VMP	85 vs. 74 *	NA vs. 44 *	No disponible

NA: no alcanzada; V: bortezomib; C: ciclofosfamida; D: dexametasona; M: melfalán; P: prednisona; R: lenalidomida; * diferencias estadísticamente significativas.

Las estrategias de consolidación y mantenimiento tras el TAPH permiten el control de la enfermedad a largo plazo. A pesar de que el papel de la consolidación en el MM aún genera controversia, hay datos que apoyan la eficacia del mismo pues mejora la calidad de la respuesta, incrementando la tasa de *minimal residual disease* (MRD) negativa.

El mantenimiento con nuevos agentes como la lenalidomida ha demostrado ser eficaz y prolongar tanto la SLP como la SG. Según los resultados de un reciente metanálisis que incluyó más de 1.200 pacientes que habían participado en ensayos

clínicos fase 3, el mantenimiento con lenalidomida prolonga la SG más de 2 años ¹²⁹. Estos resultados han llevado a la reciente aprobación de la lenalidomida como tratamiento de mantenimiento tras el TAPH ^{130, 131}. A pesar del efecto inmunomodulador de este fármaco ⁴¹, su efecto sobre la reconstitución inmune tras el TAPH no está claro ^{117, 132}. Daratumumab podría ser próximamente una opción atractiva como tratamiento de mantenimiento, aunque para establecer conclusiones al respecto es necesario esperar a los resultados del ensayo fase 3 del grupo francés que está evaluando la eficacia del mantenimiento con este fármaco.

3.2 Factores pronósticos al diagnóstico

El MM se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica, si bien el curso habitual de la mayoría de los MM pasa por una respuesta inicial al tratamiento seguida de posteriores recaídas cada vez más resistentes a los fármacos. La evaluación pronóstica tiene gran relevancia clínica, pues permite predecir de forma aproximada el riesgo de progresión y supervivencia de los pacientes con MM y, en ocasiones, guiar las decisiones terapéuticas ¹³³.

Por otra parte, la identificación de factores pronósticos permite evaluar cohortes homogéneas de pacientes de acuerdo a la presencia de dichos factores, balanceando así las ramas en estudios de tratamiento experimental. Además, permite profundizar en el conocimiento de la biología de la enfermedad y optimizar la evaluación inicial de los pacientes con MM ¹³⁴.

La evaluación pronóstica de los pacientes con MM candidatos a trasplante se puede realizar en el momento del diagnóstico y tras el TAPH.

3.2.1 Factores pronósticos al diagnóstico en pacientes candidatos a trasplante

Numerosos grupos han trabajado en la identificación de factores pronóstico en el momento del diagnóstico. Algunos se relacionan con el paciente, como el ECOG, la edad, la β 2-microglobulina (β 2M), la albúmina (Alb) o la insuficiencia renal avanzada ¹³⁴.

¹³⁵; mientras que otros están intrínsecamente relacionados con la biología de la enfermedad, como la citogenética, el contenido de ADN y el índice de proliferación de la CP clonal determinados por CMF, la lactatodeshidrogenasa (LDH) y la morfología plasmablástica^{136 137, 138}. El valor de la LDH refleja el recambio celular y se incrementa en formas muy agresivas de la enfermedad. Un valor elevado de β 2M es indicativo de gran carga tumoral, aunque también se puede observar en situación de insuficiencia renal¹³⁴.

La presencia de alteraciones citogenéticas identificadas mediante HISF es uno de los factores pronóstico con mayor impacto en el contexto del TAPH. El IMWG ha establecido que las alteraciones que se asocian con una SG menor de 3 años en los pacientes candidatos a TAPH sean consideradas alteraciones citogenéticas de alto riesgo (AR), correspondiéndose con la t(4;14), la t(14;16) y la del(17p)¹³⁹.

La presencia de la t(4;14) se ha asociado a mal pronóstico en numerosos estudios prospectivos y se considera uno de los factores pronóstico de mayor peso en el contexto del TAPH, con respuestas a la inducción, pero con recaídas precoces¹⁴⁰⁻¹⁴⁶.

La t(14;16) se asocia a mal pronóstico de acuerdo a los resultados de varios estudios. Sin embargo, en un estudio prospectivo del grupo francés no se encontraron diferencias en SG entre los pacientes con la (14;16) y aquellos sin la alteración, si bien es cierto que los pacientes que presentaron la alteración recibieron doble trasplante¹⁴⁷.

La del(17p) también se relaciona con mal pronóstico en el TAPH^{140, 141, 143-145, 148}, y se asocia no solo con una supervivencia más corta, sino con resistencia a la quimioterapia y recaídas con afectación extramedular^{143, 149}.

Varios grupos identificaron hace ya varios años que la del(1p) se asociaba a peor SLP y SG¹⁵⁰⁻¹⁵⁴, al igual que las ganancias de 1q^{145, 155}.

Mediante el análisis del perfil de expresión génica (GEP) también se pueden identificar pacientes con MM de alto riesgo. El grupo de Arkansas identificó un perfil de expresión génica de 17 genes característico en un subgrupo de pacientes con alto riesgo de progresión en el primer año tras el TAPH¹⁵⁶.

En diferentes estudios prospectivos el tratamiento con esquemas que incluían bortezomib logró mejorar la tasa de respuestas, la SLP y la SG de los pacientes con la $t(4;14)$ ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Nuevos fármacos como el carfilzomib o la pomalidomida mejoran las respuestas en los pacientes con alteraciones citogenéticas de AR, sin embargo no logran revertir su mal pronóstico^{160, 161}. Por el momento, la recomendación del IMWG es tratar a los pacientes con MM de AR citogenético con una combinación de IP e IMiDs con dexametasona seguida de TAPH¹³⁹ y, en los casos en los que sea posible, con doble TAPH¹⁶² y mantenimiento con lenalidomida.

3.3 Modelos de estratificación pronóstica

Los modelos de estratificación pronóstica recomendados por el IMWG para ser aplicados en el momento del diagnóstico de MM son el ISS y, recientemente, el R-ISS.

3.3.1 *ISS (International Staging System)*

En 2005, el IMWG publicó un estudio multicéntrico internacional, con más de 10.000 pacientes con MM de nuevo diagnóstico, en el que se identificaron dos marcadores con valor pronóstico independiente, la $\beta 2M$ y la Alb¹⁶³. La integración de estos dos marcadores en un modelo de estratificación pronóstica sencillo y robusto permitió mejorar la estimación de la supervivencia de los pacientes en el momento del diagnóstico¹⁶³ (Tabla 6). Una de las grandes ventajas del ISS es que ha sido ampliamente validado y utilizado por diferentes grupos, tanto en estudios prospectivos aleatorizados, como en la práctica clínica diaria. Sin embargo, es un modelo que se basa en la $\beta 2M$, que no está primariamente relacionada con la biología de la enfermedad, y que se eleva en los pacientes con insuficiencia renal¹³⁴. Además, este estudio multicéntrico incluyó pacientes tratados entre 1980 y 2002, y que, por tanto, no habían recibido IP o IMiDs, de ahí que algunos estudios hayan cuestionado el valor de este modelo para la clasificación pronóstica actual de los pacientes con MM¹⁶⁴.

3.3.2 Combinaciones del ISS con otras variables clínico-biológicas

En 2013, el IMWG llevó a cabo un estudio retrospectivo que incluyó más de 2.500 pacientes con el fin de investigar el impacto pronóstico de la combinación del mencionado ISS con uno de los más importantes factores pronóstico en el MM, las alteraciones citogenéticas de AR, como la t(4;14) y la del(17p) ¹⁶⁵. Los resultados de dicho estudio confirmaron lo que otros grupos habían demostrado previamente, que la combinación de ambas variables mejoraba la estratificación pronóstica de los pacientes (Tabla 6) ^{155,166}. Por otro lado, la coexistencia de 3 alteraciones citogenéticas de AR permite identificar un subgrupo de muy alto riesgo, con una mediana de SG de 9 meses ¹⁵⁵.

Estudios posteriores han ido elaborando modelos estadísticos que añaden, de forma similar a los previos, distintas variables al ISS para mejorar la evaluación pronóstica ¹⁶⁷. En un estudio multicéntrico europeo se evaluó el valor de un modelo para la predicción de recaídas o progresiones precoces (< 2 años desde el diagnóstico) en pacientes con MM sometidos a TAPH y se identificaron 4 grupos con distinta probabilidad de SG a 2 años, siendo del 55 % en el grupo de alto riesgo (Tabla 6) ¹⁶⁸.

3.3.1 R-ISS (Revised-International Staging System)

Finalmente, el IMWG puso en marcha un estudio multicéntrico internacional con el fin de establecer un modelo definitivo que incorporara variables relacionadas con el paciente y con la biología de la enfermedad. El estudio incluyó 3.060 pacientes con MM de nuevo diagnóstico tratados en el contexto de ensayos clínicos con IP o IMIDs, entre 2005 y 2012, incluyendo candidatos y no candidatos a TAPH. En 2015, se publicó el modelo pronóstico resultante denominado ISS revisado o R-ISS ¹⁶⁹. Este modelo permite la identificación de tres grupos de pacientes con una clara diferencia en SLP y SG (Tabla 6). Por ello, actualmente el IMWG recomienda la utilización de este modelo para la evaluación pronóstica de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico.

Tabla 6. Modelos de estratificación pronóstica para MM de nuevo diagnóstico

Modelo de estratificación pronóstica	Grupo	n (%)	Supervivencia
ISS¹⁶³			Mediana SG (meses)
Alb \geq 3,5 g/dL y β 2M < 3,5 mg/L	I	3117 (29)	62
Alb < 3,5 g/dL y β 2M: 3,5-5,4 mg/L	II	3977 (37)	45
β 2M \geq 5,5 mg/L	III	3655 (34)	29
GMMG-HD3 /GMMG-HD4¹⁶⁶			Prob SG a 5 años (%)
ISS I + CTG riesgo estándar	Fav	132 (42)	72
ISS I + CTG AR	Int	138 (44)	62
ISS II/III + CTG riesgo estándar			
ISS II/III + CTG AR	Alto	44 (14)	41
Británico MRC IX trial¹⁵⁵			Mediana SG (meses)
ISS I/II + CTG riesgo estándar	Fav	242 (38)	68
ISS I + 1 CTG AR			
ISS I + 2 CTG AR	Int	300 (48)	41
ISS II/III + 1 CTG AR			
ISS III + CTG riesgo estándar			
ISS II/III + 2 CTG AR	Alto	87 (14)	19
IFM+MRC+PETHEMA¹⁶⁵			Prob SG a 5 años (%)
ISS I/II CTG riesgo estándar	Fav	935 (52)	70
ISS I + CTG AR	Int	526 (27)	40
ISS III + CTG riesgo estándar			
ISS II/III + CTG AR	Alto	378 (21)	30
IFM 2005-01+GIMEMA+PETHEMA+HOVON65¹⁶⁸			Prob SG a 2 años (%)
1 punto por cada variable:	0	888 (57)	93
-ISS III	1	489 (32)	85
-CTG AR	2	65 (4)	67
-LDH \uparrow	3	114 (7)	55
R-ISS¹⁶⁹			Prob SG a 5 años (%)
ISS I+CTG riesgo estándar+LDH N	R-ISS I	871 (28)	82
No R-ISS I ni R-ISS III	R-ISS II	1894 (62)	62
ISS III + CTG AR ó ISS III + LDH \uparrow	R-ISS III	295 (10)	40

CTG: alteraciones citogenéticas detectadas por HISF; AR: alto riesgo; Prob: probabilidad; Fav: favorable; Int: intermedio; N: normal; \uparrow : elevada.

A pesar de que algunos de los modelos pronósticos presentados, especialmente el ISS, han sido ampliamente validados y utilizados en la práctica clínica, la realidad es que por el momento no se utilizan para guiar estrategias terapéuticas adaptadas al riesgo. Como excepción se podría mencionar la estrategia de doble trasplante en MM de alto riesgo citogenético ¹⁶² o la estrategia mSMART propuesta por la Clínica Mayo ¹⁷⁰. De ahí que sean necesarios más estudios para validar herramientas pronósticas que integren factores del paciente y de la biología de la enfermedad, para detectar biomarcadores predictores de respuesta que identifiquen potenciales respondedores a determinados fármacos y así poder implementar tratamientos personalizados en un futuro.

3.4 Factores pronósticos tras el trasplante autólogo

En el MM se han identificado no solo factores pronósticos en el momento del diagnóstico, sino también marcadores que podríamos denominar dinámicos y que actualizan el riesgo de progresión o supervivencia de acuerdo a distintos eventos que acontecen en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad, como en el periodo postrasplante. La respuesta alcanzada al día +100, la presencia de MRD y la presencia de marcadores de reconstitución inmune son algunos de los factores pronósticos dinámicos más relevantes tras el trasplante autólogo.

3.4.1 Respuesta al tratamiento día +100

Tras el TAPH, se recomienda que la evaluación de la respuesta se realice en el día +100. Los criterios de respuesta propuestos por el IMWG se han actualizado recientemente e incluyen la evaluación de la respuesta mediante técnicas serológicas y además técnicas de mayor sensibilidad para la detección de la MRD (Tabla 7) ¹⁷¹.

3.4.1.1 Respuesta al tratamiento por técnicas serológicas

La respuesta al tratamiento en el día +100 del TAPH es un marcador sustitutivo de SLP y SG, dado que una mayor calidad de la respuesta permite predecir un menor

Introducción

riesgo de recaída postrasplante y una mayor supervivencia. Esta conclusión se ha validado en numerosos estudios con pacientes sometidos a TAPH, tanto en la época de la quimioterapia convencional ¹⁷²⁻¹⁷⁴, como con los nuevos fármacos IMiDs/IP ¹⁷⁴⁻¹⁷⁸. El GEM demostró en un estudio prospectivo con más de 600 pacientes que aquellos que alcanzaban RC postrasplante tenían una SLP y una SG más prolongadas que los que no alcanzaban RC ¹⁷⁸.

Otro concepto interesante es que la calidad de respuesta postrasplante depende de la eficacia del tratamiento recibido y la respuesta alcanzada en la inducción, tal y como demostraron el grupo de la Clínica Mayo ¹⁷⁹ y el GEM ¹⁷⁸. Los resultados de un metaanálisis mostraron una asociación entre la calidad de la respuesta alcanzada tras la inducción y la supervivencia a largo plazo ¹⁷⁴. En base a los resultados de dichos estudios, la recomendación es intentar alcanzar la mejor respuesta posible, al menos RP tras la inducción, antes de realizar el TAPH.

La incorporación de IP e IMiDs, como bortezomib (V), talidomida (T) o lenalidomida (R), a los esquemas de inducción ha supuesto una mejora de las tasas de RC pretrasplante y postrasplante y es bien aceptado que los pacientes deben recibir una combinación basada en tres fármacos. El GEM demostró en el ensayo clínico fase 3 GEM05 que VTD era superior a la poliquimioterapia convencional como tratamiento de inducción en pacientes jóvenes, con tasas de RC pretrasplante y postrasplante superiores en el grupo de VTD (35 y 46% con VTD vs. 21 y 38% con poliquimioterapia, $P=0,01$), lo cual se tradujo en una mediana de SLP también significativamente más larga (56 vs. 35 meses) ¹⁸⁰. Otros estudios han confirmado el beneficio de VTD ^{181, 182} y, recientemente, el GEM ha evaluado VRD en una serie de 455 pacientes demostrando que es igual de eficaz que VTD ¹⁸³, pero con mejor perfil de toxicidad, por lo que será el nuevo estándar en el futuro. Varios estudios se encuentran actualmente en marcha evaluando el impacto de la adición de otros fármacos como elotuzumab o daratumumab, con el fin de aumentar la calidad de la respuesta postrasplante ¹⁸⁴.

En resumen, la elección de un esquema de inducción óptimo es un aspecto relevante para la realización posterior del TAPH. En base a la evidencia disponible, en el momento actual se recomienda la utilización de un esquema de inducción que incluya tres fármacos: bortezomib, dexametasona, y un IMiDs (lenalidomida o talidomida), reservando el alquilante para el acondicionamiento del TAPH¹⁸⁵. Mediante esta estrategia, aproximadamente un tercio de los pacientes alcanzarán RC previo al TAPH con una mejora de la tasa de respuestas tras el mismo de hasta el 50%.

Tabla 7. Criterios de respuesta al tratamiento en el MM (IMWG 2016)

Categorías de respuesta	CM (suero)	CM (orina)	IF (suero)	IF (orina)	CP en MO	sFLC ratio	IHQ/CMF
Remisión completa estricta (RCe)	Negativo				<5%	Normal	Negativa
Respuesta completa (RC)	Negativo				<5%	Alterado	N/A
Muy buena respuesta parcial (MBRP)	↓ >90%	<100 mg/24h	Positivo		N/A	N/A	N/A
Respuesta parcial (RP)	↓ >50%	↓ >90% y/o <200 mg/24h					
Respuesta menor (RM)	↓ >25%	↓ >50%					
Enfermedad en progresión (EP)	↑ 25% del valor de la mejor respuesta alcanzada				En MM no secretor: Incremento absoluto ≥10%	En MM no secretor: Incremento absoluto Dif FLC >10 mg/dL	N/A
	Incremento absoluto ≥0,5 g/dL	Incremento absoluto ≥200 mg/24 h	N/A				
Enfermedad estable (EE)	No cumple criterios de RCe, RC, MBRP, RP, RM, ni EP.						
Evaluación de la minimal residual disease (MRD) en los pacientes que alcanzan RC							
MRD negativa por CMF	Ausencia de CP en MO clonales fenotípicamente aberrantes usando criterios Euro-Flow o método equivalente validado para la detección de una MRD con una sensibilidad mínima de 10 E-5.						
MRD negativa por molecular	Ausencia de CP en MO clonales por NGS. La definición de clonalidad requiere 2 lecturas de secuenciación idénticas utilizando una plataforma LymphoSIGHT o método equivalente validado con una sensibilidad mínima de 10 E-5.						
Imagen y MRD negativa	MRD negativa (por NGS y/o CMF) + desaparición de cualquier área de captación PET/TC respecto al diagnóstico o descenso de la captación SUV respecto al mediastino o al tejido de partes blandas adyacente.						
MRD negativa mantenida	Criterios de imagen y MRD negativa confirmados con al menos un año de diferencia. Las reevaluaciones consecutivas debe especificar la duración de la negatividad (MRD neg a los 5 años).						

3.4.1.2 MRD

Dado que aproximadamente la mitad de los pacientes con MM tratados con los esquemas actuales alcanzarán RC, es necesario implantar metodologías con mayor sensibilidad que las técnicas convencionales en suero para la detección de células

mielomas residuales, pues éstas serán las potenciales responsables de la recaída. Recientemente el IMWG ha actualizado los criterios de respuesta al tratamiento (Tabla 7), incorporando la MRD evaluada tanto dentro como fuera de la MO con diferentes técnicas de alta sensibilidad ¹⁷¹.

– La detección de MRD en MO mediante CMF alcanza una sensibilidad de hasta 10^{-5} . El GEM demostró en un estudio prospectivo que la detección de MRD por CMF en el día +100 del trasplante era el factor pronóstico independiente más importante para SLP y SG; los pacientes con MRD negativa al día +100 presentaron una mediana de SLP significativamente mayor, 71 meses comparado con 37 meses en los pacientes con MRD positiva ($P < 0,001$); y una mediana de SG no alcanzada frente a 89 meses en el grupo con detección de MRD positiva ($P = 0,002$) ¹⁸⁶. El valor pronóstico de la MRD antes y después del TAPH ha sido validado posteriormente en un estudio prospectivo del grupo británico ¹⁸⁷.

– La detección de MRD en MO mediante técnicas moleculares:

Varios estudios han demostrado el valor pronóstico de la detección de la MRD por PCR cuantitativa ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. En 2005, el grupo de Salamanca llevó a cabo un estudio en el que comparó la PCR cuantitativa (ASO RQ-PCR) con la CMF en la cuantificación de MRD en pacientes con MM ¹⁸⁹. Los resultados mostraron que ASO-RQ-PCR tenía una sensibilidad ligeramente más alta (10^{-5} - 10^{-6}), sin embargo la aplicabilidad de la CMF fue significativamente superior. Estos resultados fueron validados posteriormente por el mismo grupo en un estudio prospectivo ¹⁹⁰.

El GEM también llevó a cabo un estudio de detección de MRD mediante la aplicación de una plataforma de secuenciación basada en NGS, *LymphoSIGHT*. Dicha estrategia tuvo una concordancia del 83% con la CMF y del 85% con la ASO-RQ-PCR, y permitió identificar pacientes en RC con MRD negativa (sensibilidad de 10^{-5}) que alcanzaron una mediana de SLP significativamente mayor comparada con los pacientes con MRD positiva (131 vs. 35 meses, $P < 0,001$) ¹⁹¹.

– La evaluación de la enfermedad extramedular es complementaria a la evaluación de la MRD medular (Tabla 7). Dos estudios prospectivos han evaluado el papel de la PET/TC con ^{18}F FDG como técnica de imagen para evaluar la enfermedad extramedular antes y después del TAPH. Bartel et al. demostraron que los pacientes en RC metabólica antes del TAPH tenían una SLP y SG más prolongadas que aquellos con captación ¹⁹². Zamagni et al. pusieron de manifiesto que la PET/TC también es una técnica útil para evaluar la respuesta extramedular tras el TAPH: el 23% de los pacientes en RC medular presentaron captación en la PET/TC y tuvieron una probabilidad de SLP a 4 años inferior que aquellos que no mostraron lesiones hipermetabólicas (30 vs. 61%, $P = 0,019$) ¹⁹³.

Aunque actualmente la detección de la MRD no determina la toma de decisiones terapéuticas, hay que señalar que hay ensayos clínicos fase 3 en marcha evaluando el papel de la MRD para la identificación de los pacientes que más se beneficiarán de estrategias de tratamiento postrasplante, como la consolidación y el mantenimiento. Los resultados de dichos estudios abrirán la puerta a la implementación de la terapia personalizada en el contexto del postrasplante.

3.4.2 Recuperación inmune postrasplante

El TAPH podría tener un efecto de *reset* inmunológico y de "injerto autólogo contra tumor" tras el procedimiento, de acuerdo a los resultados de varios estudios en los que se muestra el beneficio clínico de una reconstitución inmune precoz ^{194, 195}.

En primer lugar, la dinámica de la recuperación de las distintas poblaciones linfocitarias tras el TAPH tiene impacto pronóstico. El grupo de la Clínica Mayo demostró la asociación entre un recuento ≥ 500 linfocitos/uL en el día +15 del TAPH y una SLP y SG más prolongadas, tanto en MM ^{116, 196, 197}, como en amiloidosis AL ¹⁹⁸, linfoma de Hodgkin o leucemia mieloblástica aguda ^{199, 200}; y en dos estudios prospectivos en LNH ^{201, 202}. Además, varios estudios han demostrado que la dosis infundida de linfocitos se correlaciona con el recuento linfocitario en el día +15 del TAPH, y tiene un impacto

Introducción

pronóstico, pues dosis $\geq 0,5 \times 10^9/\text{Kg}$ de linfocitos se asociaron con una SG más prolongada en pacientes con MM y LNH^{203, 204}. El recuento de células NK también tiene impacto pronóstico, puesto que los recuentos elevados de NK al mes del TAPH, > 200 células/uL, se asocian con mayor SLP^{116, 118}.

En cambio, una mayor proporción de linfocitos T reg, el descenso de la proporción de NK y el aumento de linfocitos T CD8+ senescentes (con menor expresión de CD28 y aumento de CD57 y PD-1) al día +100 se asociaron de forma significativa con recaídas postrasplante¹¹⁷.

Hasta la fecha no se han realizado estudios de subpoblaciones linfocitarias B ni se ha establecido una correlación con la recuperación de las Ig policlonales y su potencial papel pronóstico en el contexto del TAPH. Sin embargo, sí se ha estudiado la aparición de bandas oligoclonales, un fenómeno que aparece tras el TAPH hasta en el 60% de los pacientes en RC tratados con nuevos fármacos y que es reflejo de una respuesta humoral oligoclonal B²⁰⁵⁻²⁰⁹. Este fenómeno se identifica al detectar múltiples bandas en la IF en suero y/o orina. Puede ser un fenómeno transitorio, aunque si se presenta de forma sostenida se asocia con mejor supervivencia tras el TAPH²¹⁰.

Además, en un estudio donde se analizaron las poblaciones linfocitarias circulantes de pacientes con MM en RC seis años después de la realización de TAPH, se demostró que estos pacientes presentaban un patrón inmune característico y diferente al de los individuos sanos, con predominio de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria efectores y un incremento de linfocitos B *naïve*²¹¹. Por tanto, además de una recuperación inmune precoz, es importante que el estatus de inmunocompetencia se mantenga en el tiempo, pues probablemente juegue un papel crucial en el control de la enfermedad.

3.4.2.1 *Perspectivas futuras: estrategias de inmunoterapia en el TAPH*

Una de las capacidades que adquiere la célula tumoral en el desarrollo de un tumor es la evasión del control del sistema inmune²¹², de ahí que la recuperación de la

actividad antitumoral del sistema inmune sea una estrategia prometedora y clave en el control del cáncer.

De hecho, en el momento actual hay un interés creciente en el uso de la inmunoterapia para el tratamiento del MM y en el período postrasplante autólogo como escenario óptimo para la aplicación de estrategias de inmunoterapia. La terapia adoptiva es una terapia antitumoral personalizada que implica la administración de células del sistema inmune del paciente que han sido modificadas mediante técnicas de ingeniería genética con el fin de proporcionarles actividad antitumoral directa ²¹³. Las razones por las que el período postrasplante autólogo es un momento idóneo para la aplicación de estas estrategias son varias:

- El acondicionamiento mieloablativo con melfalán permite una depleción efectiva de linfocitos que favorece la proliferación homeostática de los linfocitos T modificados e infundidos posteriormente. Además, se eliminan los mecanismos de tolerancia intrínsecos que impiden generalmente la generación de una inmunidad antitumoral efectiva, se induce una liberación de CK que genera un microambiente favorable para los linfocitos T modificados, y en este contexto, además, se podría aumentar la eficacia de vacunas específicas contra el tumor al seleccionar el desarrollo de un repertorio de linfocitos T con mayor capacidad de reconocimiento tumoral ^{42, 214}.

- La baja carga tumoral generalmente presente después del TAPH.

- La evidencia de que la recuperación inmune precoz tras el TAPH tiene un impacto positivo en la supervivencia de los pacientes con MM, probablemente por el control que ejerce el sistema inmune sobre la enfermedad residual postrasplante. La recuperación de determinadas poblaciones citotóxicas como las células NK o los linfocitos CD8+ activados y la disminución de los linfocitos Treg se asocia con un beneficio clínico, por lo que podrían ser poblaciones diana en las estrategias de inmunoterapia ¹¹⁷.

En el año 2010 se publicó un estudio prospectivo fase 1 donde se analizó la seguridad de la movilización de CPH autólogas con IL-2, G-CSF y GM-CSF con el fin de

Introducción

movilizar un mayor número de linfocitos T CD8+, CD4+ y células NK. La tolerancia a dicho esquema de movilización fue buena y los resultados sugieren que podría acelerar la reconstitución inmune tras el TAPH²¹⁵. Otros estudios han demostrado que los pacientes movilizados con el plerixafor, un antagonista de CXCR4, tienen mayores recuentos de linfocitos T, CD4+ y CD8+, células NK y dendríticas en el producto de aféresis^{216, 217}. Sin embargo, no se han publicado hasta la fecha resultados de estudios fase 3 que demuestren la superioridad de dichos esquemas de movilización frente al convencional con G-CSF en cuanto a supervivencia y recuperación inmune.

El grupo de Baltimore ha trabajado desde hace años para restaurar la inmunidad de forma precoz tras el TAPH en pacientes con MM mediante estrategias de inmunoterapia adoptiva y vacunación antitumoral²¹⁸. Los resultados de un estudio fase 1/2 con infusión de linfocitos T autólogos activados en el contexto del TAPH en pacientes con MM demuestran por primera vez que una estrategia combinada de inmunoterapia adoptiva y vacunación contra antígenos tumorales genera una rápida respuesta celular y humoral postrasplante, asociándose además con una SLP más prolongada²¹⁹.

Otras estrategias que se han llevado a cabo con éxito en ensayos fase 1 consisten en la coadministración de otros componentes celulares en el TAPH para potenciar la recuperación inmune postrasplante, como células mesenquimales²²⁰ o células NK de sangre de cordón umbilical²²¹.

Por todo ello, parece que la potenciación del sistema inmune en el reconocimiento y eliminación de las células mielomatosas residuales tras el TAPH es una estrategia prometedora que podría disminuir la tasa de recaídas postrasplante y aumentar la supervivencia de los pacientes con MM. Sin embargo, a pesar del potencial de las estrategias de inmunoterapia, son necesarios más estudios sobre la dinámica de recuperación inmune postrasplante que ayuden a definir el momento óptimo para aplicarlas, así como la identificación de biomarcadores precoces de disfunción inmune que guíen en la aplicación de estas estrategias.

4. Referencias de la Introducción

1. Hidalgo CO. De las células plasmáticas al mieloma múltiple. Una breve perspectiva histórica. *Patología*. 2011;49(2):120-31.
2. Kyle RA. Henry Bence Jones--physician, chemist, scientist and biographer: a man for all seasons. *Br J Haematol*. 2001;115(1):13-8.
3. Fagraeus A. Antibody production in relation to the development of plasma cells : in vivo and in vitro experiments. Stockholm: [s.n.]; 1948.
4. Porter RR. Structural Studies of Immunoglobulins. *Science*. 1973;180(4087):713-6.
5. Schwartz JH, Edelman GM. Comparisons of Bence-Jones proteins and I polypeptide chains of myeloma globulins after hydrolysis with trypsin. *The Journal of Experimental Medicine*. 1963;118(1):41-53.
6. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364(11):1046-60.
7. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-7.
8. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113(22):5418-22.
9. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2006;354(13):1362-9.
10. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, de Larrea CF. Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*. 2008;22(9):1651-7.
11. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2002;346(8):564-9.
12. Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1980;302(24):1347-9.
13. Kristinsson SY, Holmberg E, Blimark C. Treatment for high-risk smoldering myeloma. *N Engl J Med*. 2013;369(18):1762-3.
14. Sorig R, Klausen TW, Salomo M, Vangsted AJ, Ostergaard B, Gregersen H, et al. Smoldering multiple myeloma risk factors for progression: a Danish population-based cohort study. *Eur J Haematol*. 2016;97(3):303-9.
15. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2007;356(25):2582-90.
16. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003;121(5):749-57.
17. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1):3-9.

Referencias de la Introducción

18. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538-48.
19. Terpos E, Dimopoulos MA, Moulopoulos LA. The Role of Imaging in the Treatment of Patients With Multiple Myeloma in 2016. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2016;35:e407-17.
20. Solomon A, Weiss DT, Kattine AA. Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins. *N Engl J Med.* 1991;324(26):1845-51.
21. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2011;365(5):474-5.
22. Kastritis E, Terpos E, Moulopoulos L, Spyropoulou-Vlachou M, Kanellias N, Eleftherakis-Papaiakevou E, et al. Extensive bone marrow infiltration and abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia.* 2013;27(4):947-53.
23. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* 2013;27(4):941-6.
24. Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, Bauerle T, Ayyaz S, Heiss C, et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1606-10.
25. Kastritis E, Moulopoulos LA, Terpos E, Koutoulidis V, Dimopoulos MA. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia.* 2014;28(12):2402-3.
26. Johnsen HE, Bergkvist KS, Schmitz A, Kjeldsen MK, Hansen SM, Gaihede M, et al. Cell of origin associated classification of B-cell malignancies by gene signatures of the normal B-cell hierarchy. *Leukemia & Lymphoma.* 2014;55(6):1251-60.
27. González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 2007;110(9):3112-21.
28. Johnsen HE, Bøgsted M, Schmitz A, Bødker JS, El-Galaly TC, Johansen P, et al. The myeloma stem cell concept, revisited: from phenomenology to operational terms. *Haematologica.* 2016;101(12):1451-9.
29. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(2):100-13.
30. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005;106(1):296-303.
31. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell.* 2014;25(1):91-101.
32. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2014;5:2997.
33. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol.* 2015;33(33):3911-20.

34. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*. 2014;28(8):1705-15.
35. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1067-76.
36. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335-48.
37. Lopez-Corral L, Mateos MV, Corchete LA, Sarasquete ME, de la Rubia J, de Arriba F, et al. Genomic analysis of high-risk smoldering multiple myeloma. *Haematologica*. 2012;97(9):1439-43.
38. Lopez-Corral L, Sarasquete ME, Bea S, Garcia-Sanz R, Mateos MV, Corchete LA, et al. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia*. 2012;26(12):2521-9.
39. Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB, Mateos MV, Rasillo A, Garcia-Sanz R, 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*. 2011;17(7):1692-700.
40. Kyrtsolis MC, Mouzaki A, Maniatis A. Mechanisms of polyclonal hypogammaglobulinaemia in multiple myeloma (MM). *Med Oncol*. 1999;16(2):73-7.
41. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, Neeson P, Harrison S, Smyth MJ, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010;24(1):22-32.
42. Lee SJ, Borrello I. Role of the Immune Response in Disease Progression and Therapy in Multiple Myeloma. *Cancer Treat Res*. 2016;169:207-25.
43. Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, English A, Pratt G, Child JA, et al. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol*. 1998;100(1):176-83.
44. Tsujimoto T, Lisukov IA, Huang N, Mahmoud MS, Kawano MM. Plasma cells induce apoptosis of pre-B cells by interacting with bone marrow stromal cells. *Blood*. 1996;87(8):3375-83.
45. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*. 1986;137(12):3855-60.
46. Urashima M, Ogata A, Chauhan D, Hatziyanni M, Vidriales MB, Dedera DA, et al. Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood*. 1996;87(5):1928-38.
47. Kyrtsolis MC, Repa C, Dedoussis GV, Mouzaki A, Simeonidis A, Stamatelou M, et al. Serum transforming growth factor-beta 1 is related to the degree of immunoparesis in patients with multiple myeloma. *Med Oncol*. 1998;15(2):124-8.
48. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):741-50.
49. Broder S, Humphrey R, Durm M, Blackman M, Meade B, Goldman C, et al. Impaired synthesis of polyclonal (non-paraprotein) immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma role of suppressor cells. *N Engl J Med*. 1975;293(18):887-92.

Referencias de la Introducción

50. Gorgun GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*. 2013;121(15):2975-87.
51. Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, Carrasco R, Bandi M, Hideshima T, et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell*. 2009;16(4):309-23.
52. Braga WM, Atanackovic D, Colleoni GW. The role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:293479.
53. Kastritis E, Zagouri F, Symeonidis A, Roussou M, Sioni A, Pouli A, et al. Preserved levels of uninvolved immunoglobulins are independently associated with favorable outcome in patients with symptomatic multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(10):2075-9.
54. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21-33.
55. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007;110(7):2586-92.
56. Pika T, Lochman P, Sandecka V, Maisnar V, Minarik J, Tichy M, et al. Immunoparesis in MGUS - Relationship of uninvolved immunoglobulin pair suppression and polyclonal immunoglobuline levels to MGUS risk categories. *Neoplasma*. 2015;62(5):827-32.
57. Espino M, Medina S, Blanchard MJ, Villar LM. Involved/uninvolved immunoglobulin ratio identifies monoclonal gammopathy of undetermined significance patients at high risk of progression to multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2014;164(5):752-5.
58. Andrade-Campos M, Murillo-Florez I, Garcia-Sanz R, Giraldo P. Immunoparesis in IgM gammopathies as a useful biomarker to predict disease progression. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(10):1598-604.
59. Muchtar E, Dispenzieri A, Kumar SK, Dingli D, Lacy MQ, Buadi FK, et al. Immunoparesis status in immunoglobulin light chain amyloidosis at diagnosis affects response and survival by regimen type. *Haematologica*. 2016;101(9):1102-9.
60. Muchtar E, Magen H, Itchaki G, Cohen A, Rosenfeld R, Shochat T, et al. Uninvolved immunoglobulins predicting hematological response in newly diagnosed AL amyloidosis. *Leuk Res*. 2016;41:56-61.
61. Muchtar E, Dispenzieri A, Kumar SK, Buadi FK, Lacy MQ, Zeldenrust S, et al. Immunoparesis in newly diagnosed AL amyloidosis is a marker for response and survival. *Amyloid*. 2017;24(sup1):40-1.
62. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
63. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*. 2011;117(18):4701-5.
64. Dimopoulos MA, Sonneveld P, Leung N, Merlini G, Ludwig H, Kastritis E, et al. International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment. *J Clin Oncol*. 2016;34(13):1544-57.
65. Watzig H, Gunter S. Capillary electrophoresis-a high performance analytical separation technique. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(6):724-38.

66. Garcia-Sanz R, Mateos MV, San Miguel JF. [Multiple myeloma]. *Med Clin (Barc)*. 2007;129(3):104-15.
67. Lopez-Corral L, Garcia-Sanz R, San Miguel JF. [Value of serum free light chains assay in plasma cell disorders]. *Med Clin (Barc)*. 2010;135(8):368-74.
68. Perry MC, Kyle RA. The clinical significance of Bence Jones proteinuria. *Mayo Clin Proc*. 1975;50(5):234-8.
69. Pascali E, Pezzoli A. The incidence of Bence-Jones proteinuria in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1986;64(4):847-50.
70. Vegh Z, Otto S, Eckhardt S. Monoclonal free light chains in urine and their significance in clinical diagnostics: are they really tumor markers? *J Clin Lab Anal*. 1990;4(6):443-8.
71. Pascali E, Pezzoli A. The clinical spectrum of pure Bence Jones proteinuria. A study of 66 patients. *Cancer*. 1988;62(11):2408-15.
72. Durie BG, Cole PW, Chen HS, Himmelstein KJ, Salmon SE. Synthesis and metabolism of Bence Jones protein and calculation of tumour burden in patients with Bence Jones myeloma. *Br J Haematol*. 1981;47(1):7-19.
73. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer*. 1975;36(3):842-54.
74. Brigden ML, Neal ED, McNeely MD, Hoag GN. The optimum urine collections for the detection and monitoring of Bence Jones proteinuria. *Am J Clin Pathol*. 1990;93(5):689-93.
75. Levinson SS. Urine protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis supplement one another in characterizing proteinuria. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(1):79-84.
76. Clyne DH, Kant KS, Pesce AJ, Pollak VE. Nephrotoxicity of low molecular weight serum proteins: physicochemical interactions between myoglobin, hemoglobin, bence-jones proteins and tamm-horsfall mucoprotein. *Curr Probl Clin Biochem*. 1979(9):299-308.
77. Clyne DH, Pesce AJ, Thompson RE. Nephrotoxicity of Bence Jones proteins in the rat: importance of protein isoelectric point. *Kidney Int*. 1979;16(3):345-52.
78. Fine JD, Rees ED. Renal cytotoxic effects of Bence-Jones protein. *Lancet*. 1977;1(8003):150.
79. Ledingham JG. Tubular toxicity of filtered proteins. *Am J Nephrol*. 1990;10 Suppl 1:52-7.
80. 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(1):61-72.
81. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-21.
82. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameje G, Gutierrez NC, Liebisch P, O'Connor S, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2012;97(8):1272-7.
83. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 2008;111(2):785-9.

Referencias de la Introducción

84. Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, Cohen A, Vogl DT, Stadtmauer EA, et al. Classifying ultra-high risk smoldering myeloma. *Leukemia*. 2015;29(3):751-3.
85. Merz M, Hielscher T, Wagner B, Sauer S, Shah S, Raab MS, et al. Predictive value of longitudinal whole-body magnetic resonance imaging in patients with smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(9):1902-8.
86. Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, Witzig TE, Kumar S, Dispenzieri A, et al. High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(3):680-5.
87. Gonsalves WI, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Dingli D, Timm MM, Morice WG, et al. Quantification of circulating clonal plasma cells via multiparametric flow cytometry identifies patients with smoldering multiple myeloma at high risk of progression. *Leukemia*. 2017;31(1):130-5.
88. Rosinol L, Blade J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Montoto S, et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol*. 2003;123(4):631-6.
89. Fernandez de Larrea C, Isola I, Pereira A, Cibeira MT, Magnano L, Tovar N, et al. Evolving M-protein pattern in patients with smoldering multiple myeloma: impact on early progression. *Leukemia*. 2018.
90. Ravi P, Kumar S, Larsen JT, Gonsalves W, Buadi F, Lacy MQ, et al. Evolving changes in disease biomarkers and risk of early progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e454.
91. Zamagni E, Nanni C, Gay F, Pezzi A, Patriarca F, Bello M, et al. 18F-FDG PET/CT focal, but not osteolytic, lesions predict the progression of smoldering myeloma to active disease. *Leukemia*. 2016;30(2):417-22.
92. Siontis B, Kumar S, Dispenzieri A, Drake MT, Lacy MQ, Buadi F, et al. Positron emission tomography-computed tomography in the diagnostic evaluation of smoldering multiple myeloma: identification of patients needing therapy. *Blood Cancer J*. 2015;5:e364.
93. Rajkumar SV, Gupta V, Fonseca R, Dispenzieri A, Gonsalves WI, Larson D, et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(8):1738-44.
94. Neben K, Jauch A, Hielscher T, Hillengass J, Lehnert N, Seckinger A, et al. Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4325-32.
95. Dhodapkar MV, Sexton R, Waheed S, Usmani S, Papanikolaou X, Nair B, et al. Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood*. 2014;123(1):78-85.
96. Khan R, Dhodapkar M, Rosenthal A, Heuck C, Papanikolaou X, Qu P, et al. Four genes predict high risk of progression from smoldering to symptomatic multiple myeloma (SWOG S0120). *Haematologica*. 2015;100(9):1214-21.
97. Mateos MV, Landgren O. MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Diagnosis and Epidemiology. *Cancer Treat Res*. 2016;169:3-12.
98. Mateos MV, Gonzalez-Calle V. Smoldering Multiple Myeloma: Who and When to Treat. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017.
99. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, 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.* 2016;17(8):1127-36.
100. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Lopez Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2013;369(5):438-47.
101. Fernández de Larrea C, Isola I, Cibeira MT, Rosiñol L, Calvo X, Tovar N, et al. Smoldering Multiple Myeloma: Impact of the Evolving Pattern on Early Progression. *Blood.* 2014;124(21):3363-.
102. Hofmeister CC, Chari A, Cohen Y, Spencer A, Voorhees PM, Estell J, et al. Daratumumab Monotherapy for Patients with Intermediate or High-Risk Smoldering Multiple Myeloma (SMM): Centaurus, a Randomized, Open-Label, Multicenter Phase 2 Study. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):510-.
103. Mateos M-V, Martinez Lopez J, Rodriguez-Otero P, Ocio EM, Gonzalez MS, Oriol A, et al. Curative Strategy for High-Risk Smoldering Myeloma (GEM-CESAR): Carfilzomib, Lenalidomide and Dexamethasone (KRd) As Induction Followed By HDT-ASCT, Consolidation with Krd and Maintenance with Rd. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):402-.
104. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia.* 2014;28(5):1122-8.
105. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood.* 2008;111(5):2516-20.
106. Moreau P. How I treat: New agents in myeloma. *Blood.* 2017.
107. Shah GL, Winn AN, Lin PJ, Klein A, Sprague KA, Smith HP, et al. Cost-Effectiveness of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Elderly Patients with Multiple Myeloma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare Database. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(10):1823-9.
108. Huang LW, Bacon W, Cirrincione C, Peterson B, Long G, Rizzieri D, et al. Efficacy and safety of high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in senior versus younger adults with newly diagnosed multiple myeloma. 2017.
109. Straka C, Liebisch P, Salwender H, Hennemann B, Metzner B, Knop S, et al. Autotransplant with and without induction chemotherapy in older multiple myeloma patients: long-term outcome of a randomized trial. *Hematol Oncol.* 2016;101(11):1398-406.
110. Auner HW, Garderet L, Kroger N. Autologous haematopoietic cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2015;171(4):453-62.
111. Wildes TM, Finney JD, Fiala M, Gao F, Vij R, Stockerl-Goldstein K. High-dose therapy and autologous stem cell transplant in older adults with multiple myeloma. 2015;50(8):1075-82.
112. Harousseau J-L, Moreau P. Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2009;360(25):2645-54.
113. San Miguel JPS, JA. Mateos, MV. Indications for HSCT in adults. Multiple myeloma. . *The EBMT handbook 6th edition.* 2013.
114. Steingrimsdottir H, Gruber A, Bjorkholm M, Svensson A, Hansson M. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in relation to underlying disease, type of high-dose therapy and infectious complications. *Haematologica.* 2000;85(8):832-8.

Referencias de la Introducción

115. Sica S, Laurenti L, Sora F, Menichella G, Rumi C, Leone G, et al. Immune reconstitution following transplantation of autologous peripheral CD34+ cells. *Acta Haematol.* 2001;105(3):179-87.
116. Rueff J, Medinger M, Heim D, Passweg J, Stern M. Lymphocyte subset recovery and outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for plasma cell myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(6):896-9.
117. Chung DJ, Pronschinske KB, Shyer JA, Sharma S, Leung S, Curran SA, et al. T-cell Exhaustion in Multiple Myeloma Relapse after Autotransplant: Optimal Timing of Immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(1):61-71.
118. Hernandez MD, del Canizo MC, Gonzalez M, Caballero MD, Lopez-Berges MC, Vazquez L, et al. [Immune reconstitution after autologous progenitor hemopoietic cell transplantation. A study comparing autologous bone marrow and autologous peripheral blood transplantation]. *Med Clin (Barc).* 1998;110(20):768-73.
119. Reimer P, Kunzmann V, Wilhelm M, Weissbrich B, Kraemer D, Berghammer H, et al. Cellular and humoral immune reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). *Ann Hematol.* 2003;82(5):263-70.
120. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med.* 1996;335(2):91-7.
121. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348(19):1875-83.
122. Bladé J, Rosiñol L, Sureda A, Ribera JM, Díaz-Mediavilla J, García-Laraña J, et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood.* 2005;106(12):3755-9.
123. Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, et al. Standard Chemotherapy Compared With High-Dose Chemoradiotherapy for Multiple Myeloma: Final Results of Phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol.* 2006;24(6):929-36.
124. Femand J-P, Katsahian S, Divine M, Leblond V, Dreyfus F, Macro M, et al. High-Dose Therapy and Autologous Blood Stem-Cell Transplantation Compared With Conventional Treatment in Myeloma Patients Aged 55 to 65 Years: Long-Term Results of a Randomized Control Trial From the Group Myelome-Autogreffe. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9227-33.
125. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med.* 2017;376(14):1311-20.
126. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, Di Raimondo F, Ben Yehuda D, Petrucci MT, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2014;371(10):895-905.
127. Cavo M, Palumbo A, Zweegman S, Dimopoulos MA, Hajek R, Pantani L, et al. Upfront autologous stem cell transplantation (ASCT) versus novel agent-based therapy for multiple myeloma (MM): A randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM trial). *J Clin Oncol.* 2016;34(15_suppl):8000-.
128. Gay F, Oliva S, Petrucci MT, Conticello C, Catalano L, Corradini P, et al. Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone

- versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(16):1617-29.
129. Attal M, Palumbo A, Holstein SA, Lauwers-Cances V, Petrucci MT, Richardson PG, et al. Lenalidomide (LEN) maintenance (MNTC) after high-dose melphalan and autologous stem cell transplant (ASCT) in multiple myeloma (MM): A meta-analysis (MA) of overall survival (OS). *J Clin Oncol.* 2016;34(15_suppl):8001-.
130. Ahmed S, Nieto Y, Bashir Q, Patel K, Bollard C, Qazilbash M, et al. Moving Beyond Autologous Transplantation in Multiple Myeloma: Consolidation, Maintenance, Allogeneic Transplant, and Immune Therapy. *Br J Haematol.* 2016;35:210-21.
131. Mateos M-V, González-Calle V. Targeted therapy and maintenance in myeloma. *British Medical Bulletin.* 2017;122(1):163-78.
132. Clave E, Douay C, Coman T, Busson M, Bompont C, Moins-Teisserenc H, et al. Lenalidomide consolidation and maintenance therapy after autologous stem cell transplant for multiple myeloma induces persistent changes in T-cell homeostasis. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(8):1788-95.
133. Ballman KV. Biomarker: Predictive or Prognostic? *J Clin Oncol.* 2015;33(33):3968-71.
134. Fonseca R, San Miguel J. Prognostic factors and staging in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007;21(6):1115-40, ix.
135. Glavey SV, Gertz MA, Dispenzieri A, Kumar S, Buadi F, Lacy M, et al. Long-term outcome of patients with multiple [corrected] myeloma-related advanced renal failure following auto-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(12):1543-7.
136. Paiva B, Vidriales MB, Montalban MA, Perez JJ, Gutierrez NC, Rosinol L, et al. Multiparameter flow cytometry evaluation of plasma cell DNA content and proliferation in 595 transplant-eligible patients with myeloma included in the Spanish GEM2000 and GEM2005<65y trials. *Am J Pathol.* 2012;181(5):1870-8.
137. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med.* 1991;115(12):931-5.
138. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimpasi S, 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.* 2010;85(2):114-9.
139. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood.* 2016;127(24):2955-62.
140. Chang H, Sloan S, Li D, Zhuang L, Yi QL, Chen CI, et al. The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *Br J Haematol.* 2004;125(1):64-8.
141. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood.* 2005;106(8):2837-40.
142. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, Mateos MV, Hernandez JM, Fernandez M, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia.* 2007;21(1):143-50.

Referencias de la Introducción

143. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
144. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003;101(11):4569-75.
145. Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L, Caillot D, Hulin C, Marit G, et al. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):1949-52.
146. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002;100(5):1579-83.
147. Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, Magrangeas F, Sebban C, Lioure B, et al. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood*. 2011;117(6):2009-11.
148. Hebraud B, Magrangeas F, Cleynen A, Lauwers-Cances V, Chretien ML, Hulin C, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. *Blood*. 2015;125(13):2095-100.
149. Deng S, Xu Y, An G, Sui W, Zou D, Zhao Y, et al. Features of extramedullary disease of multiple myeloma: high frequency of p53 deletion and poor survival: a retrospective single-center study of 834 cases. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(5):286-91.
150. Chang H, Ning Y, Qi X, Yeung J, Xu W. Chromosome 1p21 deletion is a novel prognostic marker in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007;139(1):51-4.
151. Qazilbash MH, Saliba RM, Ahmed B, Parikh G, Mendoza F, Ashraf N, et al. Deletion of the short arm of chromosome 1 (del 1p) is a strong predictor of poor outcome in myeloma patients undergoing an autotransplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(9):1066-72.
152. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007;109(6):2276-84.
153. Hebraud B, Leleu X, Lauwers-Cances V, Roussel M, Caillot D, Marit G, et al. Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia*. 2014;28(3):675-9.
154. Boyd KD, Ross FM, Walker BA, Wardell CP, Tapper WJ, Chiecchio L, et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7776-84.
155. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, Konn ZJ, Tapper WJ, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia*. 2012;26(2):349-55.
156. Wu P, Walker BA, Broyl A, Kaiser M, Johnson DC, Kuiper R, et al. A gene expression based predictor for high risk myeloma treated with intensive therapy and autologous stem cell rescue. *Leukemia & Lymphoma*. 2015;56(3):594-601.
157. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol*. 2010;28(30):4630-4.

158. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(9):906-17.
159. Neben K, Lokhorst HM, Jauch A, Bertsch U, Hielscher T, van der Holt B, et al. Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p. *Blood*. 2012;119(4):940-8.
160. Avet-Loiseau H, Fonseca R, Siegel D, Dimopoulos MA, Spicka I, Masszi T, et al. Carfilzomib significantly improves the progression-free survival of high-risk patients in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(9):1174-80.
161. Leleu X, Karlin L, Macro M, Hulin C, Garderet L, Roussel M, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone in multiple myeloma with deletion 17p and/or translocation (4;14): IFM 2010-02 trial results. *Blood*. 2015;125(9):1411-7.
162. Cavo M, Gay FM, Patriarca F, Zamagni E, Montefusco V, Dozza L, et al. Double Autologous Stem Cell Transplantation Significantly Prolongs Progression-Free Survival and Overall Survival in Comparison with Single Autotransplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: An Analysis of Phase 3 EMN02/HO95 Study. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):401-.
163. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412-20.
164. Takamatsu H, Honda S, Miyamoto T, Yokoyama K, Hagiwara S, Ito T, et al. Changing trends in prognostic factors for patients with multiple myeloma after autologous stem cell transplantation during the immunomodulator drug/proteasome inhibitor era. *Cancer Sci*. 2015;106(2):179-85.
165. Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, Attal M, Gutierrez N, Haessler J, et al. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia*. 2013;27(3):711-7.
166. Neben K, Jauch A, Bertsch U, Heiss C, Hielscher T, Seckinger A, et al. Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica*. 2010;95(7):1150-7.
167. Kuiper R, van Duin M, van Vliet MH, Broijl A, van der Holt B, El Jarari L, et al. Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System. *Blood*. 2015;126(17):1996-2004.
168. Moreau P, Cavo M, Sonneveld P, Rosinol L, Attal M, Pezzi A, et al. Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem-cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *J Clin Oncol*. 2014;32(20):2173-80.
169. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863-9.
170. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(4):360-76.
171. 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. *The Lancet Oncology*. 2016;17(8):e328-e46.

Referencias de la Introducción

172. Blade J, Esteve J, Rives S, Martinez C, Rovira M, Urbano-Ispizua A, et al. High-dose therapy autotransplantation/intensification vs continued standard chemotherapy in multiple myeloma in first remission. Results of a non-randomized study from a single institution. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26(8):845-9.
173. Alexanian R, Weber D, Giralt S, Dimopoulos M, Delasalle K, Smith T, et al. Impact of complete remission with intensive therapy in patients with responsive multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(10):1037-43.
174. van de Velde HJ, Liu X, Chen G, Cakana A, Deraedt W, Bayssas M. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica.* 2007;92(10):1399-406.
175. Iacobelli S, de Wreede LC, Schonland S, Bjorkstrand B, Hegenbart U, Gruber A, et al. Impact of CR before and after allogeneic and autologous transplantation in multiple myeloma: results from the EBMT NMAM2000 prospective trial. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(4):505-10.
176. Kumar L, Iqbal N, Mookerjee A, Verma RK, Sharma OD, Batra A, et al. Complete response after autologous stem cell transplant in multiple myeloma. *Cancer Med.* 2014;3(4):939-46.
177. Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi F, Dingli D, et al. Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2013;31(36):4529-35.
178. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, Rosiñol L, Sureda A, Rubia Jdl, 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(35):5775-82.
179. Dingli D, Pacheco JM, Dispenzieri A, Hayman SR, Kumar SK, Lacy MQ, et al. Serum M-spike and transplant outcome in patients with multiple myeloma. *Cancer Sci.* 2007;98(7):1035-40.
180. Rosinol L, Oriol A, Teruel AI, Hernandez D, Lopez-Jimenez J, de la Rubia J, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood.* 2012;120(8):1589-96.
181. Moreau P, Hulin C, Macro M, Caillot D, Chateix C, Roussel M, et al. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood.* 2016;127(21):2569-74.
182. Cavo M, Pantani L, Pezzi A, Petrucci MT, Patriarca F, Di Raimondo F, et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) is superior to bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone (VCD) as induction therapy prior to autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia.* 2015;29(12):2429-31.
183. Rosinol L, Oriol A, Rios R, Sureda A, Blanchard MJ, Hernández MT, et al. Bortezomib, Lenalidomide and Dexamethasone (VRD-GEM) As Induction Therapy Prior Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) in Multiple Myeloma (MM): Results of a Prospective Phase III Pethema/GEM Trial. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):2017-.
184. Moreau P. How I treat myeloma with new agents. *Blood.* 2017;130(13):1507-13.
185. Mateos MV, Ocio EM, Paiva B, Rosinol L, Martinez-Lopez J, Blade J, et al. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev.* 2015;29(6):387-403.

186. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Perez JJ, Montalban MA, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112(10):4017-23.
187. Rawstron AC, Child JA, Tute RMd, 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(20):2540-7.
188. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L, et al. Major Tumor Shrinking and Persistent Molecular Remissions After Consolidation With Bortezomib, Thalidomide, and Dexamethasone in Patients With Autografted Myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2077-84.
189. 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(10):1365-72.
190. 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(2):391-7.
191. 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(20):3073-9.
192. Bartel TB, Haessler J, Brown TL, Shaughnessy JD, Jr., van Rhee F, Anaissie E, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(10):2068-76.
193. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, Zannetti B, Englaro E, Pezzi A, et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood*. 2011;118(23):5989-95.
194. Porrata LF, Markovic SN. Timely reconstitution of immune competence affects clinical outcome following autologous stem cell transplantation. *Clin Exp Med*. 2004;4(2):78-85.
195. Porrata LF. Autologous Graft-versus-Tumor Effect: Reality or Fiction? *Adv Hematol*. 2016;2016:5385972.
196. Luis F. Porrata MAG, David J. Inwards, Mark R. Litzow, Martha Q. Lacy, Ayalew Tefferi, Dennis A. Gastineau, Angela Dispenzieri SMA, Ivana N. M. Micallef, Susan M. Geyer, and Svetomir N. Markovic. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001.
197. Kim H, Sohn HJ, Kim S, Lee JS, Kim WK, Suh C. Early lymphocyte recovery predicts longer survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(11):1037-42.
198. Porrata LF, Gertz MA, Litzow MR, Lacy MQ, Dispenzieri A, Inwards DJ, et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with primary systemic amyloidosis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1210-8.
199. Porrata LF, Inwards DJ, Micallef IN, Ansell SM, Geyer SM, Markovic SN. Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. *Br J Haematol*. 2002;117(3):629-33.

Referencias de la Introducción

200. Porrata LF, Litzow MR, Tefferi A, Letendre L, Kumar S, Geyer SM, et al. Early lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2002;16(7):1311-8.
201. Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Gastineau DA, et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma: a prospective study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(7):807-16.
202. Valtola J, Varmavuo V, Ropponen A, Selander T, Kuitinen O, Kuitunen H, et al. Early immune recovery after autologous transplantation in non-Hodgkin lymphoma patients: predictive factors and clinical significance. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(9):2025-32.
203. Porrata LF, Gertz MA, Geyer SM, Litzow MR, Gastineau DA, Moore SB, et al. The dose of infused lymphocytes in the autograft directly correlates with clinical outcome after autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia*. 2004;18(6):1085-92.
204. Porrata LF, Litzow MR, Inwards DJ, Gastineau DA, Moore SB, Pineda AA, et al. Infused peripheral blood autograft absolute lymphocyte count correlates with day 15 absolute lymphocyte count and clinical outcome after autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(3):291-8.
205. Hall SL, Tate J, Gill D, Mollee P. Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Clin Biochem Rev*. 2009;30(3):113-8.
206. Hovenga S, de Wolf JT, Guikema JE, Klip H, Smit JW, Smit Sibinga CT, et al. Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma after VAD and EDAP courses: a high incidence of oligoclonal serum Igs post transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(7):723-8.
207. Fernandez de Larrea C, Tovar N, Cibeira MT, Arostegui JI, Rosinol L, Elena M, et al. Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. *Haematologica*. 2011;96(1):171-3.
208. Zent CS, Wilson CS, Tricot G, Jagannath S, Siegel D, Desikan KR, et al. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 1998;91(9):3518-23.
209. Jimenez-Zepeda VH, Reece DE, Trudel S, Franke N, Winter A, Chen C, et al. Oligoclonal and monoclonal bands after single autologous stem cell transplant in patients with multiple myeloma: impact on overall survival and progression-free survival. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(10):2284-9.
210. Tovar N, de Larrea CF, Arostegui JI, Cibeira MT, Rosinol L, Rovira M, et al. Natural history and prognostic impact of oligoclonal humoral response in patients with multiple myeloma after autologous stem cell transplantation: long-term results from a single institution. *Haematologica*. 2013;98(7):1142-6.
211. Artech-Lopez A, Kreutzman A, Alegre A, Sanz Martin P, Aguado B, Gonzalez-Pardo M, et al. Multiple myeloma patients in long-term complete response after autologous stem cell transplantation express a particular immune signature with potential prognostic implication. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(6):832-8.
212. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*.144(5):646-74.
213. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-8.

214. Krishnan A, Vij R, Keller J, Dhakal B, Hari P. Moving Beyond Autologous Transplantation in Multiple Myeloma: Consolidation, Maintenance, Allogeneic Transplant, and Immune Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:210-21.
215. Meehan KR, Talebian L, Wu J, Hill JM, Szczepiorkowski ZM, Sentman CL, et al. Immune mobilization of autologous blood progenitor cells: direct influence on the cellular subsets collected. *Cytotherapy*. 2010;12(8):1013-21.
216. Holtan SG, Porrata LF, Micallef IN, Padley DJ, Inwards DJ, Ansell SA, et al. AMD3100 affects autograft lymphocyte collection and progression-free survival after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007;7(4):315-8.
217. Gaugler B, Arbez J, Legouill S, Tiberghien P, Moreau P, Derenne S, et al. Characterization of peripheral blood stem cell grafts mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and plerixafor compared with granulocyte colony-stimulating factor alone. *Cytotherapy*. 2013;15(7):861-8.
218. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Aqui N, Badros A, Cotte J, Chrisley L, et al. Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer. *Nat Med*. 2005;11(11):1230-7.
219. Rapoport AP, Aqui NA, Stadtmauer EA, Vogl DT, Fang HB, Cai L, et al. Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. *Blood*. 2011;117(3):788-97.
220. Batorov EV, Shevela EY, Tikhonova MA, Batorova DS, Ushakova GY, Sizikova SA, et al. Mesenchymal stromal cells improve early lymphocyte recovery and T cell reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with malignant lymphomas. *Cell Immunol*. 2015;297(2):80-6.
221. Shah N, Li L, McCarty J, Kaur I, Yvon E, Shaim H, et al. Phase I study of cord blood-derived natural killer cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. 2017;177(3):457-66.
222. Kastritis E, Zagouri F, Symeonidis A, Roussou M, Sioni A, Pouli A, et al. Preserved levels of uninvolved immunoglobulins are independently associated with favorable outcome in patients with symptomatic multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(10):2075-9.
223. Fonseca R, Abouzaid S, Bonafede M, Cai Q, Parikh K, Cosler L, et al. Trends in overall survival and costs of multiple myeloma, 2000-2014. *Leukemia*. 2017.
224. Biran N, Jacobus S, Vesole DH, Callander NS, Fonseca R, Williams ME, et al. Outcome with lenalidomide plus dexamethasone followed by early autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma on the ECOG-ACRIN E4A03 randomized clinical trial: long-term follow-up. *Blood Cancer J*. 2016;6(9):e466.
225. Cavo M, Palumbo A, Zweegman S, Dimopoulos M, Hajek R, Pantani L. Upfront autologous stem cell transplantation (ASCT) versus novel agent-based therapy for multiple myeloma (MM): a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM trial). *J Clin Oncol*. 2016;34:15.
226. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Facon T, Caillot D, Escoffre M, et al. Autologous transplantation for multiple myeloma in the era of new drugs: a phase III study of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM/DFCI 2009 Trial). *Blood*. 2015;126(23):391-.
227. Kastritis E, Zervas K, Symeonidis A, Terpos E, Delimbassi S, Anagnostopoulos N, et al. Improved survival of patients with multiple myeloma after the introduction of novel agents and the applicability of the International Staging System (ISS): an analysis of the Greek Myeloma Study Group (GMSG). *Leukemia*. 2009;23(6):1152-7.

Referencias de la Introducción

228. Lu J, Liu A, Fu W, Du J, Huang X, Chen W, et al. The Applicability of the International Staging System in Chinese Patients with Multiple Myeloma Receiving Bortezomib or Thalidomide-Based Regimens as Induction Therapy: A Multicenter Analysis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:856704.
229. Kapoor P, Fonseca R, Rajkumar SV, Sinha S, Gertz MA, Stewart AK, et al. Evidence for cytogenetic and fluorescence in situ hybridization risk stratification of newly diagnosed multiple myeloma in the era of novel therapies. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(6):532-7.
230. Kaufman GP, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi FK, Dingli D, et al. Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia*. 2016;30(3):633-9.
231. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, Mateos MV, Hernandez JM, Fernandez M, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*. 2007;21(1):143-50.
232. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(9):1467-73.
233. Jimenez-Zepeda VH, Duggan P, Neri P, Rashid-Kolvear F, Tay J, Bahlis NJ. Revised International Staging System Applied to Real World Multiple Myeloma Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016;16(9):511-8.
234. Kastiris E, Terpos E, Roussou M, Gavriatopoulou M, Migkou M, Eleutherakis-Papaiakovou E, et al. Evaluation of the Revised International Staging System (R-ISS) in an independent cohort of unselected patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2016.
235. Tandon N, Rajkumar SV, LaPlant B, Pettinger A, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Clinical utility of the Revised International Staging System in unselected patients with newly diagnosed and relapsed multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017;7(2):e528.
236. Walker I, Coady A, Neat M, Ladon D, Benjamin R, El-Najjar I, et al. Is the revised International staging system for myeloma valid in a real world population? *Br J Haematol*. 2016.
237. Cho H, Yoon DH, Lee JB, Kim SY, Moon JH, Do YR, et al. Comprehensive evaluation of the revised international staging system in multiple myeloma patients treated with novel agents as a primary therapy. 2017;92(12):1280-6.
238. Bataille R, Annweiler C, Beauchet O. Multiple myeloma international staging system: "staging" or simply "aging" system? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(6):635-7.
239. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martinez-Lopez 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(35):5775-82.
240. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(15):3139-46.
241. Majithia N, Rajkumar SV, Lacy MQ, Buadi FK, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. Early relapse following initial therapy for multiple myeloma predicts poor outcomes in the era of novel agents. *Leukemia*. 2016;30(11):2208-13.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Justificación e hipótesis de trabajo

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia clínicamente heterogénea en la que la identificación de factores pronósticos es fundamental para estimar una predicción del curso de la enfermedad en cada paciente, diseñar estrategias terapéuticas dirigidas a evitar la aparición de recaídas y, por tanto, a prolongar la supervivencia.

La evaluación pronóstica del MM a lo largo de la historia natural de la enfermedad requiere la utilización tanto de factores pronósticos presentes en el momento del diagnóstico como de marcadores dependientes del tiempo e influenciados por los tratamientos. En primer lugar, dado que la práctica totalidad de los MM están precedidos por gammapatías asintomáticas, adquiere gran relevancia la disponibilidad de marcadores pronósticos que permitan predecir el riesgo de progresión de mieloma asintomático o quiescente (MMQ) a MM. Por otro lado, en el momento del diagnóstico del MM, aunque se dispone de nuevos modelos que integran marcadores pronósticos relacionados con el paciente y la biología de la enfermedad, su aplicabilidad no está del todo consolidada. Finalmente, el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) es un eslabón fundamental de la estrategia de tratamiento de los pacientes jóvenes, pero la enfermedad sigue siendo incurable con aparición de recaídas postrasplante. Por ello, es necesaria una evaluación pronóstica dinámica que permita predecir el riesgo de recaída y de supervivencia en diferentes momentos postrasplante y que guíe la toma de decisiones clínicas, especialmente en el momento actual con la aprobación de estrategias de mantenimiento y de inmunoterapia.

Como se ha mencionado en la introducción, todos los MM están precedidos por entidades premalignas como la GMSI y el MMQ. El MMQ es una enfermedad heterogénea en la que se identifican diferentes grupos de pacientes de acuerdo al riesgo de progresión: bajo, intermedio, alto o muy alto. Los pacientes de riesgo alto tienen una probabilidad de progresar a MM a los 2 años del diagnóstico del 50%, mientras que en el grupo de riesgo muy alto la probabilidad de progresión a MM es superior al 80% a los 2 años. Este último grupo se considera MM según los nuevos

criterios diagnósticos de 2014 y se beneficia de recibir tratamiento antes de que aparezca daño orgánico o sintomatología CRAB. En este contexto, hay un interés creciente por identificar en el momento del diagnóstico del MMQ marcadores que permitan determinar con mayor exactitud el riesgo de progresión a MM. La presencia de cadena ligera monoclonal de las inmunoglobulinas o proteína de Bence Jones (BJ) en la orina es un marcador tumoral cuya determinación está estandarizada en todos los centros. Hasta ahora no se ha investigado el valor de la proteinuria de BJ como marcador pronóstico de progresión a MM. La confirmación de esta hipótesis supondría disponer de un parámetro cuantificado en la práctica clínica diaria, capaz de identificar pacientes con MMQ con riesgo alto de progresión a MM y por tanto, que precisen un seguimiento más frecuente o, incluso, con riesgo muy alto de progresión que requieran tratamiento activo de una manera precoz.

Por lo que respecta al MM, el modelo de estratificación pronóstica más utilizado en la práctica clínica en el momento del diagnóstico es el ISS. Sin embargo, fue elaborado en una serie de pacientes que no recibieron nuevos fármacos y, por ello, algunos grupos cuestionan actualmente su utilidad clínica. En 2015, el *International Myeloma Working Group* (IMWG) propuso el ISS revisado (R-ISS), un modelo de estimación de riesgo elaborado en un estudio que incluyó un gran número de pacientes de nuevo diagnóstico candidatos y no candidatos a TAPH tratados en ensayos clínicos. A diferencia del ISS, el R-ISS incorpora variables relacionadas con la biología de la célula tumoral y de valor pronóstico confirmado, como las alteraciones citogenéticas de alto riesgo y la LDH. Puesto que se trata de un modelo reciente, aún no ha sido ampliamente validado en la práctica clínica, especialmente en el contexto del TAPH y, lo que es más importante, aunque discrimina tres grupos de pacientes, la mayoría de ellos están en el grupo R-ISS II y hace que sólo sea posible identificar un pequeño grupo de pacientes en los que podamos predecir supervivencias extremas, tanto largas como cortas. Por tanto, es necesario investigar el grupo R-ISS II para intentar identificar diferentes subgrupos de

Justificación e hipótesis de trabajo

pacientes con un pronóstico más preciso. Para ello, se ha seleccionado una serie de pacientes tratados con nuevos fármacos y TAPH en centros de referencia para el MM como son la Clínica Mayo y el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, en los cuales se ha planteado validar el R-ISS e identificar pacientes dentro del grupo R-ISS II con diferente pronóstico.

En último lugar, dado que los pacientes jóvenes con MM siguen teniendo recaídas postrasplante, la definición de marcadores dinámicos que permitan identificar pacientes con mayor riesgo de recaída y corta supervivencia tras el TAPH es de gran interés. La inmunoparesia se define por el descenso de las inmunoglobulinas policlonales y se relaciona con una supresión reversible de los precursores de la célula B. Es una condición frecuente en el momento del diagnóstico del MM que se asocia con mal pronóstico, aunque no hay evidencia acerca de su prevalencia y significado tras el TAPH. Los resultados aportados por varios estudios apuntan a un impacto positivo de la recuperación inmune precoz y sostenida tras el TAPH. Sería esperable, por tanto, que tras el TAPH se produjera una recuperación de las Igs policlonales que retrasaría la aparición de recaídas y se asociaría a mejor pronóstico, y viceversa, la persistencia de inmunoparesia podría ser un marcador de disfunción inmune predictor de progresión tras el TAPH. Para comprobar esta hipótesis se ha utilizado la serie de pacientes con MM tratados en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca que es el centro de referencia de Castilla y León para la realización de TAPH desde los años 90.

OBJETIVOS

1. Determinar el papel de la proteinuria de Bence Jones en el mieloma asintomático (MMQ) como marcador pronóstico de progresión a mieloma sintomático (MM).
 - i. Identificar un potencial punto de corte de la proteinuria de BJ con valor pronóstico en el MMQ.
 - ii. Validar los modelos de estratificación pronóstica de la Clínica Mayo y el grupo Español de Mieloma (GEM) para el MMQ y establecer una comparación con la proteinuria de BJ como potencial factor pronóstico.

2. Validar el nuevo modelo de estratificación pronóstica R-ISS en una serie de pacientes con MM que hayan recibido nuevos fármacos en la inducción y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH).
 - i. Comparar la estratificación pronóstica realizada mediante el ISS con el nuevo R-ISS.
 - ii. Analizar el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas detectadas por HISF y su implicación en el nuevo modelo pronóstico.
 - iii. Identificar en el grupo R-ISS II subgrupos de pacientes con distinto pronóstico.

3. Evaluar el impacto pronóstico de la recuperación de las inmunoglobulinas policlonales en pacientes con MM en distintos momentos postrasplante autólogo.
 - i. Determinar la prevalencia, los determinantes y la dinámica de la recuperación de las inmunoglobulinas policlonales tras el TAPH en el MM.
 - ii. Validar otros factores pronósticos reconocidos en pacientes sometidos a TAPH.
 - iii. Analizar la eficacia del TAPH en términos de respuesta, supervivencia libre de progresión y supervivencia global.

RESULTADOS

5. **Trabajo 1. La proteinuria de Bence Jones en pacientes con mieloma asintomático como predictor de progresión a mieloma.**

**BENCE JONES PROTEINURIA IN SMOLDERING MULTIPLE MYELOMA
AS A PREDICTOR MARKER OF PROGRESSION
TO SYMPTOMATIC MULTIPLE MYELOMA**

Verónica González-Calle, Julio Dávila, Fernando Escalante, Alfonso García de Coca, Carmen Aguilera, Rosa López, Abelardo Báñez, José María Alonso, Roberto Hernández, José Mariano Hernández, Pilar de la Fuente, Noemí Puig, Enrique María Ocio, Norma Carmen Gutiérrez, Ramón García-Sanz y María Victoria Mateos.

Leukemia. 2016;30(10):2026-31.

5.1 Resumen trabajo 1

LA PROTEINURIA DE BENCE JONES EN PACIENTES CON MIELOMA ASINTOMÁTICO COMO PREDICTOR DE PROGRESIÓN A MIELOMA.

INTRODUCCIÓN: El mieloma múltiple asintomático (MMQ) representa un estadio intermedio entre la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y el mieloma sintomático (MM), con un riesgo de progresión a MM de 10% al año. Este riesgo no es homogéneo: algunos pacientes tienen un riesgo de progresión similar a la GMSI, 1% por año, mientras que otros tienen un riesgo de progresión alto, 10% por año. Modelos como el de la Clínica Mayo o el del grupo español de Mieloma, elaborados en series prospectivas y validados en un ensayo clínico fase 3, permiten identificar pacientes de alto riesgo, con un 50% de probabilidad de progresión a MM en los 2 años desde el diagnóstico. La proteinuria de Bence Jones (BJ), definida por la presencia de cadena ligera de las inmunoglobulinas clonales en la orina, se asocia con la carga tumoral; sin embargo, no hay evidencia clara sobre su papel pronóstico en pacientes con MMQ en el momento del diagnóstico.

OBJETIVOS: 1) Investigar si la presencia de proteinuria BJ en pacientes con MMQ predice la progresión a MM. 2) En tal caso, establecer un potencial punto de corte de la cantidad de proteinuria de BJ con valor pronóstico. 3) Validar en dicha serie los modelos predictivos de riesgo propuestos por la Clínica Mayo y el grupo español de Mieloma.

MÉTODOS: En colaboración con el grupo de Gammapatías Monoclonales de Castilla y León se realizó un estudio retrospectivo que consistió en una revisión sistemática de datos clínico-biológicos de los pacientes diagnosticados de MMQ en Castilla y León, y Plasencia, de forma consecutiva entre los años 1986 y 2013. El objetivo primario fue el tiempo hasta la progresión (TTP), definido como el tiempo desde el diagnóstico hasta la progresión a MM sintomático, que se estableció por la aparición de sintomatología CRAB según los criterios diagnósticos de 2003. El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS: 152 pacientes con MMQ procedentes de Castilla y León y Plasencia fueron incluidos en este estudio. En 41 pacientes (27%) se detectó proteinuria de BJ al diagnóstico, de ellos 24 (58%) presentaron BJ tipo kappa y los restantes 17 (42%) tipo lambda. La mediana de concentración de proteinuria de BJ fue 100 mg en 24h y 7 pacientes presentaron ≥ 500 mg en 24h. Un total de 36 pacientes (24%) tenían un MMQ de alto riesgo de acuerdo a los criterios de la Clínica Mayo y 58 pacientes (40%) según los criterios del grupo español.

Con una mediana de seguimiento de 65 meses, la mediana de TTP de la serie global fue 68 meses, con una probabilidad de progresión a 5 años del 49%. Dentro del grupo de pacientes con proteinuria de BJ al diagnóstico (n=41), 24 progresaron, con una mediana de TTP significativamente más corta que los pacientes sin proteinuria de BJ: 21,7 meses vs. 88,3 meses (HR: 2,3; IC 95%: 1,4 - 3,4; P=0,002), lo que se tradujo en un riesgo de progresión a 2 años del 51%. Al analizar si la cantidad de proteinuria de BJ diferenciaba subgrupos de pacientes con distinto riesgo de progresión, se objetivó que aquellos con ≥ 500 mg en 24h presentaban una mediana de TTP de 13,3 meses (HR: 2,4; IC 95%: 1,6 - 3,6; P<0,001), y tenían una probabilidad de progresión a 18 meses del 80%. En el análisis univariante de la serie se validaron los criterios de MMQ de alto riesgo de la Clínica Mayo y del grupo español. Además, en el análisis multivariante, la presencia de proteinuria de BJ al diagnóstico fue también un factor pronóstico independiente para predecir progresión a MM (HR: 2,3; IC 95%: 1,4-3,9; P<0,001).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: En esta serie de pacientes con MMQ, la proteinuria de BJ se detectó en casi el 30% de los pacientes al diagnóstico. La proteinuria de BJ se asoció de forma independiente con un riesgo aumentado de progresión a MM, similar al de los MMQ de alto riesgo según los criterios de la Clínica Mayo y el grupo español: 51% de riesgo de progresión a 2 años. En los pacientes con una excreción de proteína de BJ de al menos 500 mg al día, la mediana de tiempo hasta la progresión fue de poco más de 1 año, pudiendo, por tanto, identificar un subgrupo de pacientes con riesgo inminente de desarrollar MM.

Si estos resultados fueran validados en estudios prospectivos se podría considerar la proteinuria de BJ como un marcador que permite la identificación de pacientes con MMQ que tienen un alto riesgo de progresión a MM y, que la detección de al menos 500 mg de proteinuria de BJ al día ayudaría en la identificación de pacientes con riesgo de progresión muy alto, y por tanto, candidatos a recibir tratamiento precoz para el MM.

ORIGINAL ARTICLE

Bence Jones proteinuria in smoldering multiple myeloma as a predictor marker of progression to symptomatic multiple myeloma

V González-Calle¹, J Dávila¹, F Escalante², AG de Coca³, C Aguilera⁴, R López⁵, A Báñez⁶, JM Alonso⁷, R Hernández⁸, JM Hernández⁹, P de la Fuente¹⁰, N Puig¹, EM Ocio¹, NC Gutiérrez¹, R García-Sanz¹ and MV Mateos¹

The diagnosis of smoldering multiple myeloma (SMM) includes patients with a heterogeneous risk of progression to active multiple myeloma (MM): some patients will never progress, whereas others will have a high risk of progression within the first 2 years. Therefore, it is important to improve risk assessment at diagnosis. We conducted a retrospective study in a large cohort of SMM patients, in order to investigate the role of Bence Jones (BJ) proteinuria at diagnosis in the progression to active MM. We found that SMM patients presenting with BJ proteinuria had a significantly shorter median time to progression (TTP) to MM compared with patients without BJ proteinuria (22 vs 88 months, respectively; hazard ratio = 2.3, 95% confidence interval = 1.4–3.9, $P = 0.002$). We also identified risk subgroups based on the amount of BJ proteinuria: ≥ 500 mg/24 h, < 500 mg/24 h and without it, with a significantly different median TTP (13, 37 and 88 months, $P < 0.001$). Thus, BJ proteinuria at diagnosis is an independent variable of progression to MM that identifies a subgroup of high-risk SMM patients (51% risk of progression at 2 years) and ≥ 500 mg of BJ proteinuria may allow, if validated in another series, to reclassify these patients to MM requiring therapy before the end-organ damage development.

Leukemia (2016) 30, 2026–2031; doi:10.1038/leu.2016.123

INTRODUCTION

Smoldering multiple myeloma (SMM) is a plasma cell disorder characterized by the presence of one or both of the features of ≥ 3 g/dl serum M-protein¹ and 10–60% bone marrow plasma cells (BMPCs), but with no evidence of myeloma-related symptomatology (hypercalcemia, renal insufficiency, anemia or bone lesions (CRAB)) or any other myeloma-defining event.²

SMM represents an intermediate stage between monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma (MM), with a risk of progression to MM that is not uniform. In order to predict the probability of developing active disease at the moment of SMM diagnosis, several risk models have been developed; most of them include factors related to tumor burden. Two risk models, one proposed by the Mayo Clinic group³ and the other by the Spanish Myeloma group,⁴ have been thoroughly studied and validated in a prospective trial. The first one is based on the proportion of BMPCs and the serum M-protein level at diagnosis and identified a high-risk SMM group (serum M-protein ≥ 3 g/dl and BMPCs $\geq 10\%$) with a median time to progression (TTP) of 2 years. Similarly, the Spanish Group based on two parameters, the presence of $> 95\%$ phenotypically aberrant plasma cells by flow cytometry and the occurrence of immunoparesis identified a high-risk SMM group with a TTP of ~ 2 years.

In addition, several independent studies showed that patients with any other of recently defined myeloma-defining event ($\geq 60\%$ BMPCs, a serum free light chains (FLCs) ratio of ≥ 100 or the presence of two or more focal lesions of the skeleton as revealed by magnetic resonance imaging) are at ultra-high risk of progression to MM (80–90% at 2 years) and therefore they should be considered and treated as active MM patients, instead of therapeutic abstention.²

Bence Jones (BJ) proteinuria is a myeloma feature defined by the presence of monoclonal immunoglobulin light chains in the urine. The kidney regulates light-chain balance by a poorly understood mechanism,⁵ in which monoclonal light chains are freely filtered across the glomerulus and then reabsorbed at the proximal tubules. However, the reabsorptive function is compromised when there is overproduction, resulting in monoclonal light-chain excretion and detectable BJ proteinuria. Based on this, we hypothesized that BJ proteinuria is related with tumor burden⁶ and could predict transformation to symptomatic MM, similar to other myeloma features mentioned above.

The purpose of this study was to examine the impact of BJ proteinuria on the risk of progression to MM in a well-defined cohort of patients with SMM. We show in this study that the presence of BJ proteinuria in SMM identifies a subgroup at high risk of progression to MM.

¹Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ²Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain; ³Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain; ⁴Hospital del Bierzo, Ponferrada, Spain; ⁵Hospital Virgen Del Puerto, Plasencia, Spain; ⁶Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Ávila, Spain; ⁷Complejo Asistencial Universitario de Palencia, Palencia, Spain; ⁸Complejo Asistencial de Zamora, Zamora, Spain; ⁹Complejo Asistencial de Segovia, Segovia, Spain and ¹⁰Complejo Asistencial Universitario de Burgos, Burgos, Spain. Correspondence: Professor MV Mateos, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo San Vicente 58-182, Salamanca 37007, Spain.

E-mail: mvmateos@usal.es

Received 22 February 2016; revised 7 April 2016; accepted 12 April 2016; accepted article preview online 2 May 2016; advance online publication, 27 May 2016

PATIENTS AND METHODS

Study cohort

Patients were identified by searching a regional database from Castilla-León, a western region of Spain, and reviewing the medical records of all patients diagnosed with SMM between 1986 and 2013, according to the International Myeloma Working Group criteria established in 2003,¹ in whom BJ proteinuria was available at the time of diagnosis. All patients had $\geq 10\%$ BMPCs and/or ≥ 3 g/dl of serum M-protein, but did not have CRAB symptoms. Patients with SMM included in the database and allocated to the experimental arm (lenalidomide plus low-dose dexamethasone) in the phase 3 trial conducted by the Spanish Myeloma Group were excluded.⁷ The study was approved by the Institutional Review Board at University Hospital of Salamanca and in accordance with the Declaration of Helsinki.

Clinical and biological data were collected at diagnosis and at the time of progression to MM, or last monitoring if progression to MM had not occurred.

Methodology

BJ proteinuria was analyzed at diagnosis by capillary electrophoresis and immunotyping a 24-h collection sample and a concentrated urine sample. This process involves quantifying total urinary proteins by a nephelometric method and protein separation by capillary electrophoresis. When a monoclonal spike was detected in the urine protein electrophoresis, the sample was overlaid with two monospecific antibodies, anti- κ and anti- λ in the immunotyping assay to identify the κ - or λ -chain. The UV absorption method was then used to determine its concentration and to calculate the amount of BJ excreted in a 24-h period. The measurement of monoclonal BJ proteinuria has been considered for our analysis.

Immunophenotypic analysis was performed by highly trained specialists. Percentage of aberrant plasma cells is the total number of clonal plasma cells within the total plasma cell compartment and it was evaluated as described in Pérez-Persona *et al*.⁴

Fluorescence *in situ* hybridization analysis was performed in some BM samples at diagnosis for clinical or investigational purposes. Fluorescence *in situ* hybridization studies included the detection of the *IGH* rearrangements t(4;14)(p16;q32) and t(14;16)(q32;q23) with the corresponding dual-color, dual-fusion translocation probes and 17p deletions (LSI p53, 17p13.1) (Abbott Molecular/Vysis, Des Plaines, IL, USA).

The serum FLC assay (Freelite, Binding Site, Birmingham, UK) was performed following the principles of turbidimetry. Absolute FLC κ (normal range, 0.33–1.94 mg/dl) and FLC λ (normal range, 0.57–2.63 mg/dl) were measured and clonality was assessed as FLC κ/λ . A FLC ratio < 0.26 or > 1.65 was considered abnormal.

End points and statistical analyses

TTP was taken as the time from diagnosis until progression to MM, defined by the presence of CRAB symptoms. TTP and overall survival were considered the primary and secondary end points of the study, respectively. The χ^2 , Student's *t*- and Mann–Whitney *U*-tests were used to estimate the statistical significance of group differences. Survival curves were plotted according to the Kaplan–Meier method, using the log-rank test to determine the statistical significance of differences between the curves. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Effects of potential risk factors of progression were analyzed in a Cox proportional hazards model. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp..

RESULTS

Patient characteristics

A total of 152 SMM patients were included in the study. The baseline characteristics are summarized in Table 1. There were 72 (47%) men and 80 (53%) women. The median age at diagnosis was 70 years (range, 35–90 years). The concentration of serum M-protein at diagnosis ranged from 0.1 to 6.6 g/dl (median, 2.5 g/dl); 56 patients (37%) had concentrations higher than 3 g/dl. The heavy chain isotype was IgG in 105 patients (69%) and IgA in 31%. The proportion of BMPCs ranged from 1 to 55% (median, 14%); 124 patients (83%) had $\geq 10\%$ plasma cell bone marrow infiltration.

BJ proteinuria, the monoclonal part, was evaluated in all patients at diagnosis and detected in 41 patients (27%). The median level was 100 mg/24 h in patients with positive proteinuria. Of those patients, 24 (58%) and 17 (42%) featured a κ and a λ light chain, respectively. Seven patients (17%) had at least 500 mg/24 h. One of them did not express serum heavy–light chain, which is considered as light-chain smoldering myeloma κ .

Table 1. Baseline characteristics SMM patients

Baseline patient characteristics	SMM (n = 152)	SMM BJ+ (n = 41)	SMM BJ– (n = 111)	P-values
Male/ female, no. (%)	80 (53)/72 (47)	21 (51)/20 (49)	51 (46)/60 (54)	NS
Age, median year (range)	70 (35–90)	71 (43–89)	69 (35–90)	NS
<i>Heavy chain type</i>				
IgG, no. (%)	105 (69)	21 (53)	85 (76)	0.005
IgA, no. (%)	46 (31)	19 (46)	26 (24)	
<i>Light chain type</i>				
κ , no. (%)	92 (61)	25 (61)	67 (60)	NS
λ , no. (%)	60 (39)	16 (39)	44 (40)	
Serum M-protein, median g/dl (range)	2.5 (0.1–6.6)	2.4 (0.3–6.6)	2.6 (0.1–5.0)	NS
Serum M-protein ≥ 3 g/dl, no. (%)	56 (37)	14 (34)	42 (38)	NS
Presence of BJ proteinuria, no. (%)	41 (27)	—	—	—
BJ protein g/24 h, median (range)	0 (0–2.60)	0.1 (0.006–2.6)	—	—
% BMPC by morphology, mean (s.d.)	17 (10)	23 (12)	14 (8)	0.001
$\geq 10\%$ BMPC, no. (%)	124 (82.7)	37 (90)	87 (80)	NS
Immunoparesis, no. (%) ^a	72 (49.7)	24 (63)	48 (45)	0.05
$\geq 95\%$ aPC, no. (%) ^b	99 (69.7)	27 (73)	72 (68.6)	NS
High-risk Mayo Clinic Criteria, no. (%)	36 (24)	12 (29)	24 (22)	NS
High-risk Spanish Criteria, no. (%)	58 (38)	19 (47.5)	37 (33)	0.04
Abnormal serum FLC ratio (< 0.26 or > 1.65), no. (%) ^c	15 (83)	7 (100)	8 (72)	NS

Abbreviations: aPC, aberrant plasma cells by flow cytometry; BJ+, SMM patients who had BJ proteinuria at diagnosis; BJ–, SMM patients without BJ proteinuria at diagnosis; BMPC, bone marrow plasma cell; FLC, serum free light chain; High-risk Mayo Clinic Criteria, serum M-protein ≥ 3 g/dl+BMPC $\geq 10\%$; High-risk Spanish Criteria: aPC $\geq 95\%$ +immunoparesis; NA, not available; NS, not significant; SMM, smoldering multiple myeloma; ^aImmunoglobulins not available in seven patients. ^bNot available in 10 patients. ^cFLCs available in 18 patients.

Bone marrow aspirate was performed in all patients but none had a plasma cell infiltration higher than 60%. Serum FLC ratio was done in 18 patients and it was abnormal (< 0.26 or > 1.65) in 15 (83%) of them, only 3 cases over 100. Magnetic resonance imaging was not performed in our patients, so it is not possible to exclude patients at ultra-high risk of progression according to the presence of focal lesions.

Three patients had a normal serum FLC ratio, none of whom had BJ proteinuria. Among the patients with an abnormal FLC ratio, 47% had BJ proteinuria and 53% did not ($P=0.13$). As we mentioned above, the FLC ratio was > 100 in three patients: 2 of them had BJ proteinuria, both of which were κ -type and with < 0.100 g/24 h; BJ proteinuria was not present in the other patient.

Fluorescence *in situ* hybridization results at diagnosis were available for 41 patients, 4 of whom (9.8%) were thereby classified as having high-risk cytogenetic abnormalities: 3 had $t(4;14)$ and only one had $del 17p$.

One hundred and fifty and 145 patients were evaluated according to the Mayo Clinic and Spanish model, respectively. Applying the first risk model, we identified 36 (24%) high-risk SMM patients with serum M-protein > 3 g/dl and $> 10\%$ of BMPCs, whereas 58 patients (40%) were considered high-risk SMM according to the Spanish criteria.

Outcome

The median follow-up for survivors was 65 months (range, 0.4–199.8 months). Seventy-three patients (48%) progressed to MM during this period with a median TTP of 68 months (95% confidence interval (95% CI)=42.0–93.6 months). The probability of progression to MM at 5 years was 49%. Half of the SMM patients died during this period. The median overall survival in the whole series was 7.6 years (95% CI=6.7–8.5years), but it was significantly shorter for SMM patients who had progressed to MM (6.3 years; 95% CI=5.4–7.2 years), in comparison with those who remained free of progression (15.6 years; 95% CI=6.7–24.5years) ($P < 0.0001$). In the group of SMM patients who progressed to MM and died, MM was the most frequent cause of death (60%), followed by disease-related events, such as infection (15%) or toxicity(10%). There were 29 patients (19%) who died before progression, due to causes unrelated to the disease (cardiac and respiratory disease, thrombosis, stroke, traffic accident and so on).

Interestingly, 24 out of 41 patients (58.8%) with SMM and BJ proteinuria (BJ+ group) progressed to MM, with a significantly higher probability of progression than patients without BJ proteinuria (BJ– group), with a median TTP of 21.7 versus 88.3 months, respectively (hazard ratio (HR) = 2.3, 95% CI= 1.4–3.9,

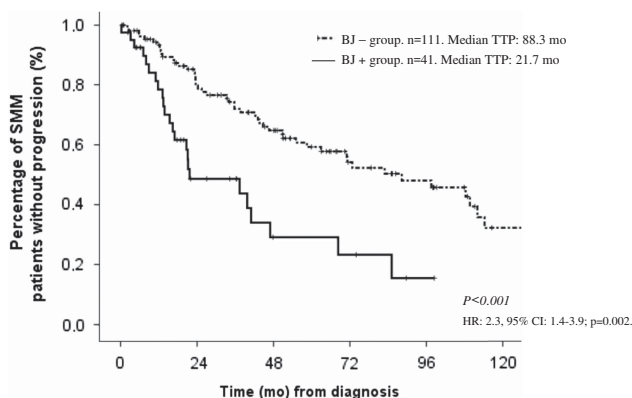


Figure 1. TTP in months from diagnosis of SMM, according to the presence or absence of BJ proteinuria.

$P=0.002$) (Figure 1). The probability of progression to MM at 2 years in the BJ+ and BJ– groups was 51% and 22%, respectively. Although there were higher levels of SMM IgA and immunoparesis in the BJ+ group, there were no significant differences in baseline characteristics between these two groups (Table 1). BJ proteinuria was significantly associated with BMPC infiltration ($P=0.001$). Anemia was the most common CRAB feature at the time of progression in the BJ+ group, being present in 38 patients (52%). Only one patient progressed with renal impairment (RI) that had > 500 mg/24 h of κ -light chain proteinuria.

During the period studied, 21 of the 41 patients in the BJ+ group (51%) and 57 of the 111 patients in the BJ– group (51%) had died ($P=0.89$); the median overall survival was longer for the BJ– than the BJ+ group (8 vs 6 years; $P=0.053$) (HR = 1.64, 95% CI = 0.99–2.73, $P=0.055$) (Figure 2).

To determine whether the amount of BJ proteinuria could enable SMM patients to be categorized into risk subgroups, we investigated several cutoff values. Interestingly, the 500 mg/24 h cutoff value identified three risk subgroups, with a significantly different probability of progression to symptomatic myeloma: 111 patients did not have BJ proteinuria, 34 had < 500 mg/24 h and 7 had > 500 mg/24 h, with median TTP of 88, 37 and 13 months, respectively (HR=2.4, 95% CI = 1.6–3.6, $P < 0.001$) (Figure 3). The probability of progression to MM at 18 months in those patients with > 500 mg/24 h of BJ proteinuria was 80%.

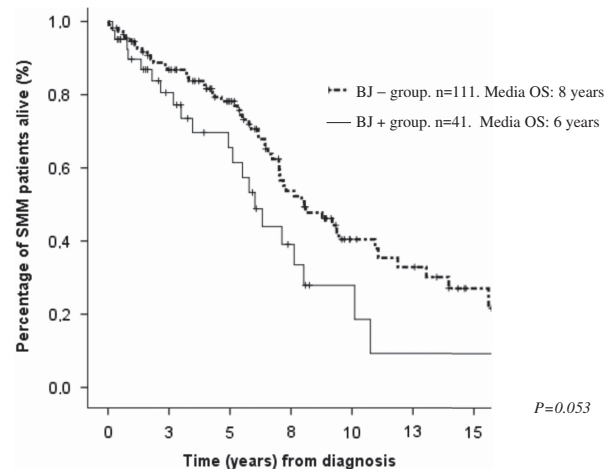


Figure 2. Overall survival in years since diagnosis of SMM according to the presence or absence of BJ proteinuria.

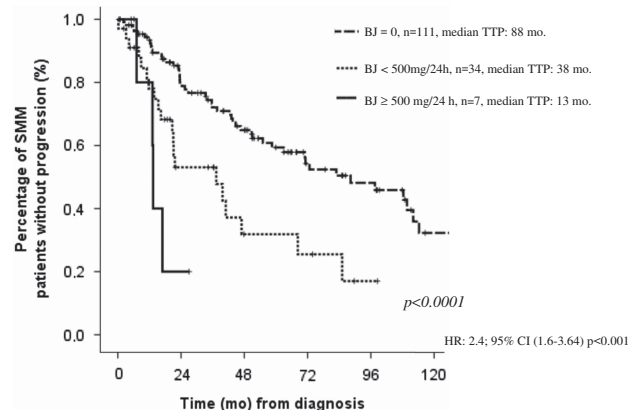


Figure 3. TTP in months from diagnosis of SMM; comparison of BJ groups by amount of BJ proteinuria.

Table 2. Univariate and multivariate analysis

Variable	n (%)	TTP				OS	
		Median (months)	Univ. P-value	Multivariate		Median (years)	Univ. P-value
				HR (95%)	P-value		
Sex							
Male	72 (47)	71	NS	—	—	7.0	NS
Female	80 (53)	68				8.0	
Age (years)							
≥ 65	106 (70)	83	NS	—	—	9.5	0.01
< 65	46 (30)	47				7.1	
Isotype							
IgA	46 (31)	68	NS	—	—	7.1	NS
IgG	105 (69)	71				7.9	
Light chain							
κ	92 (61)	51	0.03	1.60 (0.97–2.63)	0.07	7.9	NS
λ	60 (39)	88				7.0	
Serum M-protein							
≥ 3 g/dl	56 (37)	36	0.005	—	—	7.1	NS
< 3 g/dl	96 (63)	88				7.6	
BJ proteinuria							
Yes	41 (27)	22	< 0.001	2.3 (1.38–3.94)	0.002	6.0	0.05
No	111 (73)	88				8.1	
BMPC							
≥ 10%	124 (83)	55	0.03	—	—	7.3	NS
< 10%	26 (17)	150				7.0	
NA	2						
Immunoparesis							
Yes	72 (50)	51	0.004	—	—	7.0	NS
No	73 (50)	98				9.2	
NA	7						
aPC							
≥ 95%	99 (70)	47	0.004	—	—	7.2	NS
< 95%	43 (30)	98				7.9	
NA	10						
High-risk Mayo Clinic Criteria							
Yes	36 (24)	23	< 0.001	3.36 (2.04–5.52)	< 0.001	7.0	NS
No	114 (75)	108				7.6	
NA	2						
High-risk Spanish Criteria							
Yes	58 (42)	36	< 0.001	1.87 (1.15–3.03)	0.012	7.0	NS
No	88 (58)	85				8.0	
NA	7						
sFLC ratio							
Abnormal	15 (83)	24	0.19	—	—	NR	NS
Normal	3 (17)	NR				3.3	
NA	134						
Cytogenetic risk							
High	4 (10)	15	0.79	—	—	6.0	NS
Standard	37 (90)	33				7.0	
NA	111						

Abbreviations: aPC, aberrant plasma cells by flow cytometry; BJ, Bence Jones; BMPC, bone marrow plasma cell; FLC, serum free light chains; High-risk Mayo Clinic Criteria, serum M-protein ≥ 3 g/dl+BMPC ≥ 10%; High-risk Spanish Criteria, aPC ≥ 95%+immunoparesis; HR, hazard ratio; mo, months; NA, not available; NR, not reached; NS, not significant; OS, overall survival; SMM, smoldering multiple myeloma; TTP, time to progression; Univ., univariate analysis. Markers of progression and survival among 152 patients with SMM.

Additional risk factors for progression to MM were identified in the univariate analysis (Table 2): serum M-protein concentration >3 g/dl ($P=0.005$); BMPCs $\geq 10\%$ ($P=0.03$), κ -light chain ($P=0.03$); and the Mayo Clinic and Spanish criteria of high-risk SMM (both $P < 0.001$). Sex, IgA subtype, International Staging System, abnormal FLC ratio and high-risk cytogenetics were not significantly associated with progression.

One hundred and forty-two patients were included in the multivariate analysis and BJ proteinuria at diagnosis was selected as an independently significant variable for progression to MM (HR = 2.33, 95% CI = 1.39–3.94, $P=0.002$). The features evaluated in the Mayo Clinic and Spanish risk models were both validated as independent risk factors for progression. Of the Mayo Clinic criteria for high-risk SMM, the median TTP was 23 months, with a HR of progression of 3.36 (95% CI = 2.13–5.34, $P < 0.001$), whereas the median TTP in patients with $\geq 95\%$ aberrant plasma cells plus immunoparesis was 36 months (HR = 1.87, 95% CI = 1.15–3.03, $P=0.012$) (Table 2).

DISCUSSION

We report that BJ proteinuria in SMM can be useful for defining the risk of progression to MM and can identify a subgroup of high risk of progression to active disease. The study was conducted in a large and representative series of 152 smoldering myeloma patients. The proportion of high-risk patients, using Mayo Clinic criteria, was similar to the 29% found in the Swedish Myeloma Registry.⁸ Moreover, the risk of transformation of SMM to symptomatic MM at 5 years was 50%, the same level reported by the Mayo Clinic in 2007.³

BJ proteinuria could be considered as a tumor burden marker, which is significantly associated with BMPC infiltration in our series and allowed the two SMM groups to be discriminated with significantly different risks of progression to symptomatic myeloma. Patients with BJ proteinuria had twice the risk of progression as those without it, with a <2 -year median TTP compared with 7 years in the BJ– group. The cumulative probability of progression to active MM was 51% at 2 years; thus, compared with the aforementioned studies, SMM patients with BJ proteinuria should also be considered as a high-risk SMM group. In our study, the detection of >500 mg/24 h of BJ proteinuria also identified patients with a higher risk of progression, that is, 80% at 18 months, which means that they can be classified as ultra-high risk SMM patients, even though they could be considered as having active MM. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate BJ proteinuria in the setting; therefore, these results need to be validated and confirmed in other independent studies.

BJ proteinuria may not have been evaluated in SMM, because this can be done by the FLC assay instead. However, according to the International Myeloma Working Group guidelines, 24-h urine protein electrophoresis and immunofixation should not be replaced by the serum FLC assay for the diagnosis of monoclonal gammopathies. Even in the recently updated MM diagnostic criteria,² BJ evaluation is still recommended for diagnosing light-chain smoldering myeloma defined by monoclonal light-chain excretion of ≥ 0.5 g/24 h without immunoglobulin heavy-chain expression and/or $>10\%$ BMPCs in the absence of CRAB symptoms, with slower clinical course and progression than SMM.⁹ In addition, we consider it necessary to perform both analyses at diagnosis for several reasons: to avoid misdiagnosing other important disorders such as nephrotic syndrome as a consequence of primary amyloidosis; to ensure adequate monitoring;¹⁰ due to the power of the level of proteinuria to predict the development of RI;¹¹ and finally, as the correlations between serum FLC and BJ proteinuria are not concordant among studies. Some of them^{12–14} have shown that the urine BJ protein screening test is no longer necessary, because the FLC assay plus

serum immunofixation has a sensitivity of up to 99%, although almost 15% of BJ proteinuria cases had a normal serum FLC ratio in the Mayo Clinic¹² and British studies.¹³ In a prospective study,¹⁵ 7% of patients with BJ proteinuria at diagnosis had a normal serum FLC ratio ($P < 0.0001$). In a European study,¹⁶ BJ proteinuria was detected in 34 out of 483 patients, 25% of whom had normal serum FLC ratio. Moreover, in a different study,¹⁷ 30% of patients with small amounts of BJ proteinuria had normal ratios and 40% of patients with ≥ 500 mg urine protein/24 h had normal FLC ratios, suggesting that replacement of the 24-h urine collection would have overlooked clinically significant proteinuria in those cases.

The presence of a high FLC ratio has been included in the new definition of MM, supported by two studies. However, a recent Danish population-based cohort study of 321 newly diagnosed SMM patients was unable to confirm the association with the high FLC ratio¹⁷, whereas Waxman *et al.*¹⁸ found that a high FLC ratio was associated with a low (64%) risk of progression to MM.

In addition, although the FLC assay makes a great contribution at diagnosis, monitoring and prognosis, because of its greater specificity, technical limitations have also been identified, such as: variable immunoreactivity of individual FLC, with a coefficient of variability up to 20% due to variation between antisera sera,¹⁹ underestimation of κ -FLC if there is an excess of antigen,²⁰ FLC levels depend on renal function and so on.

Moreover, urine protein analysis is a cheap and easily available procedure in most of biochemistry laboratories. Its sensitivity is influenced by the methods of urine collection, protein quantification and separation, the concentration of urine, interferences caused by salts and other compounds, and the immunotyping method used. In spite of the problems with the urine protein analysis, the procedure is well standardized in most hospitals and patients are trained in how to collect 24-h urine samples. To increase the sensitivity, concentration and dialysis are performed to eliminate salts from urine. Despite this, we could not avoid inter-laboratory and historical differences.

Another consideration is that 27% of smoldering myeloma patients in our series had BJ proteinuria at diagnosis, with no RI, and only one case had RI at progression, which corresponds to one patient with >500 mg of κ BJ proteinuria at diagnosis. The explanation for these results could be that the risk of cast nephropathy seems to be directly related not only to the amount of urinary light chain but also with the type (κ or λ) and biochemical characteristics conferred by variable nephrotoxic potential.²¹ In addition, the incidence of RI at the time of progression in our series was very low (6%). There is no data about the presence of specific features in SMM predicting RI as myeloma-related symptomatology and in another series in which proteinuria or serum FLC were evaluated^{22,23} there was no relationship reported. One possible explanation is the closer follow-up for these patients contributing to detect progression to MM in earlier stages before RI is established.

In conclusion, the presence of BJ proteinuria at diagnosis of SMM patients is associated with a significantly higher probability of progression to symptomatic MM. Detection of BJ proteinuria may help identify high-risk patients, as they had a 51% probability of progression at 2 years. Moreover, the presence of ≥ 500 mg/24h of BJ proteinuria can be considered to be a marker for the identification of ultra-high-risk SMM; even if these results were confirmed in other studies, this may allow to reclassify these patients to MM requiring therapy before the end-organ damage development.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the investigators and patients for their participation in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MVM conceived the idea and together with VGC designed the study. VGC, JD, FE, AGC, CA, RL, AB, JMA, RH, JMH and PF provided the data acquisition. VGC and MVM developed the analysis and interpretation of data. VGC drafted the article under the supervision of MVM. MVM, NP, EMO, NG and RGS revised it critically and gave final approval of the version to be submitted. All authors of this paper have read and approved the final version submitted.

REFERENCES

- Kyle RA, Child JA, Anderson K, Barlogie B, Bataille R, Bensinger W *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* 2003; **121**: 749–757.
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV *et al*. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; **15**: 538–548.
- Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM *et al*. Clinical course and prognosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; **356**: 2582–2590.
- Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG *et al*. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007; **110**: 2586–2592.
- Leung N, Behrens J. Current approach to diagnosis and management of acute renal failure in myeloma patients. *Adv Chron Kidney Dis* 2012; **19**: 297–302.
- Durie BG, 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* 1975; **36**: 842–854.
- Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L *et al*. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 2013; **369**: 438–447.
- Kristinsson SY, Holmberg E, Blimark C. Treatment for high-risk smoldering myeloma. *N Engl J Med* 2013; **369**: 1762–1765.
- Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Melton LJ, Benson JT *et al*. Clinical course of light-chain smoldering multiple myeloma (idiopathic Bence Jones proteinuria): a retrospective cohort study. *Lancet Haematol* 2014; **1**: 28–36.
- López-Corral L, García-Sanz R, San Miguel JF. Value of serum free light chains assay in plasma cell disorders. *Med Clin (Barc)* 2010; **135**: 368–374.
- Singhal S, Stein R, Vickrey E, Mehta J. The serum-free light chain assay cannot replace 24-hour urine protein estimation in patients with plasma cell dyscrasias. *Blood* 2007; **109**: 3611–3612.
- Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA, Snyder MR, Plevak MF, Larson DR *et al*. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc* 2006; **81**: 1575–1578.
- Hill PG, Forsyth JM, Rai B, Mayne S. Serum free light chains: an alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2006; **52**: 1743–1748.
- Abraham RS, Clark RJ, Bryant SC, Lymp JF, Larson T, Kyle RA *et al*. Correlation of serum immunoglobulin free light chain quantification with urinary Bence Jones protein in light chain myeloma. *Clin Chem* 2002; **48**: 655–657.
- Nowrouzian MR, Brandhorst D, Sammet C, Kellert M, Daniels R, Schuett P *et al*. Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 8706–8714.
- Beetham R, Wassell J, Wallage MJ, Whiteway AJ, James JA. Can serum free light chains replace urine electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies? *Ann Clin Biochem* 2007; **44**: 516–522.
- Sørrig R, Klausen TW, Salomo M, Vangsted AJ, Østergaard B, Gregersen H *et al*. Smoldering multiple myeloma risk factors for progression: a Danish population-based cohort study. *Eur J Haematol* 2015; e-pub ahead of print 29 December 2015; doi:10.1111/ejh.12728.
- Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, Cohen A, Vogl DT, Stadtmauer EA *et al*. Classifying ultra-high risk smoldering myeloma. *Leukemia* 2015; **29**: 751–753.
- Tate JR, Mollee P, Dimeski G, Carter AC, Gill D. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin Chim Acta* 2007; **376**: 30–36.
- Tate Daval S, Tridon A, Mazon N, Ristori JM, Evrard B. Risk of antigen excess in serum free light chain measurements. *Clin Chem* 2007; **53**: 1985–1986.
- Solomon A, Weiss DT, Kattine AA. Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins. *N Engl J Med* 1991; **324**: 1845–1851.
- Weber DM, Dimopoulos MA, Mouloupoulos LA, Delasalle KB, Smith T, Alexanian R. Prognostic features of asymptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997; **97**: 810–814.
- Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J *et al*. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* **111**: 785–789.

6. **Trabajo 2. Evaluación del modelo pronóstico R-ISS en pacientes con mieloma múltiple candidatos a trasplante autólogo.**

**EVALUATION OF REVISED INTERNATIONAL STAGING SYSTEM (R-ISS)
FOR TRANSPLANT-ELIGIBLE MULTIPLE MYELOMA PATIENTS**

Verónica González-Calle; Abigail Slack; Niamh Keane; Susan Luft; Kathryn E. Pearce; Rhett P. Ketterling; Tania Jain; Sintosebastian Chirackal; Craig Reeder; Joseph Mikhael; Pierre Noel; Angela Mayo; Roberta H. Adams; Gregory Ahmann; Esteban Braggio; Keith A. Stewart; Leif Bergsagel; Scott A. Van Wier; Rafael Fonseca.

Publicado *online* en *Annals of Hematology* el 6 de abril de 2018.

doi: 10.1007/s00277-018-3316-7

6.1 Resumen trabajo 2

EVALUACIÓN DEL MODELO PRONÓSTICO R-ISS EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE CANDIDATOS A TRASPLANTE AUTÓLOGO.

INTRODUCCIÓN: El *International Myeloma Working Group* (IMWG) propuso en 2015 un nuevo modelo de estratificación pronóstica, el ISS revisado o R-ISS ¹⁶⁹, que combina el ISS con los valores de LDH, así como con la presencia de las siguientes alteraciones citogenéticas de alto riesgo (CTG AR): (t(4;14), t(14;16) y del(17p). Este modelo se construyó basado en los análisis realizados en una serie de más de 3.000 pacientes candidatos y no candidatos a trasplante autólogo (TAPH) incluidos en estudios prospectivos controlados. Dada su reciente publicación, este modelo no ha sido ampliamente validado en pacientes tratados con TAPH fuera de ensayo clínico.

OBJETIVO: Validar el nuevo modelo de estratificación pronóstica R-ISS y determinar su utilidad en el contexto del trasplante autólogo en la práctica clínica.

MÉTODOS: Se realizó un estudio retrospectivo que incluyó pacientes con MM de nuevo diagnóstico y tratados con TAPH de forma consecutiva entre los años 2005 y 2014, en la Clínica Mayo de Arizona y el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Los criterios de inclusión se basaron en la disponibilidad al diagnóstico de todas las variables incluidas en el R-ISS: LDH, albúmina, β 2M, y alteraciones citogenéticas detectadas por HISF, así como el haber recibido inhibidores de proteasoma o IMiDs en la inducción. El objetivo primario fue la supervivencia global (SG) definido como el tiempo desde el TAPH hasta la muerte. El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS: 134 pacientes cumplieron los criterios de inclusión y fueron incluidos en el estudio. De acuerdo al modelo ISS, 62 pacientes (46%) se clasificaron como ISS I, 38 (28%) fueron ISS II, y 34 (26%) ISS III. En relación a otras variables, 39 pacientes (29%) presentaron CTG AR al diagnóstico y 17 pacientes (13%) LDH elevada. Los pacientes fueron reclasificados de acuerdo al R-ISS, en 44 pacientes (33%) con R-ISS I, 75 pacientes (56%) con R-ISS II, y 15 (11%) con R-ISS III. En total, 18 pacientes

previamente clasificados como ISS I y 19 como ISS III fueron reclasificados como R-ISS II.

La mediana de SG desde el TAPH de la serie fue 111 meses. Los pacientes con R-ISS III tuvieron una mediana de SG significativamente menor que los pacientes con R-ISS II o R-ISS I (37,2 vs. 110,9 meses vs. no alcanzada, respectivamente, $P < 0.0001$). La probabilidad de SG a 5 años fue: 28%, 68% y 86% para R-ISS III, II y I, respectivamente. En el análisis multivariante, el R-ISS retuvo el valor pronóstico independiente para la SG, HR=6,9; 95%, CI: 2,4-20,3; $P=0,001$ para la comparación entre R-ISS III y R-ISS I, y HR= 1,5; 95% CI: 0,6-3,6; $P=NS$, para la comparación entre R-ISS II y R-ISS I.

Con el fin de analizar el impacto de la presencia de alteraciones CTG de AR en el grupo R-ISS II, se reclasificaron los pacientes de dicho grupo de acuerdo a la ausencia o presencia de CTG AR, IIa y IIb, respectivamente. En el análisis de supervivencia se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la SG entre los 4 grupos resultantes: 44 (33%) pacientes con R-ISS I no alcanzaron la mediana de SG; 50 (37%) pacientes con R-ISS IIa tuvieron una mediana de SG de 111 meses; 25 (19%) pacientes con R-ISS IIb, una mediana de 70 meses; y 15 (11%) pacientes con R-ISS III, una mediana de 37 meses, $P < 0.001$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: La evaluación en el momento del diagnóstico de los pacientes con MM candidatos a trasplante mediante el R-ISS fue reproducible y permitió identificar categorías de pacientes con medianas de SG similares a las publicadas por el IMWG en el subgrupo de pacientes jóvenes. Una consecuencia de la reclasificación de estos pacientes según el R-ISS fue que el grupo de riesgo intermedio (R-ISS II) fue más heterogéneo y numeroso. Al dividir estos pacientes en función de la presencia o ausencia de CTG de AR se identificaron 2 grupos con distinta supervivencia. La validación de estos resultados en estudios prospectivos permitiría mejorar la evaluación pronóstica de los pacientes categorizados con riesgo intermedio de acuerdo al R-ISS.



Evaluation of Revised International Staging System (R-ISS) for transplant-eligible multiple myeloma patients

Verónica González-Calle^{1,2} · Abigail Slack¹ · Niamh Keane¹ · Susan Luft³ · Kathryn E. Pearce⁴ · Rhett P. Ketterling⁴ · Tania Jain¹ · Sintosebastian Chirackal¹ · Craig Reeder³ · Joseph Mikhael³ · Pierre Noel³ · Angela Mayo³ · Roberta H. Adams³ · Gregory Ahmann¹ · Esteban Braggio¹ · A. Keith Stewart^{1,3,5} · P. Leif Bergsagel^{1,3} · Scott A. Van Wier¹ · Rafael Fonseca^{1,3,6}

Received: 28 April 2017 / Accepted: 22 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The International Myeloma Working Group has proposed the Revised International Staging System (R-ISS) for risk stratification of multiple myeloma (MM) patients. There are a limited number of studies that have validated this risk model in the autologous stem cell transplant (ASCT) setting. In this retrospective study, we evaluated the applicability and value for predicting survival of the R-ISS model in 134 MM patients treated with new agents and ASCT at the Mayo Clinic in Arizona and the University Hospital of Salamanca in Spain. The patients were reclassified at diagnosis according to the R-ISS: 44 patients (33%) had stage I, 75 (56%) had stage II, and 15 (11%) had stage III. After a median follow-up of 60 months, R-ISS assessed at diagnosis was an independent predictor for overall survival (OS) after ASCT, with median OS not reached, 111 and 37 months for R-ISS I, II and III, respectively ($P < 0.001$). We also found that patients belonging to R-ISS II and having high-risk chromosomal abnormalities (CA) had a significant shorter median OS than those with R-ISS II without CA: 70 vs. 111 months, respectively. Therefore, this study lends further support for the R-ISS as a reliable prognostic tool for estimating survival in transplant myeloma patients and suggests the importance of high-risk CA in the R-ISS II group.

Keywords R-ISS · Autologous transplantation · Myeloma · Prognostic factor

Introduction

Since the introduction of proteasome inhibitors (PIs), immunomodulatory (IMiDs) drugs, and other novel agents, a

continuous improvement of survival has been shown in multiple myeloma (MM), predominantly in younger patients [1, 2]. Novel agent-based induction, followed by high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation (ASCT) is the standard of care for newly diagnosed, transplant-eligible, MM patients based on randomized trials showing improved progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) [3–7].

MM is a heterogeneous disease with variability in response to treatment and survival due to the interaction between host factors and those intrinsic to disease biology [8]. In this setting, there is a continued need for and interest in devising reliable prognostic tools, not only in order to provide the accurate prognostic information possible to patients but also for adopting risk-adapted strategies to improve their survival and quality of life.

Several risk-stratification models have been developed. In 2005, the International Staging System (ISS) emerged, based solely on the serum albumin and $\beta 2$ -microglobulin concentration. Although the ISS has been widely validated, its prognostic value in the era of novel agents and transplant settings

✉ Rafael Fonseca
fonseca.rafael@mayo.edu

¹ Division of Hematology and Oncology Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA

² Hematology Department, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

³ Hematology Department/Transplant Center Mayo Clinic, Phoenix, AZ, USA

⁴ Laboratory Genetics/Cancer Center Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

⁵ Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

⁶ MAYO CLINIC, 5777 East Mayo Boulevard, Phoenix, AZ 85054, USA

Table 1 Baseline characteristics of 134 myeloma patients who underwent autologous stem cell transplantation (2004–2014)

Characteristics	Myeloma patients (<i>n</i> = 134)
Male/female, no. (%)	70 (52.2)/64 (47.8)
Age at diagnosis, median years (range)	62.1 (29.4–78.5)
Heavy chain type, no. (%):	
IgG	78 (58.2)
IgA	24 (17.9)
BJ	29 (21.6)
Non-secretory MM	2 (1.5)
Ig D	1 (0.7)
Light chain type	
kappa, no. (%)	94 (70.1)
lambda, no. (%)	40 (29.9)
Serum M-protein, median mg/dL (range)	3.0 (0–9.9)
% BM PC by morphology, median (range)	38.0 (1–100)
Anemia, no. (%)	48 (36.1)
Renal insufficiency, no. (%)	15 (12.4)
Bone lesions, no. (%)	102 (76.1)
ISS stage, no. (%)	
I	62 (46.2)
II	38 (28.3)
III	34 (25.5)
B ₂ microglobulin, median (range)	3.3 (1.3–18.0)
High LDH, no. (%)	17 (12.7)
High-risk CA, no. (%)	39 (29.3)
del17p	18 (13.6)
<i>t</i> (4;14)	17 (12.8)
<i>t</i> (14;16)	7 (5.3)
R-ISS stage, no. (%)	
I (ISS I + standard CA + normal LDH)	44 (32.8)
II (neither I nor III)	75 (56.0)
III (ISS III with high-risk CA and/or high LDH)	15 (11.2)

BJ Bence Jones myeloma, MM multiple myeloma, *yr.* years, *no* number, *BM PC* bone marrow plasma cells, *ISS* International Staging System, *LDH* lactate dehydrogenase, *CA* chromosomal abnormalities, *R-ISS* Revised International Staging System

needs to be readdressed [9–11]. Evaluation of cytogenetic abnormalities (CA) and levels of lactate dehydrogenase (LDH) are important as these reflect disease biology, and both markers have independent prognostic value [12, 13]. Several studies have shown that high-risk CA, such as the presence of chromosome 14 translocations or 17p abnormalities, are the most important prognostic biomarkers in MM patients [14–16]. Other studies proposed a risk stratification model based on the combination of both host and disease factors: ISS and CA [17, 18] or LDH [19]. Finally, a new Revised-International Staging System (R-ISS) was developed by the International Myeloma Working Group (IMWG) that

integrates the aforementioned ISS, LDH, and high-risk CA, resulting in three groups with different outcomes [20].

However, there is limited data on the applicability of this prognostic model in the setting of novel induction therapy followed by ASCT. Thus, the aim of this study is to determine whether the new R-ISS is a valid risk model for predicting survival in a cohort of unselected transplant MM patients, treated at Mayo Clinic in Arizona and the University Hospital of Salamanca in Spain. We show that R-ISS model allows a more accurate stratification of the transplant patients, identifying a high-intermediate risk group based on the presence of high-risk CA in the R-ISS II group.

Methods

We retrospectively studied a cohort of newly diagnosed MM patients who underwent ASCT and were followed up at Mayo Clinic in Arizona and University Hospital of Salamanca in Spain from January 2005 to December 2014. Both Institutional Review Boards approved the study and it was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. To be eligible, we required a complete dataset including ability to determine ISS, LDH, and CA. Since these institutions are tertiary referral centers many patients were excluded as fluorescence in situ hybridization (FISH) was either not done, done without selection of plasma cells by cell separation or cIg technique, or LDH or β 2-microglobulin data were lacking. Patients were often seen after induction therapy had been initiated by the referring physicians and obtaining testing for FISH at that point is not informative. All patients were required to have PI- or IMiDs-based therapies as induction treatment.

Baseline data were collected by searching at medical records database of Mayo Clinic and University Hospital of Salamanca and included data required for the assignment of the R-ISS described by Palumbo et al. [20]. Serum LDH level was classified as normal or high according to the normal range given by the local laboratory. High LDH was defined as higher than the upper limit of normal range and normal LDH was defined as a serum level lower than the upper limit of normal. Cytogenetic evaluation was performed by FISH as previously published [12, 14]. Response to treatment was evaluated according to International uniform response criteria for MM 2006 [21].

The primary and secondary endpoints were OS and PFS from ASCT, respectively. OS was considered the time from date of transplantation to death. PFS was defined as the time from date of transplantation to relapse, progression or death, regardless of cause. Patients without a recorded progression or death date were censored for PFS or OS at their last follow-up.

Table 2 Clinical features according to R-ISS stage at diagnosis

Features	No. (%)	R-ISS I <i>n</i> = 44 no. (%)	R-ISS II <i>n</i> = 75 no. (%)	R-ISS III <i>n</i> = 15 no. (%)	<i>P</i> value
Male	70 (52.2)	25 (56.8)	37 (49.3)	8 (53.3)	NS
Age ≥ 65 yr at diagnosis	41 (44.6)	11 (34.3)	27 (54.0)	3 (30.0)	NS
ISS					
I	62 (46.3)	44	18	0	–
II	38 (28.3)	0	38	0	
III	34 (25.3)	0	19	15	
Anemia at diagnosis	48 (35.8)	6 (13.6)	30 (40.0)	12 (80.0)	< 0.001
Bone lesions at diagnosis	102 (76.1)	35 (79.5)	58 (77.3)	9 (60.0)	NS
Renal impairment at diagnosis	15 (11.2)	0	9 (12.0)	6 (40.0)	< 0.001
IgA MM	22 (16.4)	4 (9.0)	11 (14.7)	7 (46.7)	NS
CR before ASCT	43 (32.1)	15 (34.1)	22 (33.3)	6 (40.0)	NS
CR after ASCT	72 (53.7)	24 (54.5)	41 (54.6)	7 (46.7)	NS
Maintenance treatment	65 (51.2)	25 (59.5)	33 (46.5)	7 (50.0)	NS

R-ISS revised International Staging System, NS no significant, yr years, ISS International Staging System, MM multiple myeloma, CR complete response, ASCT autologous stem cell transplantation, no. number of cases

Survival curves were plotted by Kaplan-Meier method, with differences assessed with the log-rank test. Effects of potential risk factors of progression were analyzed in a Cox proportional hazards model. The chi-square, *t* student and Mann-Whitney U tests were used to estimate the statistically significant differences among baseline characteristics. *P* values were considered at the conventional 5% significance level. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Table 3 Characteristics of Autologous stem cell transplantation, Mayo Clinic (Arizona) and University Hospital of Salamanca (2004–2014)

Characteristics	MM (<i>n</i> = 134)
Time from diagnosis to ASCT, median months (range)	6.7 (3.7–69.1)
Age at ASCT, median years (range)	62.1 (29.4–78.5)
≤ 65, no. (%)	54 (40.3)
> 65, no. (%)	80 (59.7)
Number of induction schemes received, median (range)	1 (1–7)
1, no. (%)	111 (82.8)
≥ 2, no. (%)	23 (17.2)
CD34+ cells Dose Infused, × 10 ⁶ /kg median, (range)	3.9 (1.2–10.8)
Melphalan conditioning regimen, no (%)	131 (97.8)
Time to ANC > 500/μL, days, median (range)	11.4 (5.0–19.0)
Time to platelets > 20,000/μL, days, median (range)	16.6 (7.0–34.0)
Graft failure, no. (%)	1(1)

ASCT autologous stem cell transplantation, MM multiple myeloma, no. number, ANC absolute neutrophil count, μL microliter

Results

Patient characteristics

In all, 134 patients had complete data and subsequently were included in the study. A total of 92 out of 509 patients who consecutively underwent ASCT at Mayo Clinic and 42 out of 107 from the University Hospital of Salamanca. The baseline characteristics are summarized in Table 1. There were 70 (52%) men and 64 (48%) women. The median age at diagnosis was 62 years (range, 29–78 years), and 41 (45%) patients were older than 65 years at the time of ASCT. Fifteen (11%) patients presented with renal impairment (RI) at the time of diagnosis.

According to ISS, 62 (46%) patients had stage I, 38 (28%) stage II, and the remaining 34 (25%) stage III disease at diagnosis. In addition, there were 39 patients (29%) with high-risk CA: 18 patients (14%) with del17p; 17 patients (13%) with *t*(4;14); and 7 (5%) with *t*(14;16). Seventeen patients (13%) had high LDH levels. Consequently, patients were re-staged at diagnosis according to the R-ISS, resulting 44 patients (33%) with stage I, 75 (56%) with stage II, and 15 (11%) with stage III. Thus, 18 patients previously categorized as having low risk (ISS I) and 15 patients as high risk (ISS III) were reclassified as intermediate risk (R-ISS II), according to the new revised staging system (Table 2).

ASCT features and treatment response

Median time from diagnosis to ASCT was 6.7 months (range 4–69 months, Table 3). All patients received induction therapy

Table 4 Induction and maintenance treatment in myeloma patients who underwent autologous transplantation at Mayo Clinic in Arizona and University Hospital of Salamanca (2004–2014)

Induction and maintenance characteristics	Myeloma patients No. (%)
Induction treatment, no. (%)	
CyBorD	44 (32.8)
CyKTD	23 (17.2)
RD	16 (11.9)
VD	13 (9.7)
VTD	10 (7.5)
TD	6 (4.5)
VRD	5 (3.3)
Others	16 (11.9)
Triplet drug combination	87 (64.9)
Doublet drug combination	47 (35.1)
Proteasome inhibitor-containing regimen	104 (77.6)
IMiDs-containing regimen	60 (44.8)
Lines of induction	
1	111 (82.8)
≥ 2	23 (17.2)
Response achieved before auto-SCT	
CR	43 (32.1)
VGPR	37 (27.6)
PR	51 (38.1)
Response achieved after auto-SCT (+ 100 day)	
CR	72 (53.7)
VGPR	35 (26.1)
PR	22 (16.4)
Maintenance treatment	
No maintenance	62 (48.8)
Yes (lenalidomide, thalidomide, bortezomib, or interferon)	65 (51.2)

No. number of patients; *CyBorD* cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone; *CyKTD* cyclophosphamide, carfilzomib, thalidomide, and dexamethasone; *RD* lenalidomide, dexamethasone; *VRD* bortezomib, lenalidomide, dexamethasone; *TD* thalidomide and dexamethasone; *VD* bortezomib and dexamethasone; *IMiDs* immunomodulators; *CR* complete response; *VGPR* very good partial response; *PR* partial response

before ASCT; 104 (78%) patients received PI-based therapy, with CyBorD (cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone) as the preferred choice. One hundred and eleven (83%) patients responded to first line of induction and 23 (17%) were initially refractory and received more than one line of induction treatment (Table 4). In the majority of cases, high-doses of melphalan were used as conditioning, followed by infusion of autologous stem cells, with the median CD34+ cells-dose infused over 2×10^6 /kg. Median times to engraftment were 11 (range 5–19) and 17 (range 7–34) days for neutrophils and platelets, respectively. Only one case of graft failure was reported.

Most patients underwent ASCT in at least partial response (PR), and there was an improvement in response category after ASCT, with an increase of complete response (CR) rate from 43 (32%) patients to 72 (54%) patients in CR before and after ASCT, respectively.

Survival analysis

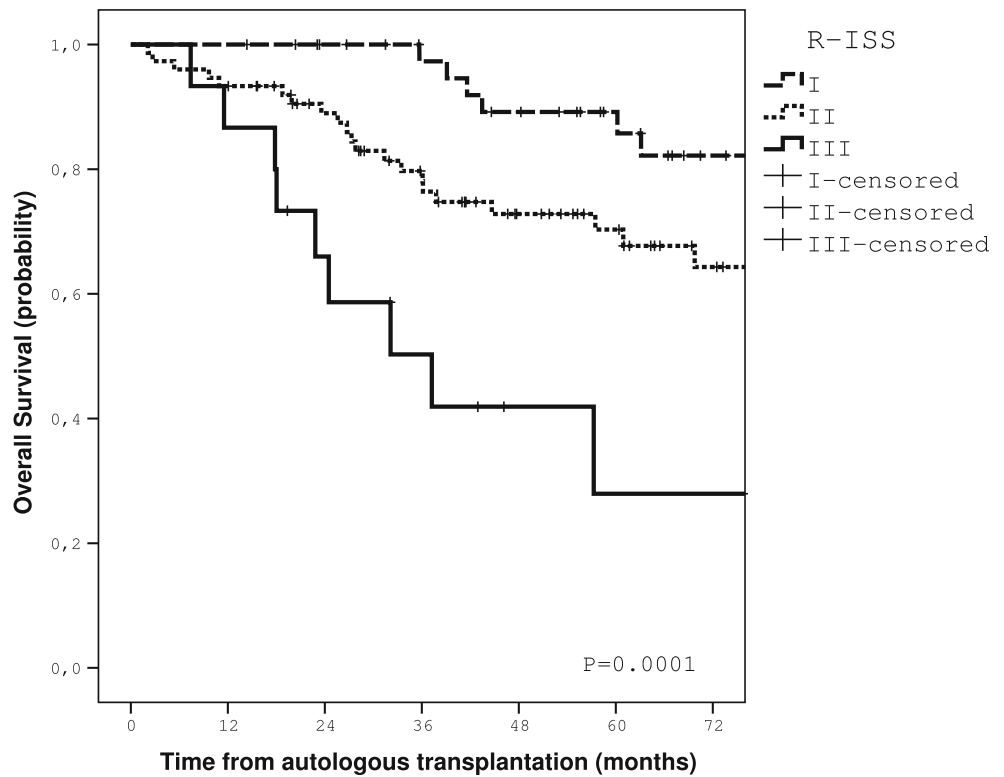
The median follow-up was 59.6 months (range, 7.3–135.4 months). Forty-one (31%) patients died and 93 (69%) patients progressed or died at any time after ASCT. The median OS was 110.9 months (95% CI 86.6–135.2 months) from ASCT and the median PFS was 34.5 months (95% CI 29.7–42.1 months) from ASCT.

In our series, there were no statistically significant differences in terms of OS or PFS among groups according to ISS classification. However, patients classified as having high-risk CA showed a statistically significant shorter median OS than those with standard-risk CA 57.4 months vs. median OS not reached (NR) ($P = 0.001$), respectively. Patients with high LDH levels had a significantly inferior OS, 36.1 vs. NR ($P < 0.001$), compared with patients with normal LDH levels at diagnosis.

As expected, patients with R-ISS III had a significantly shorter median OS from ASCT compared to patients with R-ISS II or R-ISS I (37.2 vs. 110.9 months vs. not reached, respectively, $P = 0.0001$) (Fig. 1). The probability for 5-year OS was 28, 68, and 86% per R-ISS III, II, and I, respectively. Although there were more cases with renal impairment and anemia at diagnosis in the R-ISS III group, no statistically significant differences in baseline characteristics were identified among groups to explain the differences in OS observed, as shown in Table 2. Patients who belonged to R-ISS III group had also a significantly shorter median PFS than the R-ISS II and R-ISS I groups: 19.2 vs. 36.1 vs. 35.2 months, respectively ($P = 0.05$) (Fig. 2).

In order to explore whether the presence of high-risk CA had an impact on the survival of the R-ISS II group, we reclassified R-ISS II into two subgroups according to the presence or not of high-risk CA and we compared both of them with either R-ISS I and III. As a result, we had four groups with significantly different OS: 44 (33%) patients with R-ISS I and a median OS NR; 50 (37%) patients with R-ISS IIa (not R-ISS stage I or III and absence of high-risk CA) with a median OS of 110.9 months; 25 (19%) patients with R-ISS IIb (not R-ISS stage I or III but presence of high-risk CA) with a median OS of 69.8 months; and 15 (11%) patients with R-ISS III and a median OS of 37.2 months, $P < 0.001$, (Fig. 3). Although there were no statistically significant differences among groups, there was a trend towards shorter PFS in the R-ISS IIb group compare with PFS in either R-ISS I or IIa: 32.9 vs. 35.2 vs. 48.2 months, respectively ($P = 0.06$).

Fig. 1 Overall survival (OS) by R-ISS risk group. OS was defined as time from date of transplantation until date of death. There were statistically significant differences in OS with median OS not reached, 110.9 and 37.2 months in R-ISS risk groups I, II, and III, respectively. The probability of OS at 5 years was 28, 68, and 86% for R-ISS III, II, and I, respectively



Additional risk factors for OS were identified in the univariate analysis such as renal impairment at diagnosis (median OS 37.2 months; $P < 0.001$) and ≥ 2 lines of induction

treatment (median OS 60.9 months; $P = 0.005$) (Table 5). All patients were included in the multivariate analysis and R-ISS was selected as an important independent predictor for OS. An

Fig. 2 Progression free survival (PFS) by R-ISS risk group. PFS was defined as time from date of transplantation until date of relapse, progression or death. Shorter PFS in R-ISS risk group III versus risk groups I or II was observed—median PFS 19.2 vs. 35.2 vs. 36.1 months, respectively

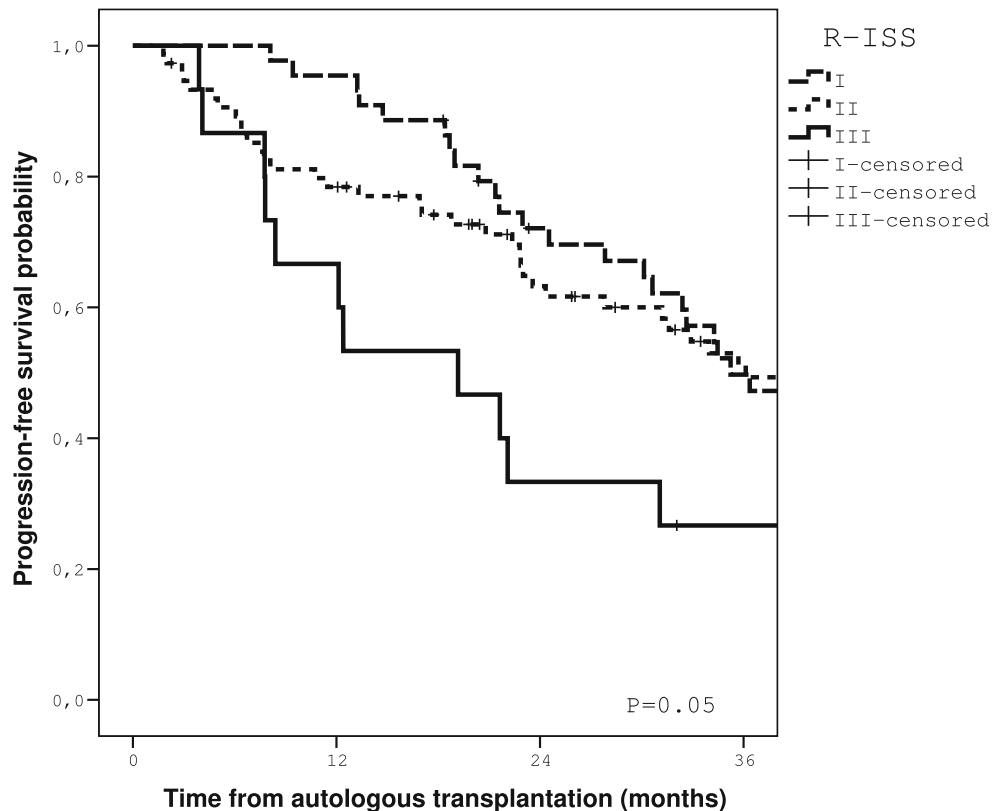
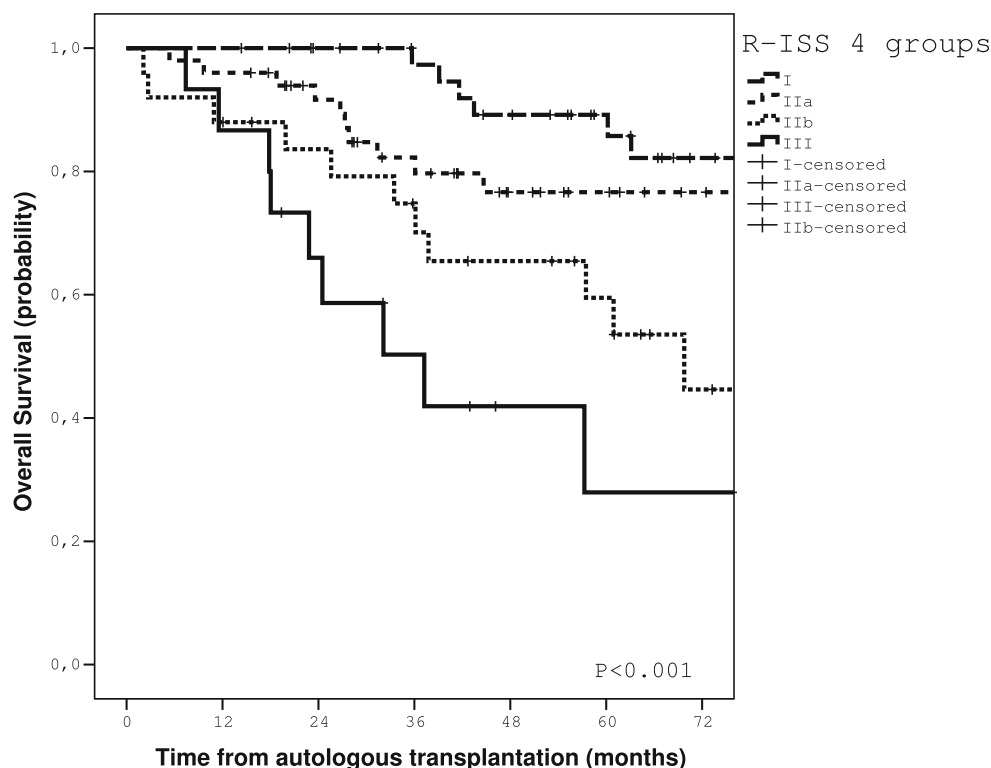


Fig. 3 Overall survival (OS) by R-ISS, incorporating new subclassification of R-ISS group II by presence or absence of high risk chromosomal abnormalities. R-ISS group II was subclassified into groups IIa (defined as not group I or III and lack of high risk chromosomal abnormalities ($t(4;14)$, $t(14;16)$ or $del17p$) and groups IIb (defined as not R-ISS group I or III and presence of high risk chromosomal abnormalities). Median OS was not reached, 110.9 months, 69.8 months and 37.2 months in R-ISS groups I, IIa, IIb, and III, respectively



increase HR of 6.9, 95% CI 2.4–20.3; $P = 0.001$ was observed between R-ISS III and R-ISS I, and a HR of 1.5, 95% CI 0.6–3.6; NS, between R-ISS II and R-ISS I. Another discriminating factor for OS was ≥ 2 lines of induction before ASCT (HR = 3.8, 95% CI 1.7–8.5; $P = 0.001$).

In addition, independent-risk factors for shorter PFS were identified in the multivariate analysis such as R-ISS III (HR = 2.9, 95% CI 1.3–6.6; $P = 0.008$) and having received more than 1 line of induction before ASCT (HR = 2.8, 95% CI 1.5–5.1; $P = 0.001$). The achievement of CR on day 100 after ASCT and having received maintenance treatment were independently associated with longer PFS, as shown in the multivariate analysis in Table 5.

Discussion

We showed in this study that R-ISS is a reproducible and applicable method to robustly predict survival in MM patients who underwent ASCT. This is one of the first evaluations and validations of the R-ISS in transplant MM patients.

We present a representative series of exclusively transplant patients who received novel agents with outcomes comparable to those recently reported in prospective and randomized controlled studies, with 80% of patients achieving very good partial response or better after ASCT, median PFS of 45 months and 4 year-OS of 81% [3, 4, 6, 7].

According to the results recently reported by several studies which evaluate the R-ISS in myeloma patients [20, 22–26], the distribution of patients is quite similar, particularly stage III (10–17% in these studies), with a slightly higher proportion of R-ISS I cases in our series (33% vs. 18–28%). This could be explained by the fact that the aforementioned studies included elderly population as well, with potentially more cases of hypoalbuminemia and chronic renal disease [27]. Regarding survival, although our R-ISS stage III patients displayed a shorter OS than patients with stage III in the study of Palumbo et al. [20], it is important to point out that the original study was developed in a selected cohort of patients enrolled in clinical trials, and our results are closer to those reported by the Greek and the British group in unselected MM patients cohorts [23, 25].

Although only 134 patients had complete data, they were precisely those who were consecutively diagnosed and treated at Mayo Clinic in Arizona and University Hospital of Salamanca, whereas the remaining patients were referred to these centers after induction treatment for the transplant procedure and diagnosis data were not completely available. Thus, our series may be considered a representative sample of newly diagnosed transplant patients.

An immediate consequence of re-staging myeloma patients with the R-ISS model is that patients belonging to either ISS I with additional high-risk features (high LDH or high-risk CA) or ISS III with low-risk features (normal LDH and standard-risk CA) are now reclassified as R-ISS II, with accurate

Table 5 Univariate and multivariate analysis of covariates affecting PFS and OS in transplant myeloma patients at Mayo Clinic in Arizona and University Hospital of Salamanca (2004–2014)

Covariates	n (%)	PFS				OS			
		Median (mo)	Univ. <i>P</i> value	Multivariate HR (CI 95%) <i>P</i> value		Median (mo)	Univ. <i>P</i> value	Multivariate HR (CI 95%) <i>P</i> value	
Renal impairment at dx									
Yes	15 (12.4)	12.4	0.03	1.7 (0.8–3.5)	NS	37.2	<0.001	1.8 (0.7–4.2)	NS
No	106(87.6)	35.7				110.9		Ref	
BMPCs at dx									
≥60%	31 (23.1)	24.3	NS	–	–	NR	NS	–	–
<60%	103(76.9)	36.1				109.1			
Cytogenetic-risk									
High	39 (29.3)	31.1	NS	–	–	57.4	0.001	–	–
Standard	94 (70.7)	35.7				NR			
LDH at dx									
High	17 (12.7)	21.6	NS	–	–	36.1	<0.001	–	–
Normal	117(87.3)	35.7				NR			
ISS									
I	62 (46.2)	34.5	NS	–	–	NR	NS	–	–
II	38 (28.3)	49.5				110.9			
III	34 (25.5)	23.0				NR			
R-ISS									
I	44 (32.8)	35.2	0.05	Ref.	–	NR	<0.001	Ref.	–
II	75 (56.0)	36.1		0.8 (0.5–1.4)	NS	110.9		1.5 (0.6–3.6)	NS
III	15 (11.2)	19.2		2.9 (1.3–6.6)	0.008	37.2		6.9 (2.4–20.3)	0.001
Proteasome inhibitor- based induction									
Yes	104(77.6)	35.7	NS	–	–	NR	NS	–	–
No	30 (22.4)	24.5				94.7			
Lines Induction									
≥2	23 (17.2)	18.4	0.006	2.8 (1.5–5.1)	0.001	60.9	0.005	3.8 (1.7–8.5)	0.001
1	111(82.8)	36.1		Ref		NR		Ref	
Response before ASCT									
≥CR	43 (32.1)	47.7	NS	–	–	NR	NS	–	–
<CR	91 (67.9)	32.6				110.9			
Response 100 days									
≥CR	72 (53.7)	47.7	0.01	0.4 (0.3–0.7)	0.0001	NR	NS	–	–
<CR	62 (46.3)	27.8		Ref		110.9			
Maintenance									
Yes	65 (51.2)	49.5	0.02	0.5 (0.3–0.8)	0.004	94.7	NS	–	–
No	62 (48.8)	24.5		Ref		110.9			
Not available	7								

Univariate and multivariate model for PFS and OS. Note that only significant covariates were included in the multivariate model

Dx diagnosis, *BMPCs* bone marrow plasma cells by morphology count, *ASCT* autologous stem cell transplantation, *PFS* progression free survival, *mo* months, *univ* univariate analysis, *yr* years, *HR* hazard ratio, *OS* overall survival, *ISS* International staging system, *CR* complete response, *Ig* immunoglobulin, *NS* not significant, *NR* not reached, *Ref* reference category. High-risk cytogenetic abnormalities: del17p, t(4;14), or t(14;16)

identification of low and high-risk patients according to their OS: median NR and 37 months, respectively. As showed in the above studies, there is a higher proportion of patients categorized as R-ISS II, including patients with high-risk CA belonging to either ISS II or ISS I. Several studies have shown that genetic events have a determinant role in prognosis in

myeloma patients [12, 14, 19]. Based on this, we explored the impact of the presence of high-risk CA on R-ISS II survival. This group of patients was split into IIa and IIb groups, according to the absence or presence of high-risk CA, respectively. Interestingly, statistically significant differences in survival were found between IIa and IIb stages: median OS 111

and 70 months, respectively. These findings need to be validated in independent and prospective studies, and perhaps will allow improvement of the risk assessment of not only the low and high-risk transplant myeloma patients, but also the intermediate risk group, identifying low-intermediate and a high-intermediate risk subgroups according to the presence or not of del17p, $t(4;14)$ or $t(14;16)$.

In addition, we compared the prognostic value of R-ISS with other potential predictors of survival in our series of transplant patients and we showed that R-ISS is an independent prognostic marker. R-ISS model employs a feasible evaluation of both host factors and disease biology, encompassing ISS staging, LDH, and genetics. All of these factors should be assessed in the diagnosis work-up according to the IMWG recommendations [28, 29]. ISS was not selected as a predictor of survival in this cohort of patients exclusively treated with novel agents; this result is consistent with other studies [10, 11, 26] and could be explained by the fact that ISS model was developed before 2002 when only a minority of patients had received IMiD- or PI-based therapies.

Interestingly, all of the patients were treated with a novel agent-based induction and most of them achieved partial response or better before ASCT; however, those patients who were refractory to the first line of induction and needed at least a second line had a 3-fold higher risk of progression or four-fold higher risk of death after ASCT. In fact, treatment response is a well-known surrogate marker of PFS and, most importantly, OS [30–32]. Indeed, response 100 days after ASCT was an independent predictor for PFS, with 60% reduction in risk of progression or death in those who achieved CR after ASCT, as shown in the multivariate analysis performed in our study.

In summary, R-ISS assessed at diagnosis was an independent predictor for OS after ASCT in our series, with median OS for the different R-ISS groups comparable to those reported by Palumbo et al. in their subgroup of younger patients [20]. Thus, this study lends further support for the R-ISS as a reliable prognostic tool for estimating OS in transplant-eligible MM patients with one contribution: the identification of R-ISS II subgroups according to the presence or not of high-risk CA. If this observation is validated in other independent studies, this approach might help to improve the risk-stratification of transplant patients and thus, accurately predict survival and define tailored treatment strategies.

Author contributions RF, VGC, and AS conceived and designed the work that led to the submission. VGC, AS, SL, KEP, and RPK acquired data. VGC analyzed, interpreted the data and drafted the manuscript and RF and NK revised the manuscript. All the authors approved the final version.

Funding information Verónica González-Calle was supported by the Fundación Española de Hematología y Hemoterapia and Janssen (Beca Estancias de Investigación en el Extranjero Convocatoria 2015-2016).

Compliance with ethical standards

Disclosures Dr. Rafael Fonseca: Consulting with AMGEN, BMS, Celgene, Takeda, Bayer, Jansen, Novartis, Pharmacyclics, Sanofi and Merck. Member of the Scientific Advisory Board of Adaptive Biotechnologies. Mayo Clinic and Dr. Fonseca hold a patent for the prognostication of myeloma via FISH with annual income of about \$2K dollars. There are no conflicts of interest declared by the rest of the authors.

References

1. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA (2008) Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 111(5):2516–2520. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-116129>
2. Fonseca R, Abouzaid S, Bonafede M, Cai Q, Parikh K, Cosler L, Richardson P (2017) Trends in overall survival and costs of multiple myeloma, 2000-2014. *Leukemia* 31:1915–1921. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.380>
3. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, Di Raimondo F, Ben Yehuda D, Petrucci MT, Pezzatti S, Caravita T, Cerrato C, Ribakovsky E, Genuardi M, Cafro A, Marcatti M, Catalano L, Offidani M, Carella AM, Zamagni E, Patriarca F, Musto P, Evangelista A, Ciccone G, Omede P, Crippa C, Corradini P, Nagler A, Boccadoro M, Cavo M (2014) Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 371(10):895–905. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402888>
4. Gay F, Oliva S, Petrucci MT, Conticello C, Catalano L, Corradini P, Siniscalchi A, Magarotto V, Pour L, Carella A, Malfitano A, Petro D, Evangelista A, Spada S, Pescosta N, Omede P, Campbell P, Liberati AM, Offidani M, Ria R, Pulini S, Patriarca F, Hajek R, Spencer A, Boccadoro M, Palumbo A (2015) Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16(16):1617–1629. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)00389-7](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)00389-7)
5. Biran N, Jacobus S, Vesole DH, Callander NS, Fonseca R, Williams ME, Abonour R, Katz MS, Rajkumar SV, Greipp PR, Siegel DS (2016) Outcome with lenalidomide plus dexamethasone followed by early autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma on the ECOG-ACRIN E4A03 randomized clinical trial: long-term follow-up. *Blood Cancer J* 6(9):e466. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.68>
6. Cavo M, Palumbo A, Zweegman S, Dimopoulos M, Hajek R, Pantani L (2016) Upfront autologous stem cell transplantation (ASCT) versus novel agent-based therapy for multiple myeloma (MM): a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM trial). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 34:15
7. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Facon T, Caillot D, Escoffre M, Amulf B, Macro M, Belhadj K, Garderet L (2015) Autologous transplantation for multiple myeloma in the era of new drugs: a phase III study of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM/DFCI 2009 trial). *Blood* 126(23):391–391
8. Fonseca R, San Miguel J (2007) Prognostic factors and staging in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 21(6):1115–1140. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2007.08.010>
9. Kastiris E, Zervas K, Symeonidis A, Terpos E, Delimbassi S, Anagnostopoulos N, Michali E, Zomas A, Katodritou E, Gika D, Pouli A, Christoulas D, Roussou M, Kartasis Z, Economopoulos T,

- Dimopoulos MA (2009) Improved survival of patients with multiple myeloma after the introduction of novel agents and the applicability of the International Staging System (ISS): an analysis of the Greek Myeloma Study Group (GMSG). *Leukemia* 23(6):1152–1157. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.402>
10. Takamatsu H, Honda S, Miyamoto T, Yokoyama K, Hagiwara S, Ito T, Tomita N, Iida S, Iwasaki T, Sakamaki H, Suzuki R, Sunami K (2015) Changing trends in prognostic factors for patients with multiple myeloma after autologous stem cell transplantation during the immunomodulator drug/proteasome inhibitor era. *Cancer Sci* 106(2):179–185. <https://doi.org/10.1111/cas.12594>
 11. Lu J, Liu A, Fu W, Du J, Huang X, Chen W, Hou J (2015) The applicability of the international staging system in Chinese patients with multiple myeloma receiving bortezomib or thalidomide-based regimens as induction therapy: a multicenter analysis. *Biomed Res Int* 2015:856704. <https://doi.org/10.1155/2015/856704>
 12. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR (2003) Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101(11):4569–4575. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3017>
 13. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillemin G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C (2007) Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 109(8):3489–3495. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040410>
 14. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, Mateos MV, Hernandez JM, Fernandez M, Carrera D, Rosinol L, Ribera JM, Ojanguren JM, Palomera L, Gardella S, Escoda L, Hernandez-Boluda JC, Bello JL, de la Rubia J, Lahuerta JJ, San Miguel JF, Group GPS (2007) Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 21(1):143–150. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404413>
 15. Kapoor P, Fonseca R, Rajkumar SV, Sinha S, Gertz MA, Stewart AK, Bergsagel PL, Lacy MQ, Dingli DD, Ketterling RP, Buadi F, Kyle RA, Witzig TE, Greipp PR, Dispenzieri A, Kumar S (2010) Evidence for cytogenetic and fluorescence in situ hybridization risk stratification of newly diagnosed multiple myeloma in the era of novel therapy. *Mayo Clin Proc* 85(6):532–537. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0677>
 16. Kaufman GP, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi FK, Dingli D, Hayman SR, Kapoor P, Lust JA, Russell S, Go RS, Hwa YL, Kyle RA, Rajkumar SV, Kumar SK (2016) Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia* 30(3):633–639. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.287>
 17. Neben K, Jauch A, Bertsch U, Heiss C, Hielscher T, Seckinger A, Mors T, Muller NZ, Hillengass J, Raab MS, Ho AD, Hose D, Goldschmidt H (2010) Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica* 95(7):1150–1157. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.016436>
 18. Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, Attal M, Gutierrez N, Haessler J, Goldschmidt H, Hajek R, Lee JH, Sezer O, Barlogie B, Crowley J, Fonseca R, Testoni N, Ross F, Rajkumar SV, Sonneveld P, Lahuerta J, Moreau P, Morgan G (2013) Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an international myeloma working group collaborative project. *Leukemia* 27(3):711–717. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.282>
 19. Moreau P, Cavo M, Sonneveld P, Rosinol L, Attal M, Pezzi A, Goldschmidt H, Lahuerta JJ, Marit G, Palumbo A, van der Holt B, Blade J, Petrucci MT, Neben K, san Miguel J, Patriarca F, Lokhorst H, Zamagni E, Hulin C, Gutierrez N, Facon T, Caillot D, Benboubker L, Harousseau JL, Leleu X, Avet-Loiseau H, Mary JY (2014) Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem-cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *J Clin Oncol* 32(20):2173–2180. <https://doi.org/10.1200/jco.2013.53.0329>
 20. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orłowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P (2015) Revised international staging system for multiple myeloma: a report from international myeloma working group. *J Clin Oncol* 33(26):2863–2869. <https://doi.org/10.1200/jco.2015.61.2267>
 21. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, Ludwig H, Gahrton G, Beksac M, Crowley J, Belch A, Boccadoro M, Cavo M, Turesson I, Joshua D, Vesole D, Kyle R, Alexanian R, Tricot G, Attal M, Merlini G, Powles R, Richardson P, Shimizu K, Tosi P, Morgan G, Rajkumar SV (2006) International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 20(9):1467–1473. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404284>
 22. Jimenez-Zepeda VH, Duggan P, Neri P, Rashid-Kolvear F, Tay J, Bahlis NJ (2016) Revised international staging system applied to real world multiple myeloma patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 16(9):511–518. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.06.001>
 23. Kastritis E, Terpos E, Roussou M, Gavriatopoulou M, Migkou M, Eleutherakis-Papaiaikovou E, Fotiou D, Ziogas D, Panagiotidis I, Kafantari E, Giannouli S, Zomas A, Konstantopoulos K, Dimopoulos MA (2016) Evaluation of the Revised International Staging System (R-ISS) in an independent cohort of unselected patients with multiple myeloma. *Haematologica* 102:593–599. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.145078>
 24. Tandon N, Rajkumar SV, LaPlant B, Pettinger A, Lacy MQ, Dispenzieri A, Buadi FK, Gertz MA, Hayman SR, Leung N, Go RS, Dingli D, Kapoor P, Lin Y, Hwa YL, Fonder AL, Hobbs MA, Zeldenrust SR, Lust JA, Gonsalves WI, Russell SJ, Kumar SK (2017) Clinical utility of the Revised International Staging System in unselected patients with newly diagnosed and relapsed multiple myeloma. *Blood Cancer J* 7(2):e528. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.13>
 25. Walker I, Coady A, Neat M, Ladon D, Benjamin R, El-Najjar I, Kazmi M, Schey S, Streetly M (2016) Is the revised international staging system for myeloma valid in a real world population? *Br J Haematol* 180:451–454. <https://doi.org/10.1111/bjh.14341>
 26. Cho H, Yoon DH, Lee JB, Kim SY, Moon JH, Do YR, Lee JH, Park Y, Lee HS, Eom HS, Shin HJ, Min CK, Kim JS (2017) Comprehensive evaluation of the revised international staging system in multiple myeloma patients treated with novel agents as a primary therapy. *Am J Hematol* 92(12):1280–1286. doi:<https://doi.org/10.1002/ajh.24891>
 27. Bataille R, Annweiler C, Beauchet O (2013) Multiple myeloma international staging system: “staging” or simply “aging” system? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 13(6):635–637. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2013.07.003>

28. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, Ludwig H, Joshua D, Mehta J, Gertz M, Avet-Loiseau H, Beksac M, Anderson KC, Moreau P, Singhal S, Goldschmidt H, Boccadoro M, Kumar S, Giralt S, Munshi NC, Jagannath S (2011) Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the international myeloma workshop consensus panel 3. *Blood* 117(18):4701–4705. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-299529>
29. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H (2009) International myeloma working group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23(12):2210–2221. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.174>
30. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martinez-Lopez J, Rosinol L, Sureda A, de la Rubia J, Garcia-Larana J, Martinez-Martinez R, Hernandez-Garcia MT, Carrera D, Besalduch J, de Arriba F, Ribera JM, Escoda L, Hernandez-Ruiz B, Garcia-Frade J, Rivas-Gonzalez C, Alegre A, Blade J, San Miguel JF (2008) 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 Off J Am Soc Clin Oncol* 26(35):5775–5782. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.9721>
31. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H (2009) The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 114(15):3139–3146. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-201053>
32. Majithia N, Rajkumar SV, Lacy MQ, Buadi FK, Dispenzieri A, Gertz MA, Hayman SR, Dingli D, Kapoor P, Hwa L, Lust JA, Russell SJ, Go RS, Kyle RA, Kumar SK (2016) Early relapse following initial therapy for multiple myeloma predicts poor outcomes in the era of novel agents. *Leukemia* 30(11):2208–2213. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.147>

7. **Trabajo 3. La recuperación de las inmunoglobulinas policlonales al año del trasplante autólogo como marcador pronóstico de supervivencia a largo plazo en el mieloma múltiple**

**RECOVERY OF POLYCLONAL IMMUNOGLOBULINS ONE YEAR AFTER
AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION
AS A LONG-TERM PREDICTOR MARKER OF
PROGRESSION AND SURVIVAL IN MULTIPLE MYELOMA**

Verónica González-Calle, Seila Cerdá; Jorge Labrador; Eduardo Sobejano; Beatriz González-Mena; Carmen Aguilera; Enrique María Ocio ; María Belén Vidriales; Noemí Puig; Norma Carmen Gutiérrez; Ramón García-Sanz; José María Alonso; Rosa López; Carlos Aguilar; Alfonso García de Coca; Roberto Hernández; José Mariano Hernández; Fernando Escalante y María-Victoria Mateos.

Haematologica. 2017;102(5):922-31.

7.1 Resumen trabajo 3

LA RECUPERACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS POLICLONALES AL AÑO DEL TRASPLANTE AUTÓLOGO COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE SUPERVIVENCIA A LARGO PLAZO EN EL MIELOMA MÚLTIPLE.

INTRODUCCIÓN: La inmunoparesia se define por el descenso de las inmunoglobulinas policlonales (Igs). En el momento del diagnóstico, la mayoría de pacientes tienen inmunoparesia, relacionada con una supresión reversible de los precursores de célula B en la médula ósea (MO). Su presencia se ha considerado como un factor de mal pronóstico. Sin embargo, la dinámica de la recuperación de las Igs tras el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) y su papel pronóstico no se ha estudiado hasta la fecha.

OBJETIVO: Determinar la prevalencia, los determinantes y la dinámica de la recuperación de las Igs tras el TAPH y evaluar el impacto pronóstico de dicha recuperación.

MÉTODOS: Se diseñó un estudio retrospectivo multicéntrico que incluyó pacientes con MM tratados consecutivamente con TAPH en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y en el Complejo Asistencial de León entre 1993 y 2013. Se recogieron datos clínico-biológicos, incluyendo la cuantificación de Igs por nefelometría en los siguientes momentos: diagnóstico, previo al TAPH, cada 3 meses en el primer año post-trasplante y posteriormente, de forma anual hasta los 5 años del trasplante o hasta el momento de la recaída/progresión. La inmunoparesia se definió como el descenso de las Igs un 25% del límite inferior de la normalidad de cada laboratorio.

Para determinar las diferencias en supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) entre los pacientes con o sin recuperación de Igs en cada uno de los momentos indicados, se calculó la probabilidad de supervivencia condicionada a estar vivo y sin progresión en cada uno de esos momentos y en base a la recuperación o no de las Igs, mediante el análisis de supervivencia tipo *landmark*. Se excluyeron del estudio los pacientes que recibieron un trasplante alogénico en el +100 y aquellos que

perdieron el seguimiento desde el +100. El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS: Un total de 295 pacientes con MM tratados con TAPH en los centros y periodo indicados fueron incluidos en el estudio. En el momento del diagnóstico, 208 pacientes (84%) presentaron inmunoparesia. En el día +100 del TAPH 58 pacientes (22%) tenían recuperadas las Igs. En ese momento, la mediana del porcentaje de células plasmáticas normales (CPn) en MO, cuantificadas por citometría de flujo, fue mayor en el grupo con recuperación de las Igs que en el de persistencia de inmunoparesia, 85 % vs. 68%, respectivamente, $P = 0,004$. Además, la presencia de un mayor porcentaje de CPn sobre la celularidad total de la MO al día +100 se asoció con mayor probabilidad de recuperación posterior de las Igs, a los 9 meses y al año del TAPH, mientras que la mayoría de los pacientes que no tenían CPn al día +100, no recuperaron las Igs posteriormente. Al año del TAPH, 81 pacientes (48%) tenían persistencia de inmunoparesia y 88 pacientes (52%) habían recuperado las Igs. De este último grupo, 34 pacientes (39%) ya habían recuperado las Igs al día +100; 16 (18%) a los 6 meses; 15 (17%) a los 9 meses y 23 (26%) las recuperaron justo al año del TAPH.

Tras una mediana de seguimiento de 60 meses, la mediana de SLP desde el TAPH en la serie global fue 30,2 meses (IC 95%: 25,9 - 34,5 meses) y la mediana de SG fue de 7,4 años (IC 95%: 6,2 - 8,5 años). Se estimaron las probabilidades condicionadas de progresión y supervivencia en cada uno de los momentos de evaluación de las Igs y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la recuperación de las Igs y la persistencia de inmunoparesia ni al día +100, ni a los 6 o 9 meses. Sin embargo, los pacientes con recuperación de las Igs al año del TAPH presentaron una mediana de SLP desde ese momento significativamente más larga que aquellos con persistencia de inmunoparesia: 60,4 vs. 27,9 meses, respectivamente (HR = 0,45; IC 95%: 0,31 - 0,66; $P < 0,001$). Estas diferencias también se encontraron en términos de SG: 11,3 vs. 7,3 años (HR = 0,45; IC 95%: 0,27 - 0,74; $P = 0,002$). En otro análisis tipo *landmark* realizado al año del TAPH los pacientes que

habían recuperado las Igs en los primeros 6 meses tuvieron una mediana de SLP mayor que aquellos con recuperación entre los 6 meses y el año del TAPH o aquellos sin recuperación: 69,3 vs. 52,9 vs. 27,9 meses, respectivamente, $P < 0,001$. Finalmente, el análisis multivariante confirmó que la recuperación de las Igs al año del TAPH es un factor pronóstico independiente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Aunque la mayoría de pacientes presentaban inmunoparesia en el momento del diagnóstico, en el postrasplante se objetivó una recuperación progresiva de las Igs entre los pacientes que no progresaron. La recuperación de las Igs al año del TAPH fue un marcador pronóstico independiente de progresión y supervivencia. Dicho momento coincide con la máxima recuperación de los linfocitos B postrasplante de acuerdo a otros estudios. Además, una mayor proporción de CPn en el día +100 se asoció con una recuperación de las Igs en dicho momento y podría ayudar a predecir la recuperación posterior, a los 9 meses y al año del TAPH. De ser validados estos resultados en un estudio prospectivo, la persistencia de inmunoparesia podría ser un marcador de disfunción inmune que ayudaría en la selección de pacientes candidatos a estrategias de inmunoterapia.



EUROPEAN
HEMATOLOGY
ASSOCIATION



Ferrata Storti
Foundation

Haematologica 2017
Volume 102(5):922-931

Recovery of polyclonal immunoglobulins one year after autologous stem cell transplantation as a long-term predictor marker of progression and survival in multiple myeloma

Verónica González-Calle,¹ Seila Cerdá,² Jorge Labrador,³ Eduardo Sobejano,¹ Beatriz González-Mena,⁴ Carmen Aguilera,⁵ Enrique María Ocio,¹ María Belén Vidriales,¹ Noemí Puig,¹ Norma Carmen Gutiérrez,¹ Ramón García-Sanz,¹ José María Alonso,⁶ Rosa López,⁷ Carlos Aguilar,⁸ Alfonso García de Coca,⁹ Roberto Hernández,¹⁰ José Mariano Hernández,¹¹ Fernando Escalante² and María-Victoria Mateos¹

¹Complejo Asistencial Universitario de Salamanca/Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (CAUSA/IBSAL); ²Complejo Asistencial de León; ³Complejo Asistencial de Burgos; ⁴Hospital Nuestra Señora de Sonsoles de Ávila; ⁵Hospital Del Bierzo Ponferrada; ⁶Hospital Río Carrión de Palencia; ⁷Hospital Virgen del Puerto de Plasencia; ⁸Complejo Asistencial de Soria; ⁹Hospital Clínico de Valladolid; ¹⁰Complejo Asistencial de Zamora and ¹¹Complejo Asistencial de Segovia, Spain

ABSTRACT

Immunoparesis or suppression of polyclonal immunoglobulins is a very common condition in newly diagnosed myeloma patients. However, the recovery of polyclonal immunoglobulins in the setting of immune reconstitution after autologous stem cell transplantation and its effect on outcome has not yet been explored. We conducted this study in a cohort of 295 patients who had undergone autologous transplantation. In order to explore the potential role of immunoglobulin recovery as a dynamic predictor of progression or survival after transplantation, conditional probabilities of progression-free survival and overall survival were estimated according to immunoglobulin recovery at different time points using a landmark approach. One year after transplant, when B-cell reconstitution is expected to be completed, among 169 patients alive and progression free, 88 patients (52%) showed immunoglobulin recovery and 81 (48%) did not. Interestingly, the group with immunoglobulin recovery had a significantly longer median progression-free survival than the group with persistent immunoparesis (median 60.4 vs. 27.9 months, respectively; Hazard Ratio: 0.45, 95% Confidence Interval: 0.31-0.66; $P < 0.001$), and improved overall survival (11.3 vs. 7.3 years; Hazard Ratio: 0.45, 95% Confidence Interval: 0.27-0.74; $P = 0.002$). Furthermore, the percentage of normal plasma cells detected by flow cytometry in the bone marrow assessed at day 100 after transplantation was associated with the immunoglobulin recovery at that time and may predict immunoglobulin recovery in the subsequent months: nine months and one year. In conclusion, the recovery of polyclonal immunoglobulins one year after autologous transplantation in myeloma patients is an independent long-term predictor marker for progression and survival.

Correspondence:

mvmateos@usal.es

Received: October 14, 2016.

Accepted: January 11, 2017.

Pre-published: January 25, 2017.

doi:10.3324/haematol.2016.158345

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/102/5/922

©2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in Haematologica is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>,

sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



Introduction

High-dose therapy followed by autologous stem cell transplantation (ASCT) remains the standard of care for young, newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients. It produces high rates of complete remission, and prolonged progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).¹⁻³ However, MM is still an incurable disease, with a high rate of relapse or progression after ASCT.⁴ In recent years, several prognostic factors have been identified that predict outcomes after ASCT, such

as treatment response, persistence (or not) of minimal residual disease (MRD) or cytogenetic abnormalities. In addition, researchers have shown an increased interest in immune reconstitution after this procedure, based on the premise that an early, strong and sustained recovery of the immune system could help eliminate residual myeloma plasma cells (PCs), thereby improving the final outcome. In fact, several studies have reported positive impacts of early lymphocyte recovery, the presence of oligoclonal bands or an early reconstitution of natural killer (NK) cells on survival.⁵⁻⁸

Most MM patients (85%-90%) exhibit immunoparesis at the time of diagnosis.⁹ This condition is defined as a reduction in the levels of polyclonal or uninvolved immunoglobulins (Igs).¹⁰ Several mechanisms are thought to be involved in immunoparesis, such as impaired B-cell differentiation related to humoral and cellular immune dysfunction, and the reduction of the quantity of B lymphocytes due to cytokines produced by myeloma cells (TGF- β).¹¹ Moreover, it seems that this B-cell suppression is reversible and inversely correlated with disease stage.¹² In fact, the presence of immunoparesis in smoldering myeloma is considered to be a prognostic marker of progression to symptomatic myeloma,¹⁵ and is also associated with adverse outcome in newly diagnosed symptomatic myeloma patients.⁹ In the ASCT setting, after high doses of melphalan and the infusion of stem cells, an immune reconstitution is expected, including the reappearance of functional B lymphocytes and, thereby, the recovery of polyclonal Igs.¹⁴ On this basis, we hypothesized that persistence of immunoparesis after ASCT may predict worse progression or survival in patients with MM, similarly to the other, aforementioned markers of immune dysfunction.

The primary goal of this study was to determine whether the recovery of polyclonal Igs after ASCT is of prognostic value in a cohort of patients with MM. We show that the immunoglobulin (Ig) recovery one year after ASCT is an independent prognostic factor associated with longer PFS and OS in MM patients undergoing this procedure.

Methods

We retrospectively evaluated patients from our region diagnosed with symptomatic MM, according to the 2003 criteria, who consecutively underwent ASCT at either of two referral centers, the University Hospitals of Salamanca and of León, Spain, between 1993 and 2014.

Clinical and biological data were collected by searching the medical records and databases of each hospital. Serum immunoglobulin levels (IgG, IgA and IgM) were measured by nephelometry. Immunoparesis was defined as a more than 25% decrease in one or both polyclonal Igs relative to the lowest limit of normality of each laboratory. The recovery of the Igs was established as a normalization of polyclonal Igs levels (presence of polyclonal IgG, IgA, IgM serum level above the minimum level of the normal range cited by each laboratory). Igs were collected at different time points (\pm 7 days): diagnosis, before ASCT, and 100 days, 6 months, 9 months, 1 year, 18 months after ASCT, and annually thereafter, until relapse, progression or death. In the group of patients who received tandem ASCT, Igs were evaluated after the second ASCT. However, patients who underwent tandem auto/allo-stem cell transplantation were excluded because this procedure may interfere with the pure autologous-immune

reconstitution; those patients without follow up at 100 days were also excluded.

Response to treatment was evaluated according to 2006 response criteria for MM.¹⁵ In addition, phenotypically aberrant bone marrow plasma cells (aPCs) and normal bone marrow plasma cells (nPCs) were assessed by multiparameter flow cytometry (MFC), as previously described.¹⁶ Flow MRD-negative assessed 100 days after ASCT was defined as the absence of aPCs.¹⁷

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis was performed in selected CD138 plasma cells in the bone marrow (BM) samples at diagnosis, as previously described.^{18,19}

Statistical analyses

The χ^2 , Student t-test and Mann-Whitney U tests were used to establish statistically significant differences between comparison groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant. PFS in the whole patient cohort was defined as the time from date of transplantation to relapse, progression or death, regardless of cause. OS was considered the time from transplantation to death. Patients without a recorded progression or death date were censored for PFS or OS at their last follow up. These probabilities were estimated by the Kaplan-Meier method. Ig recovery was evaluated at different time points, mentioned above, until progression or death. To explore whether Ig recovery has a prognostic role for each of those moments, and to obtain a dynamic prediction, we calculated conditional survival (CS) probabilities using the landmark approach;^{20,21} we estimated PFS or OS according to Ig recovery, given that the patient was already alive and progression free at those landmark time points, which correspond to Ig-evaluation time points. Thus, only patients who were still alive and without progression at such landmark times were included in the respective analyses. Survival curves were plotted by the Kaplan-Meier method and calculated from the landmark time point, with differences assessed by the log-rank test.

To explore the effects of potential risk factors for progression or survival, Cox proportional hazards regression model was used. Hazard Ratios (HR) were also estimated by conditional versions of the Cox regression model for the different landmark time points. In addition, analysis took into consideration the whole follow up after ASCT by treating Ig recovery as a time-varying covariate; this new time-varying covariate was then incorporated into the final multivariate model.

All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, v.20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

The study was approved by the Institutional Review Board of one of the participating centers, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Results

Patients' characteristics

A total of 342 MM patients underwent ASCT between 1993 and 2014. A total of 295 patients met the inclusion criteria and were included in this study (Figure 1). Their baseline characteristics are summarized in Table 1. There were 171 (58%) men and 124 (42%) women. Median age at diagnosis was 57 years (range 29-71 years).

Conventional chemotherapy was administered as an induction regimen in 163 patients (55%); 137 (46%) received VBMCP/VBAD (vincristine, BCNU, melphalan, cyclophosphamide, prednisone/vincristine, BCNU, doxorubicin, dexamethasone) and 24 (8%) received VAD (vincristine, adriamycin and dexamethasone). The remaining 132 patients received immunomodulatory drugs (IMiDs)

or proteasome inhibitor-based therapies: 46 patients (16%) had received VD (bortezomib and dexamethasone) and 37 patients (13%) VTD (bortezomib, thalidomide and dexamethasone).

According to the International Staging System (ISS),²¹

fifty-nine (20%) patients were categorized as having stage III. FISH studies were carried out at diagnosis in 206 patients, 45 of whom (22%) were classified as having high-risk cytogenetic abnormalities: 25 (12%) had t(4;14), 15 (7%) had del17p, and 5 (2%) had t(14;16).

Table 1. Baseline characteristics of 295 transplant-eligible myeloma patients and treatments received before and after autologous stem cell transplant (1993-2014).

Characteristics	Myeloma patients (n=295)
Male / female, n. (%)	171 (58)/124 (42)
Age at diagnosis, median, years (range)	57 (29-71)
Heavy chain type, n. (%)	
IgG	173 (59)
IgA	60 (20)
BJ	45 (15)
Non-secretory MM	14 (5)
Ig D	3 (1)
Light chain type	
kappa, n. (%)	179 (61)
lambda, n. (%)	113 (39)
Serum M-protein, median mg/dL (range)	3.4 (0-12.4)
% BM PC by morphology, mean (SD)	36 (25)
Hemoglobin, mean g/dL (SD)	10.9 (2.2)
Creatinine, mean mg/dL (SD)	1.4 (1.3)
Calcium, mean mg/dL (SD)	9.7 (1.7)
β 2 microglobulin, mean mg/dL (SD)	4.4 (3.5)
Immunoparesis at diagnosis, n. (%)	208 (84)
NA	48
ISS stage, n. (%)	
I	115 (46)
II	85 (34)
III	49 (20)
NA	46
High-risk cytogenetic, n. (%)	45 (22)
t(4;14)	25 (12)
del 17 p	15 (7)
t(14;16)	5 (2)
NA	89
Induction treatment, n. (%)	
Conventional chemotherapy	163 (55)
VBCMP/VBAD	137 (84)
VAD	24 (15)
Others	2 (1)
Novel agents	132 (45)
VD	46 (36)
VTD	37 (28)
VCD	10 (6)
Others (TD, VRD, RD, VDL-PACE)	39 (30)
Maintenance therapy	141 (57)
Interferon- α	113 (80)
Other combinations (bortezomib, thalidomide, lenalidomide)	28 (20)
NA	49

BJ: Bence Jones myeloma; MM: multiple myeloma; n: number; BMPC: bone marrow plasma cells; ISS: International Staging System; SD: standard deviation; NA: not available; VBCMP/VBAD: vincristine, BCNU, melphalan, cyclophosphamide, prednisone/vincristine, BCNU, doxorubicin, dexamethasone; VAD: vincristine, adriamycin and dexamethasone; VD: bortezomib, dexamethasone; VTD: bortezomib, thalidomide, dexamethasone; VCD: bortezomib, cyclophosphamide, dexamethasone; TD: thalidomide and dexamethasone; VRD: bortezomib, lenalidomide, dexamethasone; RD: lenalidomide, dexamethasone; VDL-PACE: bortezomib, dexamethasone, lenalidomide, cisplatin, adriamycin, cyclophosphamide, etoposide.

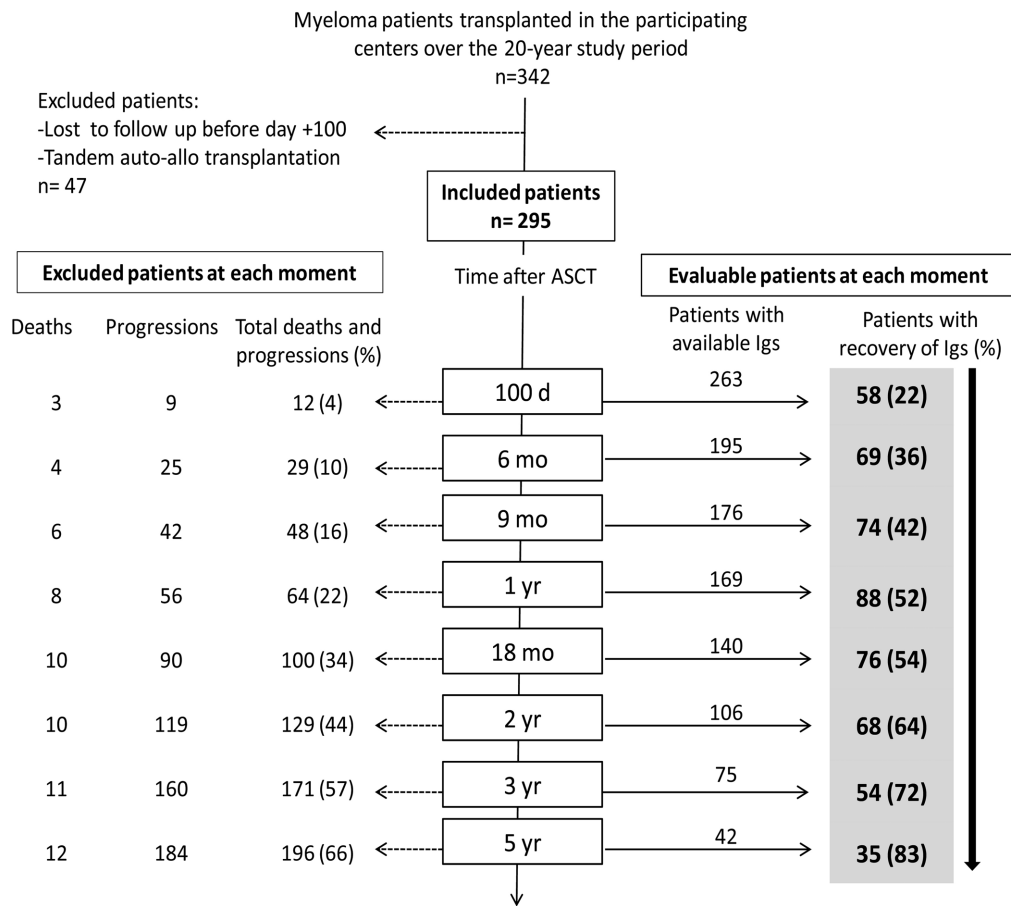


Figure 1. Kinetics of the polyclonal immunoglobulin (Ig) recovery after autologous stem cell transplantation (ASCT) in 295 myeloma patients (1993-2014). A total of 295 patients were included in the study, after excluding 47 patients who underwent tandem auto-alloSCT or those who were lost to follow up before day +100. Evaluable patients with available Igs at each time during the study are represented on the right. The gray box on the right shows the number of patients who had recovered polyclonal Igs by the different times since ASCT (center boxes). The proportion of patients with Ig recovery increases over time, indicating progressive Ig recovery after ASCT (represented by the descending black arrow) among the evaluable patients. Some patients did not have available Igs at various times (*data not shown*): 20 patients at 100 days (d); 71 at six months (mo); 71 at nine mo; 62 at one year (yr); 55 at two years; 60 at three years; and 57 patients at five years. The cumulative numbers of patients who had progressed or died at each time point, and who were therefore excluded from the Ig evaluation, are shown on the left.

ASCT features and treatment response

The median time from diagnosis to ASCT was eight months (range 3-186 months); 200 mg/m² melphalan was the standard conditioning regimen used for the majority of patients. The median infused CD34⁺ stem cell dose was more than 2 x10⁶/kg. Only one case of engraftment failure was recorded during this period (*Online Supplementary Table S1*). ASCT improved the overall response rate from 90% before ASCT to 94% after the procedure, as well as the quality of response: 106 (36%) patients showed an improved response. As a result, the complete response (CR) rate, including stringent CR (sCR), improved from 27% before ASCT to 48% after the procedure.

Kinetics of polyclonal immunoglobulin recovery and association with depth of response after transplantation

Most patients (208 patients, 84%) had immunoparesis at diagnosis, and this was associated with aggressive disease characteristics: renal impairment ($P=0.004$), IgA subtype ($P=0.04$), 40% or more BMPCs ($P<0.001$), and advanced ISS stage ($P=0.004$).

Figure 1 provides an illustrative explanation of the pro-

portion of patients who had Ig recovery at each time point after ASCT during the study; 100 days after ASCT, 58 of 263 (22%) evaluable patients had recovered polyclonal Igs, while the remaining 205 (78%) had immunoparesis. There were no significant differences between the two groups (with immunoparesis or Ig recovery) after 100 days with respect to sex, age, induction, double ASCT, cytogenetic or early neutrophil engraftment (Table 2). However, in the group with polyclonal Ig recovery there was a trend towards more complete responses [10 patients (17%) in sCR and 26 (45%) in CR] and fewer partial responses (PR) (21%) achieved by 100 days than in the group with immunoparesis persistence 100 days after transplantation [20 (10%), 73 (35%), 65 (32%) patients in sCR, CR and PR, respectively] (Table 2). None of the patients who recovered Igs had progressed in their disease or showed no response by 100 days. Moreover, there was more flow MRD-negative after 100 days among patients who had recovered Igs than in the group with immunoparesis: 20 of 58 (34%) versus 48 of 205 (23%), respectively ($P=0.08$).

One year after ASCT, 169 patients were evaluable and 81 of them had immunoparesis (48%) while the remaining 88 (52%) had experienced Ig recovery during the first

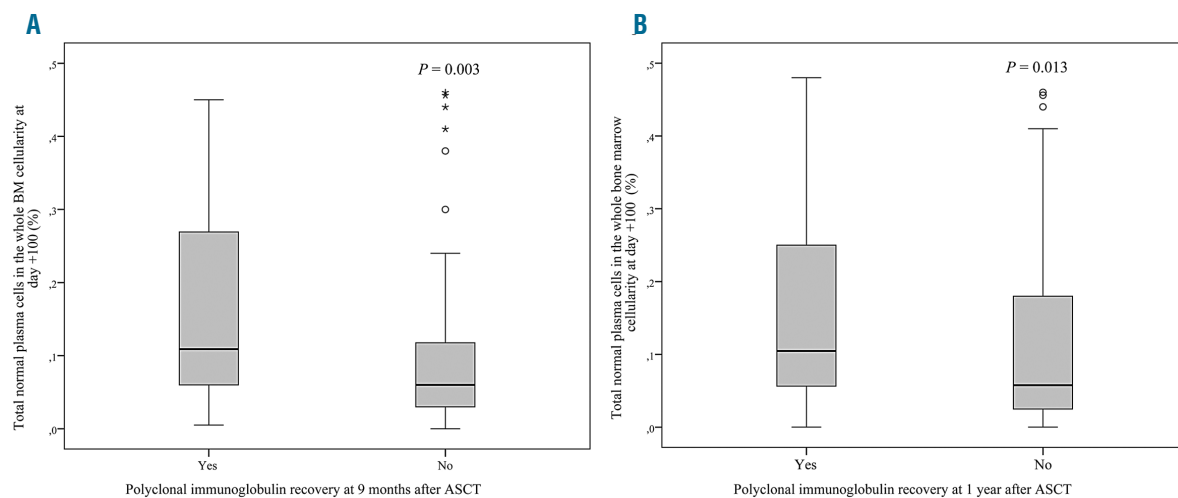


Figure 2. Box plots illustrating the association between total percentage of normal plasma cells (nPCs) in the bone marrow (BM) flow assessment at 100 days and subsequent immunoglobulin (Ig) recovery nine months (A) and one year (B) after transplantation. (A) Box plots showing the distribution of nPCs in the BM assessment 100 days by Ig recovery after nine months. Note that the group who recovered polyclonal Igs after nine months (left) had shown a significantly higher median percentage of nPCs in the previous BM assessment at 100 days: 0.11% versus 0.06%. (B) Box plots showing the distribution of nPCs after 100 days in the Ig recovery groups after one year. Patients who had recovered polyclonal Igs by one year after transplantation also had shown higher median percentages of nPCs at 100 days: 0.10% versus 0.08% nPCs, respectively. Therefore, the quantity of nPCs in the BM assessment after 100 days can predict subsequent Ig recovery after transplantation.

year since ASCT: 34 of these 88 patients (39%) had recovered Igs at 100 days, 16 (18%) at six months, 15 (17%) at nine months and 23 (26%) one year after ASCT. Therefore, there was a progressive Ig recovery after ASCT in those patients who were alive and without progression at one year. No significant differences in any baseline characteristics were found between these groups (Table 2).

In order to determine whether the recovery of nPCs is correlated with serum Ig recovery, we compared the percentage of nPCs in the bone marrow assessed by MFC after 100 days, performed in 212 patients, with the Ig recovery at various times after ASCT. As expected, the median percentage of nPCs in the plasma cell bone marrow compartment was higher in the group of 46 patients who had recovered Igs than in the group with immunoparesis after 100 days: 85.4% versus 68.2% nPCs, respectively ($P=0.004$). In addition, patients who recovered the Igs later, by nine months or one year after ASCT, had shown a higher median percentage of 100-day nPCs with respect to whole bone marrow cellularity, than those who had persistent immunoparesis at those times: 0.11% versus 0.06% ($P=0.003$) and 0.10% versus 0.08% ($P=0.013$), respectively (Figure 2). Moreover, all patients who lacked nPCs in the BM after 100 days still exhibited immunoparesis six and nine months and one year later, except for 2 patients (19%) who finally recovered Igs after one year. Therefore, the percentage of nPCs after 100 days may predict subsequent Ig recovery at various time points after ASCT and absence of nPCs may predict the persistence of immunoparesis in subsequent months.

Impact on survival of immunoglobulin recovery one year after transplantation

Median follow up for surviving patients was 59.7 months (range 7.3-301.1 months); 221 out of 295 patients (70%) progressed, relapsed or died after ASCT, with a median PFS of 30.2 months [95% Confidence Interval (CI):

25.9-34.5 months] from ASCT and a median OS for the whole cohort of 7.4 years (95%CI: 6.2-8.5 years) from ASCT.

Conditional PFS and OS were estimated at each landmark time point according to Ig recovery. Although there were no statistically significant differences between the groups with respect to Ig recovery at 100 days, six months or nine months, the median PFS tended to be slightly higher in the recovery than in the immunoparesis group: 36 versus 28 months, 41 versus 32 months and 50 versus 32 months, respectively, for each landmark time point ($P=0.3$). However, statistically significant differences in PFS and OS were found from the 1-year landmark time point (Online Supplementary Table S2).

Altogether, a total of 169 patients with available Ig data were alive and progression free one year after ASCT. Median follow up for patients with Ig recovery was 78.8 months and 85.1 months for patients who had not recovered Igs ($P=0.2$). Interestingly, median PFS was significantly longer for the 88 patients with Ig recovery than for the 81 patients without Ig recovery according to the 1-year landmark analysis: 60.4 versus 27.9 months, respectively (HR: 0.45, 95%CI: 0.31-0.66; $P<0.001$) (Figure 3).

We also explored whether the timing of Ig recovery during the first year among these 169 patients who were alive and progression free had an impact on PFS. Another landmark analysis of one year was performed for PFS according to the period of time when the Ig recovery had occurred within the previous 12 months, identifying three groups with different PFS: i) group 1 included those who had recovered the Igs within the first six months after ASCT; ii) group 2 included those who had recovered the Igs 6-12 months after ASCT; and iii) group 3 included those patients with no Ig recovery one year after ASCT. The shorter the Ig recovery time the longer was the PFS (69.3 vs. 52.9 vs. 27.9 months for groups 1, 2 and 3, respectively; $P<0.001$) (Figure 4).

Table 2. Distribution of baseline and disease characteristics by immunoglobulin recovery status 100 days and one year after autologous stem cell transplantation (n=263 and n=169).

Characteristics	Immunoparesis: 100 days n=205	Ig recovery: Ig 100 days n=58	P	Immunoparesis: 1 year n=81	Ig recovery: 1 year n=88	P
Age at diagnosis,						
≥65 year, n. (%)	42 (20)	12 (21)	0.9	19 (23)	14 (16)	0.3
<65 year, n. (%)	160 (80)	46 (79)		62 (77)	71 (84)	
BM PC by morphology, mean % (SD)	35 (25.6)	39 (24.6)	0.3	34 (21.4)	35 (27.6)	0.7
Serum M-protein, mean mg/dL (SD)	3.4 (2.6)	3.2 (2.6)	0.6	3.4	3.1	0.5
High-risk cytogenetics, n. (%)	31 (20)	10 (24)	0.5	15 (23)	10 (14)	0.2
NA	31	17		17	19	
ISS stage, n. (%):						
I	79 (45)	23 (46)		35 (46)	44 (53)	
II	64 (36)	16 (32)	0.8	27 (36)	26 (31)	0.7
III	33 (19)	11 (22)		14 (18)	13(16)	
NA	29	8		5	5	
Treatment induction, n. (%)						
Conventional chemotherapy	110 (54)	30 (52)	0.8	46 (53)	43 (49)	0.5
Novel agents	95 (46)	28 (48)		40 (47)	45 (51)	
ASCT tandem, n. (%)	18 (9)	2 (3)	0.2	7 (9)	4 (5)	0.3
Response after 100 days, n. (%)						
PD	5 (2)	0	0.1	-	-	0.1
NR	8 (4)	0		5 (6)	1 (1)	
PR	65 (32)	12 (21)		23 (28)	24 (27)	
VGPR	34 (17)	10 (17)		14 (17)	17 (19)	
CR	73 (35)	26 (45)		31 (38)	31 (35)	
sCR	20 (10)	10 (17)		8 (10)	15 (17)	
Flow negative-MRD, n. (%)	48 (23)	20 (34)	0.08	19 (23)	24 (27)	0.5
Maintenance therapy with interferon-α				45 (55)	40 (45)	0.3
NA	-	-	-	2	6	

Ig: immunoglobulin; BMPC: bone marrow plasma cells; NA: not available; ISS: International Staging System; PD: progressive disease; NR: stable disease; PR: partial response; VGPR: very good partial response; CR: complete response; sCR: stringent complete response; MRD: minimal residual disease.

Furthermore, median OS was significantly longer for the group with Ig recovery than for the group with persistent immunoparesis from the 1-year landmark point (11.3 vs. 7.3 years, $P<0.001$; HR: 0.45, 95%CI: 0.27-0.74, $P=0.002$) (Figure 5).

Conditional versions of the Cox model for 100-days and 1-year landmark time points were made taking into consideration only patients who were alive and progression free at those moments after ASCT. Altogether, 4 multivariate models were performed, for both PFS and OS at each landmark point (100 days and 1 year). Covariates significantly associated with PFS and OS were identified by univariate analysis. $P=0.05$ was considered statistically significant. Multivariate analysis was then performed including only significant factors obtained in the univariate analysis. Finally, an additional model treating Ig recovery as a time-varying covariate was performed.

The conditional version of the Cox model for 100 days, including 283 patients alive and progression free at this landmark time point is shown in *Online Supplementary Table S3*. A total of 138 patients who simultaneously had all the covariates were evaluated. Neutrophil engraftment before ten days was selected as an independent predictor for PFS, high-risk cytogenetic abnormalities were shown to be an independent predictor for both PFS and OS, and

presence of renal impairment at diagnosis for OS.

Altogether, 231 patients were alive and progression-free at one year after ASCT. In all, 134 patients were included in the multivariate analysis for PFS (Table 3) showing ISS stage III, neutrophil engraftment before ten days and Ig recovery at one year were independent factors for predicting PFS at this 1-year landmark time point. Patients with Ig recovery at one year had a 2-fold lower risk of progression or death from one year after ASCT than those who had not recovered Igs (HR 0.5, 95%CI: 0.3-0.8; $P=0.001$). In addition, 127 patients were included in the multivariate analysis for OS and Ig recovery was also selected as an independent predictor for OS at this landmark-point, (HR: 0.35, 95%CI: 0.2-0.7; $P=0.004$).

We incorporated Ig recovery as a time-varying covariate into the multivariate model and findings support the results already found by the landmark analysis: Ig recovery after ASCT was an independent predictor for PFS (*Online Supplementary Table S4*).

Discussion

This retrospective study shows that polyclonal immunoglobulin recovery occurs gradually after trans-

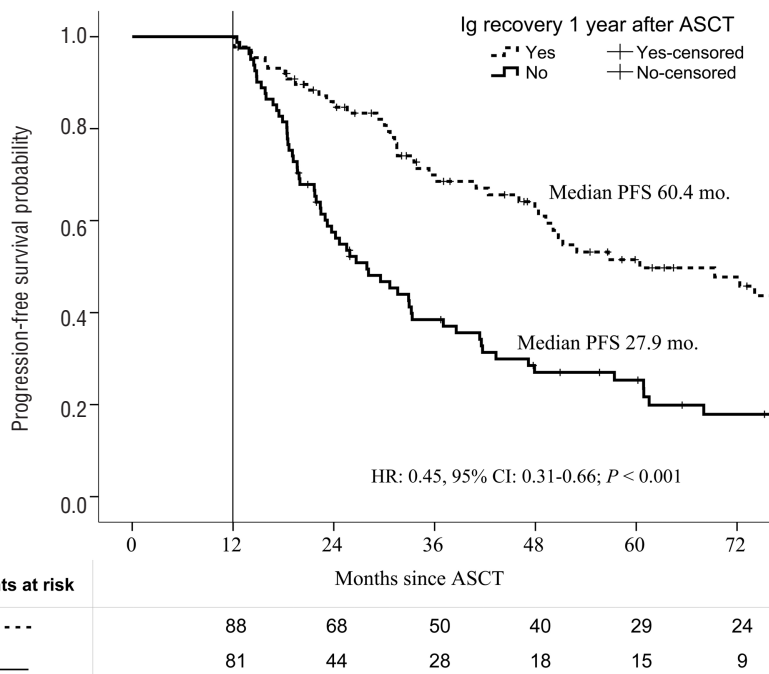
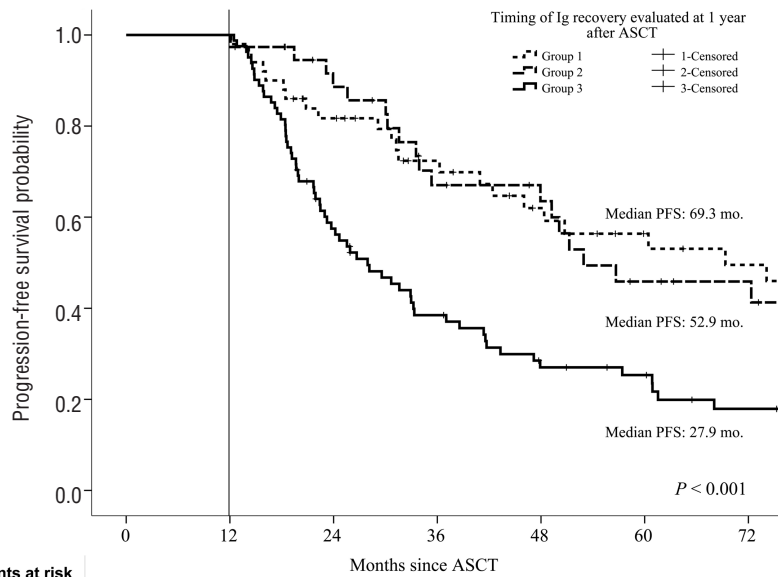


Figure 3. Kaplan-Meier curves for conditional progression-free survival (PFS) from the landmark time point of one year after autologous stem cell transplantation (ASCT) according to immunoglobulin (Ig) recovery. Estimated probability of PFS conditional on being alive and progression-free one year after ASCT, according to Ig recovery at this landmark time point (represented with a vertical line intersecting 12 months). There were 169 patients at risk, indicated below the figure, corresponding to those alive, progression-free and not censored at this landmark time point; 88 of 169 had Ig recovery and a median PFS significantly longer than those 81 patients who had not recovered Ig at this landmark time point. mo.: months; OS: overall survival; HR: hazard ratio.

Table 3. Univariate and multivariate analysis of covariates affecting progression-free survival and overall survival by conditional version of the Cox regression model for the one year landmark point.

Covariates	N (%)	PFS since 1 year after ASCT				OS since 1 year after ASCT			
		Median (months)	Univ. P	Multivariate HR (95%CI)	P	Median (years)	Univ. P	Multivariate HR (95%CI)	P
ISS									
III	35 (18)	25.6	0.006	2.1 (1.2-3.6)	0.01	4.9	0.005	1.1 (0.3-3.6)	NS
I or II	163 (82)	41.7		Ref		9.8		Ref	
NA	33								
Cytogenetic risk									
High	28 (17)	31.6	NS	–	–	6.8	0.02	2.0 (0.9-4.5)	NS
Standard	138 (83)	43.3				11.3		Ref	
NA	65								
Induction									
Conventional	131 (56)	40.9	NS	–	–	8.3	0.02	1.8 (0.8-3.7)	NS
Novel agents	100 (44)	48.4				NR		Ref	
NA	–								
PMN engraftment									
≤10day	28 (14)	67.8	0.006	0.4 (0.2-0.7)	0.004	11.7	NS	–	–
>10day	174 (86)	36.6		Ref		8.4			
NA	29								
Response 100 days									
CR	113 (49)	42.4	0.06	–	–	10.9	NS	–	–
Not CR	118 (51)	32.6				8.3			
NA	–								
Ig recovery at 1 year									
Yes	88 (52)	60.4	<0.0001	0.5 (0.3-0.8)	0.001	11.3	0.001	0.35 (0.2-0.7)	0.004
No	81 (48)	27.9		Ref		7.9		Ref	
NA	62								

ASCT: autologous stem cell transplantation; PFS: progression-free survival; mo: months; HR: Hazard Ratio; CI: Confidence Interval; univ: univariate analysis; HR: Hazard Ratio; OS: overall survival; ISS: International Staging System; PMN: neutrophils; CR: complete response; Ig: immunoglobulin; Ref: reference category; NA: data not available; NS: not significant; NR: not reached.



Patients at risk	Months since ASCT						
	0	12	24	36	48	60	72
Group 1	50	38	29	22	17	14	
Group 2	38	30	21	18	12	10	
Group 3	81	44	28	18	15	9	

Figure 4. Kaplan-Meier curves for conditional progression-free survival (PFS) from the landmark time point of one year according to timing of immunoglobulin (Ig) recovery within the first year after autologous stem cell transplantation (ASCT). Again, the probability of PFS was estimated by restricting to patients who were alive and progression-free one year after ASCT, according to the Ig recovery period. Group 1 recovered Ig before six months since ASCT, group 2 between 6-12 months after ASCT, and Group 3 had not recovered Ig at one year. Median PFS was longer for the first group, who had an earlier Ig recovery. mo.: months; OS: overall survival; HR: Hazard Ratio.

plantation and that recovery one year after ASCT is an independent prognostic factor predicting longer PFS and OS, when the B-cell reconstitution is expected to be completed. In addition, the presence of nPCs in the BM 100 days after ASCT is associated with early recovery of Igs by 100 days and with subsequent Ig recovery after nine months and one year. Therefore, we propose that Ig levels should be measured during follow up of patients undergoing ASCT.

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the presence of immunoparesis after ASCT, as well as the kinetics of polyclonal Ig recovery and its effect on outcome after ASCT. The serum Ig findings are consistent with the biological background described by Hernández *et al.*²² and Rueff *et al.*⁸ B-cell reconstitution is a delayed and progressive process beginning one month after ASCT, reaching a normal range at six months, and ending after one year when maximum B-lymphocyte levels are detected in BM.

In this context, several observations in the study are worthy of discussion. 1) Considering the 1-year period required for complete B-cell reconstitution after ASCT, we observed that 88 patients (52%) had recovered Igs by this time. One-third of those patients had already recovered their polyclonal Igs by 100 days, half of them had recovered by six months and the other half did so between six months and one year. This timing of polyclonal Ig recovery has a prognostic value in terms of PFS, reflecting the potential benefit of early immune recovery. Patients with polyclonal immunoglobulin recovery within the first six months following ASCT had significantly longer PFS than those who recovered during the next six months. In addition, engraftment of neutrophils within ten days was significantly associated with longer PFS. Several studies have also shown that rapid immune reconstitution after ASCT, both early lymphocyte recovery^{5,6} and higher levels of NK

cells after one month⁸ have a significantly positive impact on outcomes, probably due to the immune effect on residual myeloma PCs. 2) As far as nPCs are concerned, we show that a higher proportion of nPCs after 100 days was significantly associated with early polyclonal Ig recovery, although it may also predict Ig recovery in subsequent months; by contrast, the absence of nPCs after 100 days was associated with persistence of immunoparesis one year after ASCT. With respect to abnormal PCs, although immunoparesis mechanisms are not completely understood, our results also suggest that B cells are suppressed by the plasma cell clone: Ig recovery was more common in patients without aPCs or flow MRD-negative after 100 days. The findings of Tovar *et al.*⁷ provide additional evidence of a humoral response after ASCT, revealing that emergence of oligoclonal bands could be the consequence of the strong immune reconstitution that is associated with better PFS, and suggesting that there is clonal competition between myeloma PCs and polyclonal B lymphocytes. Furthermore, a sustained oligoclonal response, lasting for more than one year after ASCT, also had a positive influence on the outcomes.

Finally, the most interesting finding in our study is probably that polyclonal Ig recovery one year after ASCT was associated with significantly longer PFS and OS than in those with persistent immunoparesis: median PFS of 60 *versus* 28 months and OS of 11 *versus* 7 years, respectively. However, this significant association was not evident earlier (after 100 days). One possible explanation is that the prognostic significance of the polyclonal Ig recovery could be established only in those patients who lived long enough to have experienced complete and uneventful B-cell reconstitution one year after ASCT. Therefore, if the polyclonal Igs have recovered by this time, our results would lead us to expect a positive outcome. By contrast, persistence of immunoparesis at this time was independ-

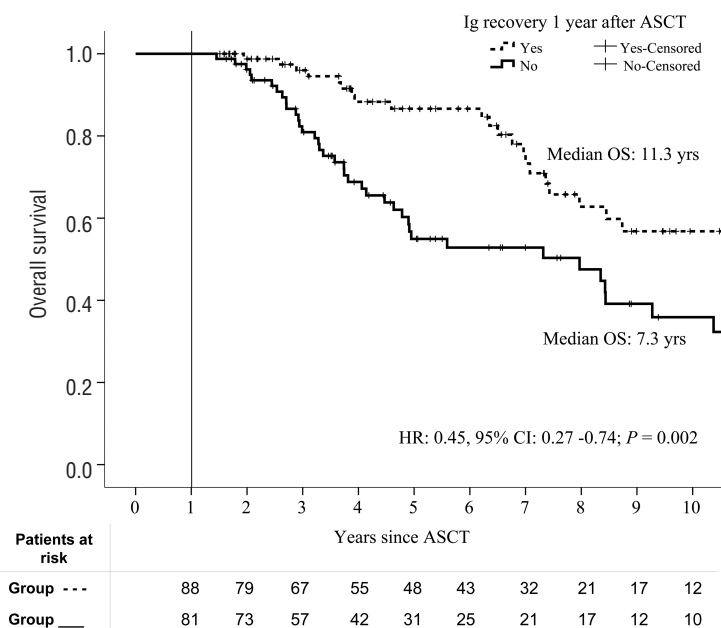


Figure 5. Kaplan-Meier curves for conditional overall survival (OS) from the landmark time point of one year after autologous stem cell transplantation (ASCT) according to immunoglobulin (Ig) recovery. Estimated probability of survival given that a patient has already survived or was not censored at one year after ASCT according to the Ig recovery. Median OS for the group with Ig recovery at this landmark time point was significantly longer than the median OS for the 81 patients without Ig recovery. yrs.: years; CI: Confidence Interval; HR: hazard ratio.

ently associated with shorter PFS and worse OS.

As a result, polyclonal Ig recovery after one year may be considered an independent long-term marker for predicting PFS and OS. Our risk-reassessment approach involves a non-invasive strategy that could be easily implemented in clinical practice. In addition, Ig quantification by standard nephelometry is a quick and highly reproducible method, at relatively low cost,²⁵ and is widely available, compared with serum Ig heavy/light chain ratio (HLC) assays. Some recent studies have reported that HLC is a predictor of PFS in MM patients at diagnosis²⁴ and after ASCT.²⁵ However, further studies are required because only one of these was conducted after ASCT, and the association with treatment response or the kinetics of HLC recovery has not yet been established.

Despite there being no definitive recommendations regarding consolidation and maintenance treatment for MM patients after ASCT,²⁶ strategies that enhance the immune reconstitution might be beneficial. In fact, interferon maintenance significantly improved OS in those patients in our series who tolerated the treatment. A recent immunotherapy study showed that patients with persistent positive MRD after treatment showed upregulation of PD-L1/PD-1, suggesting that this group of patients may benefit from PD1-blockade with anti-PD1 drugs.²⁷ In accordance with this, patients with persistent immunoparesis and absence of nPCs are a suitable cohort in which to investigate immunotherapy strategies in clinical trials that aim to enhance their immune system and subsequently achieve immune-mediated eradication of myeloma cells. However, further prospective studies are required to analyze in greater detail the impact of polyclonal Ig recovery and the immune system background after transplantation in the era of new drugs.

The presence of high-risk cytogenetic abnormalities stood out in our study as one of the most important inde-

pendent prognostic factors for progression and survival in myeloma patients, as noted in other series.^{17,19,28} Interestingly, Ig recovery after one year may also help identify patients with better subsequent long-term outcomes among those high-risk patients who live for more than one year after transplantation and who have not progressed.

In conclusion, this study, carried out in a representative series of MM patients, showed that the recovery of polyclonal Igs one year after ASCT, when B-cell reconstitution is expected to have concluded, had occurred in half of the patients and was an independent long-term marker of progression and survival. This recovery of Igs was a gradual process following ASCT that could be predicted on the basis of the percentage of underlying nPCs detected by flow cytometry in the bone marrow assessment after 100 days. If these results were confirmed in other studies, they might facilitate the selection of candidate patients requiring consolidation/maintenance therapy after ASCT, and even the establishment of immunotherapy strategies to enhance their immune system and improve their outcomes in the setting of clinical trials.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the investigators of the Cooperative Group for the study of Monoclonal Gammopathies of Castilla y León; the patients for their participation in this study; Llorenç Badiella for assistance with statistical analysis and Phill Mason for assistance with English language.

Funding

Eduardo Sobejano was supported by the Fundación AMIR (Convocatoria Becas de Investigación Pregrado Academia AMIR 2014). Veronica Gonzalez-Calle was supported by the Fundación Española de Hematología y Hemoterapia and Janssen (Beca Estancias de Investigación en el Extranjero Convocatoria 2015-2016).

References

1. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med.* 1996;335(2):91-97.
2. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348(19):1875-1883.
3. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2014;371(10):895-905.
4. Fernandez de Larrea C, Jimenez R, Rosinol L, et al. Pattern of relapse and progression after autologous SCT as upfront treatment for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(2):223-227.
5. Porrata LF, Gertz MA, Inwards DJ, et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2001;98(3):579-585.
6. Kim H, Sohn HJ, Kim S, et al. Early lymphocyte recovery predicts longer survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(11):1037-1042.
7. Tovar N, de Larrea CF, Arostegui JJ, et al. Natural history and prognostic impact of oligoclonal humoral response in patients with multiple myeloma after autologous stem cell transplantation: long-term results from a single institution. *Haematologica.* 2013;98(7):1142-1146.
8. Rueff J, Medinger M, Heim D, Passweg J, Stern M. Lymphocyte subset recovery and outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for plasma cell myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(6):896-899.
9. Kastiris E, Zagouri F, Symeonidis A, et al. Preserved levels of uninvolved immunoglobulins are independently associated with favorable outcome in patients with symptomatic multiple myeloma. *Leukemia.* 2014;28(10):2075-2079.
10. Kyrtsolis MC, Mouzaki A, Maniatis A. Mechanisms of polyclonal hypogammaglobulinaemia in multiple myeloma (MM). *Med Oncol.* 1999;16(2):73-77.
11. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma. *Leukemia.* 2010;24(1):22-32.
12. Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, et al. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol.* 1998;100(1):176-183.
13. Perez-Persona E, Vidriales MB, 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.* 2007;110(7):2586-2592.
14. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 1998; 92(5):1471-1490.
15. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia.* 2006; 20(9):1467-1473.
16. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, et al. 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.
17. Kaufman GP, Gertz MA, Dispenzieri A, et al. Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia.* 2016; 30(3):633-639.
18. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2012;97(8):1272-1277.
19. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia.* 2007;21(1):143-150.
20. Hieke S, Kleber M, Konig C, Engelhardt M, Schumacher M. Conditional Survival: A Useful Concept to Provide Information on How Prognosis Evolves over Time. *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1530-1536.
21. Delgado J, Pereira A, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Rozman C. Survival analysis in hematologic malignancies: recommendations for clinicians. *Haematologica.* 2014; 99(9):1410-1420.
22. Hernandez MD, del Canizo MC, Gonzalez M, et al. [Immune reconstitution after autologous progenitor hemopoietic cell transplantation. A study comparing autologous bone marrow and autologous peripheral blood transplantation]. *Med Clin (Barc).* 1998;110(20):768-773.
23. Sherrod AM, Hari P, Mosse CA, Walker RC, Cornell RF. Minimal residual disease testing after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(1):2-12.
24. Bradwell A, Harding S, Fourrier N, et al. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'kappa/Ig'lambda ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia.* 2013; 27(1):202-207.
25. Tovar N, Fernandez de Larrea C, Elena M, et al. Prognostic impact of serum immunoglobulin heavy/light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission after autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(7):1076-1079.
26. Mohty M, Richardson PG, McCarthy PL, Attal M. Consolidation and maintenance therapy for multiple myeloma after autologous transplantation: where do we stand? *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(8):1024-1029.
27. Paiva B, Azpilikueta A, Puig N, et al. PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. *Leukemia.* 2015; 29(10):2110-2113.
28. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood.* 2005;106(8):2837-2840.

Supplementary Table 1. Autologous stem cell transplantation characteristics (1993-2014).

Characteristics	MM (n=292)
Time from diagnosis to ASCT, median months (range)	8 (3-186)
Age at ASCT, median years (range)	59 (29-71)
Number of previous chemotherapy regimens, median (range)	1 (1-4)
1, no. (%)	235 (80)
2, no. (%)	45 (15)
≥3, no. (%)	15 (5)
Mobilization regimen PBSC, no.	
G-CSF alone (5mcg/kg sc)	231 (79)
Cyclophosphamide + G-CSF	61 (20)
Other	2 (1)
Infused dose CD34+ cells, x10 ⁶ /kg median, (range)	4.0 (0.4-7.7)
Infused dose MNC, x10 ⁸ /kg, median, (range)	2.5 (0.2-26.5)
Conditioning regimen, no (%):	
Melphalan 200 mg/m ²	264 (89)
Melphalan reduced dose	12 (4)
Busulphan + Melphalan	14 (5)
Other	5 (2)
Tandem ASCT, no. (%)	21 (7)
Time to ANC >500/μL, days, median (range)	11 (5-41)
Time to platelets >20,000/μL, days, median (range)	12 (0-67)
Time to platelets >50,000/μL, days, median (range)	15 (7-188)
Graft failure, no. (%)	1(0.4)
Total length of hospitalization during ASCT, median days (range)	19 (14-82)
MRT, no. deaths related to transplant (%)	6 (1.7)

ASCT: autologous stem cell transplantation ; no. : number; PBST: peripheral blood stem cells; G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor; MNC: mononuclear cells; ANC: absolute neutrophil count; MRT: mortality related to transplantation.

Supplementary Table 2. Comparison of progression-free survival and overall survival from the different landmark points according to the Ig recovery after transplantation.

Time after ASCT	No. patients		Median PFS (mo)			Median OS (yr)		
	Imm group	Ig Rec	Imm group	Ig Recovery	P value	Imm group	Ig Recovery	P value
100 days	205	58	28.0	35.8	NS	0	8.0	NS
6 months	126	69	31.6	40.9	NS	7.4	8.4	NS
9 months	102	74	31.6	49.2	NS	7.9	11.3	NS
1 year	81	88	27.9	60.4	<0.001	7.9	11.3	0.001
18 months	64	76	37.0	69.3	.003	8.3	13.7	.003
2 years	38	68	43.3	87.1	.003	11.1	13.8	NS
3 years	21	54	94.2	95.0	.NS	NR	13.7	NS
5 years	7	35	98.9	122.3	NS	NR	17.3	NS

ASCT: autologous stem cell transplantation; Rec: recovery; PFS: progression free survival; mo: months; OS: overall survival; Imm: immunoparesis; Ig: immunoglobulin; mo: months; yr: years; NR: not reached; NS: not significant.

Supplementary table 3a. Univariate and Multivariate analysis of covariates affecting PFS by conditional version of the Cox regression model for 100-days landmark point. 283 patients alive and progression-free at this moment are included.

Covariates	n (%)	PFS after ASCT since 100 days			
		Median (mo)	Univ.	Multivariate	
			P value	HR (95%)	P value
ISS III I or II NA	48 (20) 197 (80) 38	18.4 32.4	0.002	1.4 (0.8-2.4) Ref	NS
Cytogenetic-risk: High Standard NA	43 (21) 161 (79) 79	19.9 35.3	0.001	1.7 (1.1-2.7) Ref	0.03
Renal impairment at diagnosis Yes No NA	37 (20) 152 (80) 94	16.8 29.1	0.06	-	-
Induction Conventional Novel agents NA	156 (55) 127 (45) -	31.6 30.2	NS	-	-
PMN engraftment ≤10day >10day NA	32 (13) 221 (87) 30	60.8 29.6	0.004	0.4 (0.2-0.8) Ref	0.02
Response before ASCT <PR ≥PR NA	26 (10) 257(90) -	15.9 32.9	0.001	1.2 (0.9-1.7) Ref	NS
Response 100 days CR Not CR NA	135 (47) 146 (53) -	35.3 27.4	0.09	-	-
Ig recovery 100 days Yes No NA	58 (22) 205 (78) 20	35.9 28.1	NS	-	-
Interferon maintenance Yes No NA	112 (45) 128 (55) 43	33.2 22.4	0.05	0.6 (0.4-1.1) Ref	NS

Supplementary table 3b. Univariate and Multivariate analysis of covariates affecting OS by conditional version of the Cox regression model for 100-days landmark point. 283 patients alive and progression-free at this moment are included.

Covariates	n (%)	OS after ASCT since 100 days			
		Median (yr)	Univ.	Multivariate	
			P value	HR (95%)	P value
ISS					
III	48 (20)	4.6	0.001	1.6 (0.6-4.1)	NS
I or II	197 (80)	8.3			
NA	38				
Cytogenetic-risk:					
High	43 (21)	3.5	0.0001	2.4 (1.2-4.8)	0.01
Standard	161 (79)	11.1			
NA	79				
Renal impairment at diagnosis					
Yes	37 (20)	4.8	0.01	2.3 (1.1-4.8)	0.03
No	152 (80)	9.3			
NA	94				
Induction					
Conventional	156 (55)	6.7	0.06	-	-
Novel agents	127 (45)				
NA	-				
PMN engraftment					
≤10day	32 (13)	9.8	NS	-	-
>10day	221 (87)	7.1			
NA	30				
Response before ASCT					
<PR	26 (10)	4.8	NS	-	-
≥PR	257(90)	7.4			
NA	-				
Response 100 days					
CR	135 (47)	8.4	NS	-	-
Not CR	146 (53)	7.3			
NA	-				
Ig recovery 100 days					
Yes	58 (22)	8.0	NS	-	-
No	205 (78)	7.0			
NA	20				
Interferon maintenance					
Yes	112 (45)	8.4	0.04	0.5 (0.3-0.9)	0.05
No	128 (55)	7.1			
NA	43				

Supplementary Table 4. Multivariate analysis with Immunoglobulin recovery as time-varying covariate.

Variable	PFS	
	Multivariate	
	HR (95%)	P value
ISS III I or II	2.2 (1.1-4.3) Ref	0.018
Cytogenetic-risk: High Standard	2.3 (1.4-3.9) Ref	0.0011
Induction Conventional Novel agents	1.7 (1.1-2.8) Ref	0.0236
PMN engraftment >10day ≤10day	1.9 (0.9- 4.0) Ref	NS
Response 100 days Not CR CR	1.3 (0.8-2.0) Ref	NS
Ig recovery 1 yr No Yes	1.8 (1.1–2.9) Ref	0.0154

PFS: progression free survival; HR: hazard ratio; ISS: International staging system; PMN: neutrophils; CR: complete response; Ig: immunoglobulin; Ref: reference category; NS: not significant.

CONCLUSIONES

1. En relación al valor de la proteinuria de Bence Jones en pacientes diagnosticados de mieloma asintomático (MMQ):
 - La proteinuria de Bence Jones fue un marcador independiente de progresión a mieloma múltiple (MM). La validación de este resultado justificaría un seguimiento más estrecho de los MMQ con proteinuria de Bence Jones.
 - El nivel de proteinuria de Bence Jones > 500 mg al día identificó a pacientes con un riesgo muy alto de progresión a MM. La confirmación de este resultado en otros estudios podría suponer la inclusión de estos pacientes en el grupo de mielomas candidatos a tratamiento.

2. En cuanto al modelo de riesgo R-ISS aplicado en pacientes con MM que recibieron trasplante autólogo en la Clínica Mayo y el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca:
 - El R-ISS fue un factor pronóstico independiente para la supervivencia global.
 - Los pacientes del grupo R-ISS II pudieron reclasificarse en dos subgrupos, con diferente supervivencia global de acuerdo a la presencia o ausencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo.

3. En relación a la identificación de factores pronósticos en el MM tras el trasplante autólogo:
 - La recuperación de las inmunoglobulinas policlonales fue un proceso gradual que se asoció con la proporción de CP normales en la médula ósea detectadas por citometría en el día +100.
 - Esta recuperación un año después del trasplante autólogo fue un marcador independiente de progresión y supervivencia a largo plazo.

SUMMARY
(MENCIÓN INTERNACIONAL)



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGÍA**

**'PROGNOSTIC FACTORS IN MULTIPLE MYELOMA IN
ASYMPTOMATIC AND SYMPTOMATIC PHASE'**

**DOCTORAL THESIS PRESENTED BY
Verónica González de la Calle**

**DIRECTORS
Dr. M.V. Mateos Manteca
Dr. N.C. Gutiérrez Gutiérrez**

INTERNATIONAL DOCTORATE MENTION

Salamanca, 2018

Rationale and Hypotheses

Multiple myeloma (MM) is a clinically heterogeneous neoplastic disease in which the identification of prognostic markers is essential for predicting the course of the disease in each patient, and thus to design therapeutic strategies aimed at preventing the onset of relapse and, therefore, prolonging survival.

The prognostic evaluation of MM throughout the natural history of the disease requires the use of both prognostic factors present at the time of diagnosis and markers dependent on time and influenced by the treatments. In the first place, given that practically all MM are preceded by asymptomatic gammopathies, the availability of prognostic markers that predict the risk of progression from asymptomatic or smoldering myeloma (SMM) to MM acquires great relevance. On the other hand, at the time of diagnosis of MM, although there are new models that integrate prognostic markers related to the patient and the biology of the disease, its applicability is not fully consolidated. Finally, in young patients, autologous stem cell transplantation (ASCT) is a key part in the treatment strategy, however the disease remains incurable with the emergence of relapses after transplant. Therefore, a dynamic prognostic evaluation is required to predict the risk of relapse and survival at different times after transplantation and to guide clinical decision-making, especially nowadays with the approval of maintenance and immunotherapy strategies.

The risk of progression to MM among patients with SMM is not uniform: there is a group of patients with a high risk of progression, 50% at 2 years of diagnosis, and a group with a very high risk of progression, more than 80% at 2 years. This last group has been considered MM according to the diagnostic criteria of 2014 and benefits from receiving treatment before CRAB symptomatology appears. In this context, there is a growing interest in identifying at the time of SMM diagnosis markers that allow to determine with greater accuracy the risk of progression to MM. The presence in the urine

Rationale and Hypotheses

of monoclonal light chain of immunoglobulins or Bence Jones protein (BJ) is a tumor marker whose determination is standardized in the majority of centers. To date, the value of BJ proteinuria as a prognostic marker of progression to MM has not been investigated. The confirmation of this hypothesis would suppose to have a measurable parameter in the daily clinical practice, able to identify patients with SMM with high risk of progression to MM and therefore, that require a more frequent follow-up or, even, with very high risk of progression that require anti-myeloma treatment.

The most widely used prognostic model at diagnosis of MM is the ISS. However, it was developed in a series of patients who did not receive new drugs and therefore, some groups question its clinical utility. In 2015, the International Myeloma Working Group (IMWG) proposed the revised ISS (R-ISS), a risk stratification model developed in a study that included a large number of candidate and non-candidate myeloma patients treated in clinical trials. Unlike the ISS, it incorporates variables related to the biology of the tumor cell, such as high-risk cytogenetic abnormalities and LDH. Since it is a recent model, it has not been widely validated yet in clinical practice, especially in the context of the ASCT. Moreover, although it discriminates three groups of patients, most of them are in the R-ISS II group and it is only possible to identify a small group of patients in which we can predict extreme survivals, both long and short. Therefore, it is necessary to validate the R-ISS and to investigate the R-ISS II group in order to identify different subgroups of patients with a more accurate prognosis. To this end, we have selected a series of patients treated with new drugs and ASCT in two referral centers, such as the Mayo Clinic and the University Hospital of Salamanca.

Finally, despite the prolongation of the survival of patients with MM in recent decades, MM remains an incurable disease, with a clinical course defined by the occurrence of relapses with shorter and shorter disease-free periods, with a lot of variability among patients. In one third of cases, MM affects young patients, whose standard treatment is an induction followed by high doses of chemotherapy and ASCT.

The definition of markers to identify patients with a higher risk of relapse and short survival after ASCT in order to establish individualized post-transplant therapeutic strategies is of great interest. Immunoparesis is defined by the decrease of polyclonal immunoglobulins (Igs) and is related to a reversible suppression of B cell precursors. It is a common condition at the time of diagnosis that is associated with poor prognosis in myeloma patients, although there is no evidence about its prevalence and clinical significance after ASCT. The results provided by several studies showed a positive impact of early and sustained immune recovery after ASCT. It would be expected, therefore, that after the ASCT there would be a recovery of the polyclonal Igs that would delay the appearance of relapses and would be associated with a better prognosis, and vice versa, the persistence of immunoparesis could be a marker of immune dysfunction that predicts progression after TAPH. The opportunity to have a large number of patients with MM treated at the University Hospital of Salamanca, which is a referral center of Castilla y León for the transplant procedure since the 1990s, will allow the evaluation of this hypothesis.

Aims

1. To determine the role of Bence Jones proteinuria in asymptomatic myeloma (SMM) as a prognostic marker of progression to multiple myeloma (MM).
 - i. To identify a potential cut-off level of BJ proteinuria with prognostic value in SMM.
 - ii. To validate the Mayo Clinic and the Spanish Myeloma group prognostic models for SMM and to establish a comparison with BJ proteinuria as a potential prognostic factor.

2. To validate the new prognostic model R-ISS in a series of patients with MM who have received new drugs and autologous stem cell transplantation (ASCT).
 - i. To compare the prognostic classification made by the ISS with the R-ISS model.
 - ii. To analyze the prognostic value of the cytogenetic abnormalities detected by FISH and its implication in the new prognostic model.
 - iii. To identify subgroups with different prognosis within the R-ISS II group.

3. To evaluate the prognostic impact of the recovery of polyclonal immunoglobulins in patients with MM at different times post-ASCT.
 - i. To determine the prevalence, determinants and dynamics of the recovery of polyclonal immunoglobulins after ASCT in the MM.
 - ii. To validate other commonly recognized prognostic factors in the ASCT.
 - iii. To analyze the efficacy of the ASCT in terms of response, progression-free survival and overall survival.

Summary Paper 1

BENCE JONES PROTEINURIA IN SMOLDERING MULTIPLE MYELOMA AS A PREDICTOR MARKER OF PROGRESSION TO SYMPTOMATIC MULTIPLE MYELOMA

INTRODUCTION: Smoldering multiple myeloma (SMM) represents an intermediate stage between monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) and multiple myeloma (MM), with a risk of progression to MM of 10% per year. This risk is not uniform, some patients have a risk of progression similar to GMSI, 1% per year, while others have a high-risk of progression, 10% per year. Models such as the proposed by the Mayo Clinic or the Spanish Myeloma group, validated in prospective studies, identify high-risk patients, with a 50% of probability of progression to MM within the 2 years from diagnosis. Bence Jones proteinuria (BJ), defined by the presence of light chain monoclonal immunoglobulins in the urine, is associated with tumor burden, and to the best of our knowledge, there is no clear evidence on its prognostic role at diagnosis in patients with SMM.

AIMS: 1) To investigate whether the presence of BJ proteinuria in patients with SMM predicts progression to MM. 2) In such case, to establish a cut-off point for the amount of BJ proteinuria with prognostic value. 3) To validate in this series the risk models proposed by the Mayo Clinic and the Spanish Myeloma group.

METHODS: In collaboration with the group of Monoclonal Gammopathies of Castilla y León, a retrospective study consisting of a systematic review of clinical-biological data of patients consecutively diagnosed with SMM in Castilla y León and Plasencia, between 1986 and 2013 was carried out. The primary objective was time to progression (TTP), defined as the time from diagnosis to progression to MM, which was established by the appearance of CRAB symptoms according to the 2003 diagnostic criteria. The study was carried out following the ethical principles of the Declaration of Helsinki.

RESULTS: 152 patients with SMM in Castilla y León and Plasencia were included in this study. In 41 patients (27%) BJ proteinuria was detected at diagnosis, of which 24

(58%) presented BJ kappa and the remaining 17 (42%), lambda. The median protein concentration of BJ was 100 mg in 24 hours and 7 patients had ≥ 500 mg in 24 hours. 36 patients (24%) had a high-risk SMM and 58 patients (40%) according to the Mayo Clinic model and Spanish model, respectively.

With a median follow-up of 65 months, the median TTP of the global series was 68 months, with a 5-year probability of progression of 49%. In patients with BJ proteinuria at diagnosis ($n = 41$), 24 progressed, with a median TTP significantly shorter than in patients without proteinuria of BJ: 21.7 months vs. 88.3 months (HR = 2.3, 95% CI: 1.4 - 3.4, $P = 0.002$), which translated into a probability of progression at 2 years of 51%. When analyzing whether the amount of BJ proteinuria differentiated subgroups of patients with different risk of progression, it was found that those with ≥ 500 mg in 24h presented a median TTP of 13.3 months (HR = 2.4, 95% CI: 1.6 - 3.6, $P < 0.001$), with a probability of progression at 18 months of 80%. In the univariate analysis, the Mayo Clinic and the Spanish risk model were validated. In addition, in the multivariate analysis, the presence of BJ proteinuria at diagnosis was also an independent prognostic factor to predict progression to MM (HR = 2.3, 95% CI: 1.4-3.9, $P < 0.001$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS: In this series of patients with SMM, BJ proteinuria was detected at diagnosis in almost 30% of patients. BJ proteinuria was associated independently with an increased risk of progression to MM, similar to high-risk SMM according to the criteria of the Mayo Clinic and the Spanish group: 51% risk of progression at 2 years. In patients with a BJ protein excretion of at least 500 mg per day, the median TTP was over 1 year, therefore, a subgroup of patients could be identified with an imminent risk of developing MM. If these results were validated in prospective studies, BJ proteinuria could be considered as a biomarker that allows the identification of patients with SMM at high-risk of progression to MM. Moreover, the detection of at least 500 mg of BJ proteinuria in 24 hours would help in the identification of patients with ultra-high risk of progression, and therefore, candidates for early treatment to prevent the development of CRAB symptoms.

Summary Paper 2

EVALUATION OF REVISED INTERNATIONAL STAGING SYSTEM (R-ISS) FOR TRANSPLANT-ELIGIBLE MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

INTRODUCTION: The International Myeloma Working Group (IMWG) proposed a new prognostic model in 2015, the revised ISS or R-ISS, which combines ISS with LDH values as well as the presence of the following high-risk cytogenetic abnormalities (HR CTG): (t(4;14), t(14;16) and del(17p) .This model was made based on a series of more than 3,000 patients, eligible and not eligible transplant patients, included in controlled and randomized prospective studies. Given its recent publication, this model has not been widely validated in patients treated with autologous stem cell transplantation (ASCT) outside clinical trials.

AIMS: To evaluate the R-ISS in transplant-eligible multiple myeloma (MM) patients in clinical practice.

METHODS: A retrospective study was conducted and patients with newly diagnosed MM consecutively treated with ASCT between 2005 and 2014 at the Mayo Clinic in Arizona and the University Hospital of Salamanca were included. The inclusion criteria were based on the availability of all the variables included in the R-ISS at diagnosis: LDH, albumin, β 2M, and cytogenetic abnormalities detected by FISH, as well as having received proteasome inhibitors or IMiDs in the induction treatment. The primary objective was overall survival (OS) defined as the time from ASCT to death from any cause. The study was carried out following the ethical principles of the Declaration of Helsinki.

RESULTS: 134 patients met the inclusion criteria and were included in the study. According to the ISS model, 62 patients (46%) were classified as ISS I, 38 (28%) were ISS II, and 36 (26%) were ISS III. In relation to other variables, 39 patients (29%) presented HR CTG at diagnosis and 17 patients (13%) with high LDH. Patients were reclassified according to R-ISS, resulting in 44 patients (33%) with R-ISS I, 75 patients

(56%) with R-ISS II; and 15 (11%) with R-ISS III. In total, 18 patients previously classified as ISS I and 19 as ISS III were reclassified as R-ISS II.

With a median follow-up of 60 months, the median OS of the global series was 111 months. Patients with R-ISS III had a significantly lower median OS than patients with R-ISS II or R-ISS I (37.2 vs. 110.9 months vs. unreached, respectively, $P < 0.0001$). The probability of 5-year OS was: 28%, 68% and 86% for R-ISS III, II and I, respectively. In the multivariate analysis, the R-ISS was an independent prognostic marker for OS, with a HR = 6.9; 95% CI: 2.4-20.3; $P = 0.001$ for the comparison between R-ISS III and R-ISS I, and a HR = 1.5; 95% CI: 0.6-3.6; $P = \text{NS}$ for the comparison between R-ISS II and R-ISS I.

In order to analyze the impact of the presence HR CTG abnormalities in the R-ISS II group, patients of that group were reclassified according to the absence or presence of HR CTG abnormalities, IIa and IIb, respectively. In the survival analysis, statistically significant differences in OS were demonstrated among the 4 resulting groups: 44 (33%) patients with R-ISS I with a median OS not reached; 50 (37%) patients with R-ISS IIa with a median of 111 months; 25 (19%) patients with R-ISS IIb and a median of 70 months; and 15 (11%) patients with R-ISS III and a median of 37 months, $P < 0.001$.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS: The prognostic evaluation of transplant-eligible patients using the R-ISS was reproducible and predicted OS in our series, with similar results to those published by the IMWG in the subgroup of eligible transplant patients. A consequence of the reclassification of these patients based on the R-ISS was that the intermediate risk group (R-ISS II) was more heterogeneous and large. When dividing these patients according to the presence or absence of HR CTG, 2 groups with different survival were identified. If these results were validated in prospective studies, they would improve the prognostic evaluation of patients categorized with intermediate risk according to the R-ISS.

Summary Paper 3

RECOVERY OF POLYCLONAL IMMUNOGLOBULINS ONE YEAR AFTER AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION AS A LONG-TERM PREDICTOR MARKER OF PROGRESSION AND SURVIVAL IN MULTIPLE MYELOMA

INTRODUCTION: Immunoparesis is defined by the decrease in polyclonal immunoglobulins (Igs). Many patients have immunoparesis at the time of diagnosis, related to a reversible suppression of B cell precursors in the bone marrow (BM) and its presence has been considered as a poor prognostic marker. However, the dynamics of Igs recovery after autologous stem cell transplantation (ASCT) and its prognostic role have not been studied to date.

OBJECTIVE: To determine the prevalence, determinants and dynamics of Igs recovery after the ASCT and to evaluate the prognostic impact of this recovery.

METHODS: A multicenter retrospective study was designed and patients with MM consecutively treated with ASCT at the University Hospital of Salamanca and Hospital of León between 1993 and 2013 were included. Clinical and biological data were collected, including the quantification of Igs by nephelometry in the following moments: diagnosis, prior to the ASCT, every 3 months in the first year post-transplant and subsequently, annually until 5 years after transplantation or until the time of relapse or progression. Immunoparesis was defined as the decrease in Igs by 25% of the lower limit of normality according to each laboratory.

To determine the differences in progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) among patients with or without recovery of Igs at moments indicated, the survival probability conditioned to be alive and without progression in each one was calculated based on the recovery or not of the Igs, through the landmark analysis approach. Patients who received an allogeneic transplant after ASCT and those who were lost

follow-up at day 100 were excluded from the study. The study was carried out following the ethical principles of the Declaration of Helsinki.

RESULTS: A total of 342 MM patients were treated with ASCT. Of these, 295 met the inclusion criteria and were included in the analysis. 208 patients (84%) had immunoparesis at the time of diagnosis. By day +100 of the ASCT, 58 patients (22%) had the Igs recovered and this recovery was associated with the presence of a higher percentage of normal plasma cells in BM (nPCs), quantified by flow cytometry, with a median of nPCs of 85% vs. 68% in the group of patients with persistent immunoparesis, $P = 0.004$. In addition, the presence of a greater percentage of nPCs within the total BM cellularity at day +100 was associated with a higher probability of subsequent recovery of Igs, at 9 months and a year after the ASCT. While the majority of patients without nPCs at +100 did not recover the Igs later. One year after ASCT, 81 patients (48%) had persistence of immunoparesis and 88 patients (52%) had recovered the Igs: 34 patients (39%) had already recovered the Igs per day +100; 16 (18%) at 6 months; 15 (17%) at 9 months and 23 (26%) recovered them just a year after ASCT.

After a median follow-up of 60 months, the median PFS from the ASCT in the global series was 30.2 months (95% CI: 25.9 - 34.5 months) and the median OS was 7.4 years (95% CI: 6.2 - 8.5 years). The conditioned probabilities of progression and survival were estimated in each one of the Ig-evaluation moments and no statistically significant differences were found between the recovery of Igs and the persistence of immunoparesis neither at +100 nor at 6 or 9 months. However, patients with Ig recovery after 1 year of ASCT had a significantly longer median PFS than those with persistent immunoparesis: 60.4 versus 27.9 months, respectively (HR: 0.45; 95%: 0.31 - 0.66, $P < 0.001$). These differences were also found in OS; 11.3 vs. 7.3 years, respectively (HR: 0.45, 95% CI: 0.27-0.74, $P = 0.002$). In another landmark analysis performed one year after ASCT, patients who had recovered the Igs in the first 6 months had a longer median PFS than those with recovery between 6 months, 1 year after ASCT or those without recovery: 69.3 vs. 52.9 vs. 27.9 months, respectively, $P < 0.001$. Finally, the

multivariate analysis confirmed that the recovery of the Igs 1 year after ASCT is an independent prognostic factor for PFS and OS.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS: Although the majority of patients presented immunoparesis at the time of diagnosis, there was a progressive recovery of the Igs among patients who did not progress after ASCT. The recovery of the Igs 1 year after ASCT was an independent prognostic marker of progression and survival. This moment corresponds with the maximum recovery of B lymphocytes after ASCT, according to other studies. In addition, a greater proportion of nPCs on day 100 was associated with a recovery of Igs at that time and could help predict the subsequent recovery, at 9 months and 1 year of the ASCT. If these results were validated in a prospective study, the persistence of immunoparesis could be a marker of immune dysfunction that would help in the selection of candidates for immunotherapy strategies.

Conclusions

1. With regard to the role of Bence Jones proteinuria at diagnosis of smoldering myeloma (SMM):
 - Bence Jones proteinuria was an independent progression marker for MM, therefore identifying high-risk SMM patients. Validation of this result would promote closer follow-up of these patients.
 - A level of Bence Jones proteinuria greater or equal to 500 mg per day identified patients with ultra-high risk of progression to MM. If validated, these patients could be reclassified within the MM group, requiring therapy before the end-organ damage development.

2. Concerning the R-ISS risk model applied in MM patients who received an autologous transplant at the Mayo Clinic and the University Hospital of Salamanca:
 - The R-ISS remained an independent predictor of overall survival.
 - Patients with R-ISS II stage were reclassified into two subgroups, that significantly differed in overall survival according to the presence or absence of high-risk cytogenetic abnormalities.

3. Regarding the identification of prognostic markers after autologous transplant in MM:
 - Our findings demonstrated that the recovery of polyclonal immunoglobulins was a gradual process, predicted on the percentage of normal plasma cells detected by flow cytometry in the day 100 bone marrow assessment.
 - The recovery of polyclonal immunoglobulins one year after an autologous transplant was an independent and dynamic long-term marker of progression and survival.

FINANCIACIÓN RECIBIDA PARA ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

La doctoranda fue beneficiaria de la Beca de estancias de Investigación en el extranjero 2016-2017 de la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH-Janssen) para la realización de una estancia de investigación de un año de duración en la Clínica Mayo de Scottsdale (Arizona), en el laboratorio del Dr. R. Fonseca.

Dicha estancia fue aprobada por la Comisión académica de Doctorado dentro de las actividades de doctorado y para optar a la Mención de Doctor Internacional.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Glosario

Ac: anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Alb: albúmina.

AR: alto riesgo.

BJ: Bence-Jones.

β 2M: β 2 microglobulina.

CMF: citometría de flujo.

CMs: componente monoclonal en suero.

CP: célula plasmática.

CPH: células progenitoras hematopoyéticas.

CPMO: células plasmáticas en médula ósea.

EDM: eventos que definen mieloma.

EE: enfermedad estable.

EMN: *European Myeloma Network*.

EP: enfermedad en progresión.

GEM: Grupo Español de Mieloma Múltiple.

GEP: perfil de expresión génica.

GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto.

HISF (*FISH*): hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*).

HR: *hazard ratio*.

IFE: inmunofijación.

Ig: inmunoglobulina.

Igs: inmunoglobulinas.

IHQ: inmunohistoquímica.

IMIDs: fármacos inmunomoduladores.

IMWG: Grupo Internacional de Trabajo de Mieloma (*International Myeloma Working Group*).

IP: inhibidores de proteasoma.

ISS: sistema de clasificación internacional (*International Staging System*).

LHN: linfoma no Hodgkin.

MBRP: muy buena respuesta parcial.

MDE: eventos que definen el mieloma múltiple (*Myeloma-defining events*).

MM: mieloma múltiple sintomático.

MMQ: mieloma asintomático, *smoldering* o quiescente.

MO: médula ósea.

MRD: *minimal residual disease*.

N/A: no aplicable.

NGS: secuenciación masiva en paralelo (*next-generation sequencing*).

PET/TC: tomografía por emisión de positrones/tomografía axial computarizada (*positron emission tomography-computed tomography*)

RC: respuesta completa.

R-ISS: sistema de clasificación internacional revisado (*Revised International Staging System*).

RM: resonancia magnética.

RP: respuesta parcial.

sFLC: cadenas ligeras libres en suero (*serum free light chains*).

SG: supervivencia global.

SLP: supervivencia libre de progresión.

SP: sangre periférica.

TAPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante sérico beta 1.

TTP: tiempo hasta la progresión.

TC: tomografía axial computarizada (*computed axial tomography*).

