

UNIVERSIDAD DE NAVARRA

Facultad de Medicina



Tesis doctoral

Evaluación de enfermedad mínima residual en mieloma múltiple: nuevos algoritmos para la estratificación pronóstica de pacientes mediante citometría de flujo multiparamétrica

Paula Arana Berganza

2020

El Dr. José Rifón Roca, en calidad de director, y el Dr. Bruno Paiva, en calidad de codirector

CERTIFICAN QUE:

Que Dña. Paula Arana Berganza, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "Evaluación de enfermedad mínima residual en mieloma múltiple: nuevos algoritmos para la estratificación pronóstica de pacientes mediante citometría de flujo multiparamétrica".

Revisado el presente trabajo, damos conformidad para su presentación y defensa como tesis con el fin de obtener el grado de Doctor.



Dr. José Rifón Roca



Dr. Bruno Paiva

Pamplona, a 22 de junio de 2020

*A mi familia, a mi pareja,
y a todos los que me habéis acompañado en este camino.*

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AcMo	Anticuerpos monoclonales
APC	Alofococianina
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CAR T	Terapia con células CAR T
CPs	Células plasmáticas
CFM	Citometría de flujo multiparamétrica
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea de Medicamentos)
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i> (Sociedad Europea de Oncología Médica)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto
IMiDs	Inmunomoduladores
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
IPs	Inhibidores de proteasoma
ISS	<i>International Staging System</i>
κ	Kappa
λ	Lambda
MFI	<i>Median Fluorescence Intensity</i> (Intensidad media de fluorescencia)
MM	Mieloma múltiple
MMQ	Mieloma múltiple quiescente
MMRR	Mieloma múltiple recurrente o en recaída
MO	Médula ósea
NGF	<i>Next generation flow</i> (Citometría de flujo de nueva generación)
OC515	Pacific orange
PacB	Pacific blue
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Análisis de componentes principales)
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina 7
PerCPs-Cy5.5	Clorohidrato de peridina con cianina-5.5

RC	Remisión completa
RCs	Respuesta completa estricta
sFLC	<i>Serum free light chain</i> (Cadenas ligeras libres en suero)
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
SP	Sangre periférica
TASPE	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica
TTP	Tiempo hasta la progresión

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	9
1. Aspectos clínicos del MM.....	10
1.1. Aspectos generales	10
1.2. Epidemiología	10
1.3. Patogénesis	11
1.3.1. Evolución de la GMSI	11
1.3.2. Progresión a MM	13
1.4. Diagnóstico	15
1.5. Pronóstico y estratificación del riesgo	17
2. Inmunofenotipo de las CPs	17
3. Tratamiento del MM	20
3.1. Pacientes de nuevo diagnóstico	21
3.1.1. Pacientes candidatos a trasplante.....	22
3.1.2. Pacientes no candidatos a trasplante	25
3.2. Pacientes en recaída	26
4. EMR.....	32
4.1. Definición	32
4.2. Relevancia del estudio de EMR.....	32
4.2.1. Pacientes candidatos a trasplante.....	33
4.2.2. Pacientes no candidatos a trasplante	33
4.2.3. Escenario actual y perspectivas futuras	35
4.3. Técnicas para la monitorización de la EMR	37
4.4. CFM para la detección de EMR en MM.....	39
4.4.1. Metodología de primera y segunda generación	39
4.4.2. NGF	41
4.5. Criterios de respuesta al tratamiento	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
PACIENTES Y MÉTODOS	49
1. Pacientes y diseño de los ensayos clínicos	50
2. CFM.....	55
2.1. CFM de primera generación	55
2.2. CFM de segunda generación.....	56
2.3. NGF.....	59
3. Caracterización citogenética	59
4. Análisis estadístico.....	60
RESULTADOS	63
1. Evaluación de EMR mediante CFM de segunda generación	64

2. Significado clínico de la EMR negativa mediante CFM de segunda generación	67
3. Valor pronóstico del perfil inmune durante la evaluación de EMR	72
4. Valor pronóstico de la expresión antigénica	75
4.1. Valor pronóstico de la expresión antigénica al diagnóstico	75
4.2. Comparación longitudinal de los perfiles fenotípicos de las CPs clonales desde el diagnóstico hasta los distintos momentos de evaluación de EMR	78
4.3. Identificación de un perfil fenotípico con valor pronóstico al diagnóstico y durante la evaluación de EMR	82
DISCUSIÓN	89
1. Incremento en sensibilidad y especificidad en la detección de EMR con la transición de CFM de primera a segunda generación	92
2. Significado clínico de la EMR negativa mediante CFM de segunda generación	92
3. Relevancia de alcanzar EMR negativa en pacientes de edad avanzada	95
4. Valor pronóstico del perfil inmune durante la monitorización de EMR	96
5. Valor pronóstico del fenotipo de las CPs clonales en la era de los nuevos fármacos	98
6. Nuevos algoritmos para la estratificación de pacientes con EMR positiva	101
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXO	137

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos clínicos del MM

1.1. Aspectos generales

El MM es una neoplasia de células B caracterizada por la proliferación y acumulación de CPs malignas en MO. Las CPs clonales se ubican principalmente en la MO, pero pueden encontrarse en SP u otros órganos y tejidos, sobre todo, en etapas avanzadas de la enfermedad (Wilson I. Gonsalves et al., 2014). En la mayoría de los pacientes se detecta una inmunoglobulina monoclonal (proteína M) en suero u orina, producida por las CPs malignas (Palumbo & Anderson, 2011). El MM se clasifica como asintomático o sintomático, dependiendo de la ausencia o presencia de manifestaciones clínicas relacionadas con disfunción de órganos o tejidos, como hipercalcemia, fallo renal, anemia y lesiones óseas (B G M Durie et al., 2006; Brian G M Durie et al., 2003; W I Gonsalves et al., 2016; R A Kyle & Rajkumar, 2009; S. V. Rajkumar et al., 2014), también llamados síntomas CRAB. Más recientemente, se han identificado parámetros biológicos que también se consideran manifestaciones de enfermedad activa, y que por tanto condicionan el inicio del tratamiento del MM (S. V. Rajkumar et al., 2014).

1.2. Epidemiología

El MM es la segunda enfermedad hematológica más frecuente después de la leucemia linfática crónica de células B (Siegel et al., 2016), representando aproximadamente el 13% de las neoplasias hematológicas y un 1,7% de los casos de cáncer (Shaji K. Kumar et al., 2017; S. V. Rajkumar et al., 2014; Siegel et al., 2016; Vincent Rajkumar, 2014). Tiene una incidencia de 5,6 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año en países occidentales (Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, n.d.) y se diagnostican más de 80.000 nuevos casos al año en todo el mundo (Becker, 2011). La incidencia varía a nivel global, siendo mayor en países desarrollados, como Estados Unidos, oeste de Europa y Australia, probablemente debido a la disponibilidad de mejores técnicas de diagnóstico y a una mayor conciencia sobre la enfermedad (Shaji K. Kumar et al., 2017). La mediana de edad al diagnóstico es de aproximadamente 70 años; el 37% de los pacientes

tienen menos de 65 años, el 26% se sitúan entre los 65 y los 74 años y el 37% tienen 75 años o más. (Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlander N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, n.d.; Kristinsson et al., 2007).

1.3. Patogénesis

Las CPs se forman a partir de células madre hematopoyéticas, que pasan por varios estadios de diferenciación en la MO y órganos linfoides secundarios, donde se convierten en linfocitos B y posteriormente en CPs. En MO, las células B inmaduras tienen reordenamientos en la región V(D)J de las inmunoglobulinas, lo que origina diversidad en el repertorio de inmunoglobulinas (González et al., 2007). Después, las células B migran a órganos linfoides secundarios, donde se producen otra serie de cambios en los genes de inmunoglobulina, como la maduración de la afinidad, la recombinación de cambio de clase o la hipermutación somática, tras lo cual se obtienen inmunoglobulinas de alta afinidad por un determinado antígeno y con diferentes propiedades funcionales. Los cortes y otras alteraciones que se producen en el DNA durante este proceso, pueden llevar a mutaciones o alteraciones cromosómicas, y si estas tienen un impacto en la proliferación o en la inmortalidad de la célula, pueden llevar al desarrollo de procesos patológicos como el MM (Shaji K. Kumar et al., 2017).

1.3.1. Evolución de la GMSI

El MM se origina a partir de un estado asintomático y pre-maligno que resulta de la proliferación clonal de CPs, la GMSI (Palumbo & Anderson, 2011). La acumulación progresiva de múltiples cambios genéticos y microambientales pueden ocasionar la transformación de éstas células en una neoplasia maligna (Palumbo & Anderson, 2011). La hipótesis actual es que el MM evoluciona desde una GMSI que progresa a MMQ y, finalmente, hasta la enfermedad activa (Kuehl & Bergsagel, 2002). Los pacientes con GMSI, los cuales se caracterizan por tener bajas concentraciones de proteína M y no presentar síntomas o evidencias de afectación orgánica (síntomas CRAB), tienen una probabilidad del 10% de evolucionar a MMQ en los primeros cinco años, y del 1% al año de evolucionar a mieloma sintomático (Korde et al., 2011; Robert A. Kyle et al., 2007; Landgren et al., 2009). El MMQ, un

estadio aun asintomático y premaligno pero más avanzado que la GMSI, progresa a MM con una probabilidad del 10% al año en los cinco primeros años tras el diagnóstico, del 3% en los cinco años siguientes y del 1,5% en los años consecutivos (Robert A. Kyle et al., 2007).

A pesar de ser considerada como una única enfermedad, el MM engloba una variedad de pacientes con anomalías citogenéticas diversas (S. Kumar et al., 2012; Rajan & Rajkumar, 2015). Las anomalías citogenéticas en MM se clasifican en primarias o secundarias, en función del momento de la evolución de la enfermedad en la que se originan. De esta forma, se cree que las anomalías cromosómicas primarias se producen en el estadio GMSI y que tienen un papel importante en la patogénesis inicial. Las anomalías primarias más frecuentes en MM son la hiperdiploidía y las translocaciones que afectan al gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH), que se sitúa en el cromosoma 14. La hiperdiploidía en MM se caracteriza principalmente por trisomías de uno o más cromosomas impares (cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19 o 21) (Chretien et al., 2015), siendo frecuente la coexistencia de distintas trisomías en un mismo paciente. Además, se ha demostrado el valor pronóstico de las trisomías; como ejemplo, las trisomías de los cromosomas 3 y 5 están asociadas a buen pronóstico, y la trisomía 21 se asocia a mal pronóstico (Chretien et al., 2015). Por otro lado, las traslocaciones más comunes en MM son la t(11;14), t(4;14), t(6;14), t(14;16) y t(14;20) (Shaji K. Kumar et al., 2009) (**Tabla 1**), y ocasionan la sobreexpresión de los genes CCND1 (gen de la ciclina D1, codificado en 11q13), FGFR-3 y MMSET (codificados en 4p16.3), CCND3 (gen de la ciclina D3, codificado en 6p21), c-MAF (codificado en 16q23) y MAF-B (codificado en 20q11), respectivamente (Bergsagel & Kuehl, 2001; Fonseca et al., 2002; Kuehl & Bergsagel, 2002). Algunas de estas anomalías tienen impacto en la estratificación de los pacientes con MM; entre otras, t(4;14) o t(14;16) están asociadas a peor pronóstico (Braggio et al., 2015; Walker et al., 2019).

Tabla 1. Clasificación y frecuencia de las anomalías citogenéticas primarias en pacientes con mieloma múltiple (MM)

Subtipo	Genes/Cromosomas afectados	Porcentaje de pacientes con MM (%)
Trisomías	Cromosomas impares, con la excepción de los cromosomas 1, 13 y 21	42
Translocaciones en IgH		30
t(11;14)(q13;q32)	CCND1 (ciclina D1)	15
t(4;14)(p16;q32)	FGFR-3 y MMSET	6
t(14;16)(q32; q23)	C-MAF	4
t(14;20)(q32; q11)	MAFB	<1
Otras*	CCND3 (ciclina D3) en t(6;14)	5
Combinadas trisomías/ translocaciones en IgH		15
Monosomía del cromosoma 14		4,5
Otras anomalías citogenéticas		5,5
Normal		3

*Incluye la translocación t(6;14)(p21;q32), y raramente, otras translocaciones IgH que involucran cromosomas poco comunes. IgH: cadena pesada de las inmunoglobulinas. Tabla modificada de (S. Kumar et al., 2012).

1.3.2. Progresión a MM

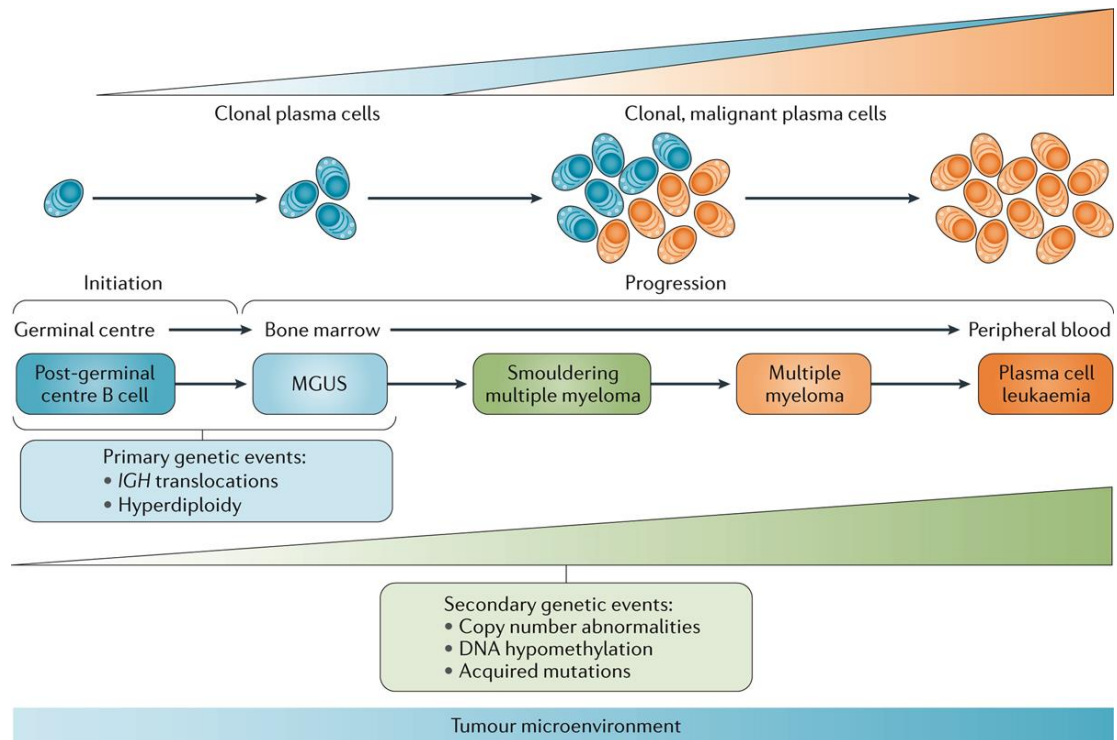
Mediante NGS se ha podido demostrar que no existe una única mutación responsable de la evolución a MM ya que, por el contrario, coexisten diferentes subclones de CPs patológicas con distintas mutaciones (Bolli et al., 2014; Lohr et al., 2014; Morgan et al., 2012; Walker et al., 2015). De esta forma, se ha observado que el patrón de evolución de los subclones durante el tratamiento es heterogéneo y se han propuesto varias teorías para explicar la dinámica de la evolución clonal (Bolli et al., 2014; Keats et al., 2012).

Durante la progresión desde GMSI hasta MM, se producen otra serie de alteraciones genéticas secundarias en las CPs clonales. Por una parte, se producen anomalías en el

número de copias, incluyendo del(1p), amp(1q), del(13q), del(17p) y reordenamientos del oncogén MYC. Algunas de estas anomalías, como amp(1q) o del(17p), están asociadas a peor pronóstico (Braggio et al., 2015; Walker et al., 2019). Por otra parte, un porcentaje relativamente pequeño de los pacientes con MM sufre mutaciones en los genes *KRAS* (en el 23% de los pacientes), *NRAS* (20%), *FAM46C* (11%), *DIS3* (11%) y *TP53* (8%). Otras mutaciones menos frecuentes son las que se producen en los genes *BRAF*, *TRAF3*, *PRDM1*, *CYLD*, *RB1*, *IRF4*, *EGR1*, *MAX*, *HIST1H1E* y *ACTG1* (Bolli et al., 2014; Lohr et al., 2014; Walker et al., 2015)..

Otro tipo de anomalías que se producen durante la transformación maligna a MM son las epigenéticas, como las alteraciones en la expresión de microARNs o las modificaciones en la metilación de genes (Agirre et al., 2015; Alzrigat et al., 2018; Rio-Machin et al., 2013; Roccaro et al., 2009).

Además, el microambiente de la MO también es un factor crucial para el desarrollo del MM, ya que las células que lo componen secretan distintos factores que promueven la migración y la proliferación de las CPs clonales, la angiogénesis, la inhibición de la inmunidad celular, las lesiones óseas o la resistencia al tratamiento (Damiano et al., 1999; Dhodapkar et al., 2015; Hideshima & Anderson, 2002; S. V. Rajkumar et al., 2002). Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial A (VEGFA) producido por las células de estroma de la MO es un factor angiogénico potente, que conlleva a una mayor densidad de la microvasculatura del tumor y un aumento en el aporte de oxígeno a las células de mieloma (Hideshima et al., 2007; S. V. Rajkumar et al., 2002). En cuanto a la importancia del microambiente en la formación de lesiones óseas, se ha observado que la interacción de las células de mieloma con el estroma y los osteoblastos altera los niveles de producción de factores que ocasionan una formación ósea aberrante, como la producción de mayores niveles de RANKL y menores niveles de osteoprotegerina (Manier et al., 2016; Roodman, 1997). Por otro lado, se demostró que la resistencia a ciertas terapias en MM podría estar asociada a procesos de resistencia a drogas mediada por adhesión celular (CAMDR), que se producían entre las células de mieloma y el estroma (Damiano et al., 1999; McMillin et al., 2010), lo cual refleja la importancia del microambiente en la resistencia al tratamiento (**Figura 1**).



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 1. Desarrollo del mieloma múltiple (MM). El desarrollo del MM es un proceso de distintas etapas, que comienza en un estado premaligno como la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y el mieloma múltiple quiescente (MMQ). Aunque la GMSI, MMQ y el MM están clínicamente bien definidos, biológicamente se han encontrado varias similitudes entre estas entidades. El MM también puede progresar a mieloma extramedular y a leucemia de células plasmáticas. Los eventos genéticos primarios en el desarrollo de GMSI, MMQ y MM incluyen las translocaciones que involucran los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH) y la hiperdiploidía. El número de alteraciones genéticas secundarias aumenta desde la GMSI hasta el MMQ, y finalmente hasta MM. Figura reproducida de (Shaji K. Kumar et al., 2017).

1.4. Diagnóstico

Los criterios diagnósticos que tienen mayor aceptación son los establecidos por el IMWG, que fueron actualizados en 2014 (S. V. Rajkumar et al., 2014) (**Tabla 2**). Según estos criterios, el diagnóstico del MM requiere la presencia de uno o más de los eventos definitorios de mieloma (EDM), además de la presencia de un 10% o más de CPs clonales en MO o en una biopsia de plasmocitoma. Los EDM consisten en los criterios CRAB de afectación orgánica, así como en tres biomarcadores específicos: $\geq 60\%$ de CPs clonales en MO, una ratio de sFLC ≥ 100 y más de una lesión focal por resonancia magnética (RM).

Tabla 2. Criterios del *International Myeloma Working Group (IMWG)* para el diagnóstico de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y patologías de células plasmáticas (CPs) relacionadas

Entidad	Definición*
Gammapatía monoclonal de significado incierto no IgM	<p>Proteína monoclonal en suero < 30 g/L</p> <p>Células plasmáticas clonales en médula ósea <10%†</p> <p>Ausencia de afectación orgánica, como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas, atribuibles a la proliferación de las células plasmáticas clonales</p>
Mieloma múltiple quiescente	<p>Proteína monoclonal en suero (IgG o IgA) ≥ 3 g/L, o proteína monoclonal en orina ≥ 500 mg por 24h y/o 10-60% de células plasmáticas clonales en médula ósea</p> <p>Ausencia de eventos definitorios de mieloma o amiloidosis</p>
Mieloma múltiple	<p>≥ 10% de células plasmáticas clonales o evidencia mediante biopsia de plasmocitoma óseo o extramedular</p> <p>Cualquiera o más de uno de los siguientes eventos definitorios de mieloma:</p> <p>Evidencia de afectación orgánica atribuible a la proliferación de las células plasmáticas clonales, específicamente a:</p> <p>Hipercalcemia: calcio sérico >0,25 mmol/L (>1mg/dL) más alto que el límite superior normal o >2,75 mmol/L (>11 mg/dL)</p> <p>Insuficiencia renal: aclaramiento de creatinina <40 mL por minuto o creatinina en suero >177 μmol/L (>2 mg/dL)</p> <p>Anemia: hemoglobina > 20 g/L por debajo del límite inferior normal o hemoglobina < 100 g/L</p> <p>Lesiones óseas: una o más lesiones osteolíticas en radiografía, CT o PET-CT</p> <p>Cualquiera o más de uno de los siguientes biomarcadores de malignidad:</p> <p>≥ 60% de células plasmáticas clonales en médula ósea</p> <p>Ratio de cadenas ligeras involucradas/no involucradas libres en suero ≥ 100</p> <p>> 1 lesión focal mediante estudio RM</p>
Plasmocitoma solitario	<p>Lesión solitaria comprobada por biopsia, en hueso o tejido blando, con evidencia de células plasmáticas clonales</p> <p>Médula ósea sin evidencia de células plasmáticas clonales</p> <p>Ausencia de afectación orgánica, como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas (CRAB), atribuibles a la proliferación clonal de células plasmáticas</p>

*Todos los criterios listados deben cumplirse para poder hacer el diagnóstico. † El estudio en médula ósea puede ser postpuesto en pacientes con GMSI de riesgo bajo (de tipo IgG, con proteína monoclonal < 15 g/L, ratio de cadenas ligeras libres normal) en los cuales no haya evidencias clínicas de mieloma múltiple. Adaptado de (S. V. Rajkumar et al., 2014).

1.5. Pronóstico y estratificación del riesgo

La forma tradicional de estratificar los pacientes con MM según el riesgo de progresión ha sido mediante los sistemas de estadiaje Durie-Salmon e ISS (Greipp et al., 2005; Hari et al., 2009). Más recientemente, se ha revisado y definido un sistema unificado de estratificación (R-ISS) (**Tabla 3**), que combina la información sobre la extensión (ISS, niveles de lactato deshidrogenasa (LDH)) y sobre la biología de la enfermedad (anomalías citogenéticas) (Palumbo, Avet-Loiseau, et al., 2015).

Tabla 3. Sistema Internacional de Estadiaje Revisado (R-ISS) para pacientes con mieloma múltiple (MM)

Estadio I
Se cumplen todos los siguientes:
Albúmina sérica $\geq 3,5$ g/dL
Beta-2-microglobulina sérica $< 3,5$ mg/L
No citogenética de alto riesgo
Niveles normales de lactato deshidrogenasa
Estadio II
No cumplir criterios de estadio I ni III
Estadio III
Se cumplen ambos:
Beta-2-microglobulina sérica $> 5,5$ mg/L
Citogenética de alto riesgo [t(4;14), t(14;16) o del(17p)] o niveles altos de lactato deshidrogenasa

Adaptado de (S. V. Rajkumar et al., 2014).

La SG a 10 años es del 60% para pacientes sin citogenética de alto riesgo, y del 34% para pacientes con citogenética de alto riesgo, aunque la realización de un TASPE en tándem puede prolongar su supervivencia de forma significativa (SG a 10 años del 72% y del 51% respectivamente) (Cavo et al., 2018).

2. Inmunofenotipo de las CPs

El fenotipo de las CPs, tanto normales como patológicas, es variable debido en parte al grado de diferenciación de las mismas (Jego et al., 1999; Terstappen et al., 1990). Sin

embargo, existen rasgos fenotípicos característicos que nos permiten distinguirlos del resto de las células de la muestra.

En MM, los marcadores utilizados para el análisis del compartimento de CPs se pueden clasificar en marcadores de identificación de CPs y marcadores útiles para la discriminación entre células normales y aberrantes (K. C. Anderson et al., 1984; J. F. San Miguel et al., 1986). Desde hace décadas, CD38 es un marcador de gran utilidad para la identificación de CPs mediante CFM. La expresión de CD38 varía a lo largo de la maduración de las células B, alcanzando una expresión característicamente alta (CD38^{bright}) en la fase de diferenciación a CPs (M. Perez-Andres et al., 2010). Ciertamente, las CPs expresan CD38 con una intensidad mayor que cualquier otra población celular presente en SP o MO (Terstappen et al., 1990). Además de CD38, también se han descrito varios marcadores asociados o específicos de CPs; entre ellos, CD138 (sindecano 1) (Wijdenes et al., 1996) ha demostrado ser particularmente útil (Andy C. Rawstron et al., 2008). Sin embargo, a pesar de que se considera que la expresión intensa de CD138 se restringe únicamente al compartimento de CPs (Wijdenes et al., 1996), se ha observado que poblaciones celulares mieloides pueden mostrar autofluorescencia basal o tinción inespecífica para CD138. Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de CD138 disminuye en CPs en proceso de apoptosis (Jourdan et al., 1998), y también en CPs de muestras anticoaguladas con heparina (Antonio et al., 1994; Yang et al., 2003). Por estos motivos, entre otros, en MM actualmente se recomienda el uso combinado de AcMo anti-CD38 y anti-CD138 para una correcta identificación de las CPs por CFM, tanto al diagnóstico como durante la monitorización de EMR (Andy C. Rawstron et al., 2008). Además, para optimizar la exclusión de otras células que no sean CPs, es recomendable marcar la muestra con AcMo frente a CD45 simultáneamente a CD38 y CD138, y usar los detectores de FSC y SSC (Andy C. Rawstron et al., 2008).

Por otra parte, las CPs de MM tienen un fenotipo distinto al de las CPs normales. Las CPs normales de MO pierden la expresión de marcadores pan-B como CD20 y CD22, y también de inmunoglobulinas de superficie. Además, tienen una expresión heterogénea de CD19, CD45^{low} y CD56^{-/low}, junto con una expresión intensa de CD38 y CD138 (Pérez-Andrés et al., n.d.; Andy C. Rawstron et al., 2008). De esta manera, los marcadores que han

demostrado ser informativos para la discriminación entre CPs normales y las patológicas debido a su patrón de expresión aberrante en las células de mieloma incluyen CD19, CD56, CD45, CD38, CD27, CD81 y en menor medida CD20, CD28, CD33 y CD117, y las inmunoglobulinas de superficie (Mateo et al., 2005, 2008; Andy C. Rawstron et al., 2008). Sin embargo, muchos de estos marcadores útiles o incluso esenciales para la detección de fenotipos aberrantes no son estrictamente aberrantes en sí mismos. Por ejemplo, a pesar de que CD19 es uno de los marcadores más informativos ya que está ausente en las CPs tumorales en más del 90% de los casos de MM (B Paiva et al., 2008; Andy C. Rawstron et al., 2008), aproximadamente un 30% de CPs normales o reactivas también son negativas para CD19 (Liu et al., 2012; Robillard et al., 2014). De manera similar, CD56 se ha considerado durante mucho tiempo como un marcador específico de CPs de MM (Mateo et al., 2008; Andy C. Rawstron et al., 2008); sin embargo, un pequeño porcentaje de CPs normales o reactivas (<30%) también muestran expresión de CD56 (Liu et al., 2012; Martin Schmidt-Hieber et al., 2013). Asimismo, otros fenotipos aberrantes definidos por marcadores que son frecuentemente observados en CPs de MM, como CD28⁺, CD45⁻, CD81^{-/low} o CD27^{-/low}, pueden expresarse en subpoblaciones de CPs normales. Por el contrario, no se han publicado casos de expresión de CD117 en CPs normales (M. Ocqueteau et al., 1996), mientras que se ha observado reactividad para este marcador en aproximadamente un 30% de pacientes con MM (M Schmidt-Hieber et al., 2011). Debido a la complejidad de la identificación de fenotipos aberrantes, la combinación de estos marcadores con el marcaje citoplasmático de cadenas ligeras de inmunoglobulina κ y λ es de gran utilidad para establecer la naturaleza clonal de las CPs con fenotipo aberrante (**Figura 2**).

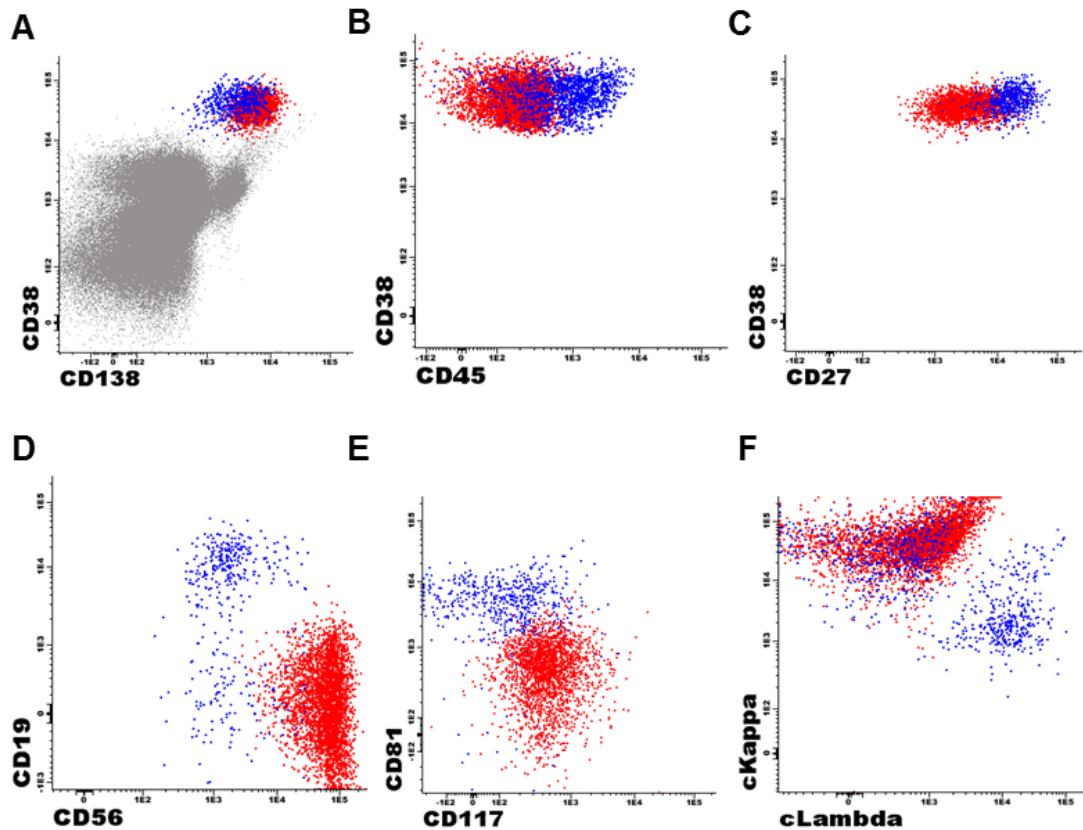


Figura 2. Características fenotípicas de las células plasmáticas (CPs) normales y clonales en médula ósea (MO). (A) Los marcadores CD38 y CD138 permiten la identificación del compartimento de CPs del resto de células en la MO (en gris). (B-E) Las CPs normales (en azul) y las clonales (en rojo) se distinguen en función de la expresión de CD45, CD27, CD56, CD19 y CD117 y CD81, entre otros. (F) El estudio de expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulinas citoplasmáticas permite confirmar la clonalidad de las CPs con fenotipo aberrante.

3. Tratamiento del MM

A pesar de que el MM aún se sigue considerando una enfermedad incurable, la SG de los pacientes ha mejorado significativamente en los últimos años (S K Kumar et al., 2014), tras la introducción de fármacos como la talidomida (Singhal et al., 1999), el bortezomib (Richardson et al., 2005) o la lenalidomida (S. V. Rajkumar et al., 2005; Richardson et al., 2006). Más recientemente, han sido aprobados los fármacos carfilzomib, pomalidomida, panabinostat, ixazomib, elotuzumab y daratumumab para el tratamiento de las recaídas. Éstos nuevos fármacos han demostrado ser capaces de mejorar la supervivencia de los pacientes con MM en distintos ensayos clínicos (M A Dimopoulos et al., 2016; Jakubowiak et al., 2016; S Lonial et al., 2015; Philippe Moreau, Masszi, et al., 2016; Oliva et al., 2016; San-Miguel et al.,

2014; J. San Miguel et al., 2013; Stewart et al., 2015). Aún más recientemente, la incorporación de daratumumab a los esquemas de primera línea ha resultado en una nueva prolongación de la SLP de pacientes candidatos y no candidatos a trasplante (Facon, Kumar, et al., 2019; M. V. Mateos et al., 2018; Philippe Moreau et al., 2019). No obstante, se describirán a continuación los esquemas de tratamiento vigentes durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

3.1. Pacientes de nuevo diagnóstico

El tratamiento del MM está indicado, en general, para pacientes con MM sintomático. En los últimos años se ha producido un gran avance en el tratamiento del MM, y actualmente hay disponible una amplia gama de fármacos con diferentes mecanismos de acción. En el caso de los pacientes con MMQ, actualmente está en discusión el beneficio de empezar el tratamiento en aquellos con alto riesgo de desarrollar MM sintomático (Shaji K. Kumar, 2018). En relación a esto, en un estudio se demostró que el tratamiento de inducción con lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (Rd) seguido de mantenimiento con lenalidomida aumentaba el TTP de los pacientes con MMQ de alto riesgo (María-Victoria Mateos et al., 2013). En un estudio más reciente, se observó que los pacientes con MMQ, de riesgo alto o intermedio, tratados con lenalidomida experimentaban una SLP significativamente más prolongada comparado con los pacientes que no recibieron tratamiento (Sagar Lonial et al., 2019). En otro estudio donde los pacientes con MMQ de alto riesgo fueron tratados con nuevos fármacos con la combinación de carfilzomib, lenalidomida y dexametasona, todos los pacientes alcanzaron al menos una muy buena respuesta parcial y el 92% alcanzaron EMR negativa por CFM (Korde et al., 2015).

A la hora de escoger el esquema de tratamiento para un paciente con MM de nuevo diagnóstico, algunos de los factores más importantes son la elegibilidad del paciente para TASPE, la presencia de comorbilidades y las preferencias del propio paciente (Shaji K. Kumar et al., 2017). En cuanto a la elegibilidad del paciente para recibir TASPE, la edad ha sido el mayor determinante en la mayoría de ensayos clínicos realizados, estableciendo, en muchos de ellos, ≤ 65 años como límite de edad para ser candidato a TASPE (Attal et al., 1996; Child et al., 2003; M. V. Mateos et al., 2010, 2016) (**Figura 3**).

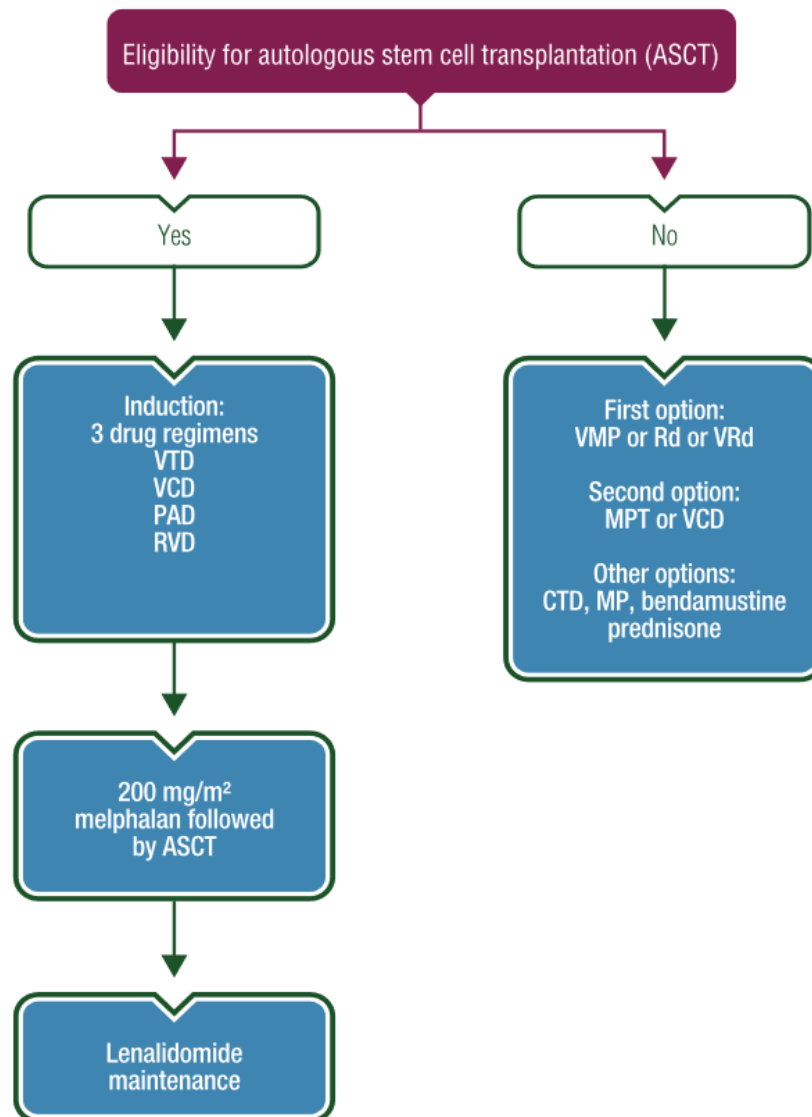


Figura 3: Tratamiento de primera línea para el mieloma múltiple sintomático. El tratamiento recomendado para los pacientes candidatos a trasplante consiste en una terapia de inducción con las combinaciones triples de fármacos bortezomib, talidomida, dexametasona (VTD), bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona (VCD), bortezomib, doxorubicina, dexametasona (PAD) o lenalidomida, bortezomib, dexametasona (RVD), seguido de quimioterapia con dosis altas de melfalán previa al trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (ASCT) y una terapia de mantenimiento posterior con lenalidomida. Para los pacientes no candidatos a trasplante, como primera opción de tratamiento se puede elegir entre las combinaciones bortezomib, melfalán, prednisona (VMP), lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (Rd) o lenalidomida, dosis bajas de dexametasona y bortezomib (VRd); como segunda opción se recomiendan las combinaciones de melfalán, prednisona, talidomida (MPT) o VCD; otras opciones valorables en circunstancias concretas son las combinaciones de ciclofosfamida, talidomida, dexametasona (CTD), melfalán, prednisona (MP) o bendamustina, prednisona. Reproducido de (P Moreau et al., 2017).

3.1.1. Pacientes candidatos a trasplante

La ESMO considera candidatos a trasplante a los pacientes con menos de 65 años o a los mayores de 70 años con buena salud (P Moreau et al., 2017). En base a las indicaciones

de la ESMO (P Moreau et al., 2017), el tratamiento estándar para pacientes con una buena condición física es la inducción seguida de dosis altas de quimioterapia con TASPE (Philippe Moreau et al., 2015). Más concretamente, se recomienda administrar cuatro a seis ciclos de inducción, antes de la recolección de las células progenitoras hematopoyéticas; después, el tratamiento estándar continua con la administración de melfalán (200mg/m² intravenoso) previa al TASPE (Philippe Moreau et al., 2002). Las células progenitoras de SP son la fuente preferente de células madre. Dos ensayos clínicos fase III en los que se compararon el TASPE en primera línea con el TASPE en el momento de la primera recaída, demostraron que el TASPE en primera línea inducía una SLP superior en pacientes expuestos a una terapia de inducción con combinaciones de nuevos fármacos (Attal et al., 2015; Cavo et al., 2016). Por otra parte, las tasas de respuesta a la terapia de inducción han aumentado de forma significativa con el uso de combinaciones basadas en nuevos fármacos. La combinación bortezomib, dexametasona, superior a la clásica VAD (vincristina, doxorubicina y dosis altas de dexametasona), se ha convertido en parte de la columna vertebral de las terapias de inducción previas al TASPE (Philippe Moreau et al., 2015). La inclusión de un tercer fármaco a la combinación, como la talidomida (VTD), doxorubicina (PAD), lenalidomida (VRd) o ciclofosfamida (VCD), han demostrado conseguir mayores tasas de respuesta en ensayos clínicos en fase II (Philippe Moreau et al., 2015). Ciertamente, la superioridad de VTD sobre las combinaciones de talidomida, dexametasona (TD) o bortezomib, dexametasona ha sido demostrada en tres estudios prospectivos (Philippe Moreau et al., 2015). Por otra parte, dos estudios prospectivos compararon las combinaciones VCD con PAD (Mai et al., 2015), y VTD con VCD (Philippe Moreau, Hulin, et al., 2016). En el primero se demostró que VCD y PAD eran igual de efectivos en términos de tasas de respuesta, pero que VCD era menos tóxico. En el segundo se demostró que VTD era más efectivo que VCD en cuanto a tasas de muy buena respuesta parcial, aunque se asociaba con una mayor tasa de neuropatía periférica. En base a todo ello, en Europa, los esquemas de preferencia son VTD y VCD (Philippe Moreau et al., 2015). Sin embargo, se prevé que el esquema VRd, cuando sea aprobado para pacientes candidatos a trasplante, será ampliamente utilizado debido a los buenos resultados observados en ensayos clínicos (Attal et al., 2017; Brian G M Durie et al., 2017; Rosiñol et al., 2019). Cabe destacar que la combinación carfilzomib, lenalidomida y dexametasona (KRd) (Korde et al.,

2015) se ha asociado con altas tasas de respuesta, pero actualmente sólo está aprobada para el tratamiento del MM en recaída (P Moreau et al., 2017).

Por otro lado, actualmente está en discusión el beneficio terapéutico de realizar un TASPE en tándem, en esencia, un segundo trasplante después del primero. Los beneficios del TASPE en tándem fueron evaluados por primera vez antes de la era de los nuevos fármacos, habiéndose observado que era beneficioso para pacientes que no alcanzaban muy buena respuesta parcial tras el primer TASPE (Philippe Moreau et al., 2015). En un estudio realizado por Alemania y Países Bajos (estudio HOVON-65/GMMG-HD4), en el que los pacientes recibieron bortezomib en la terapia de inducción y en el mantenimiento, se observó que los pacientes del grupo GMMG (TASPE en tándem) tuvieron una SG más prolongada comparado con los pacientes del grupo HOVON (TASPE único) (Sonneveld et al., 2012); sin embargo, el ensayo no fue diseñado con el fin de comparar el TASPE doble y el TASPE único. En el estudio más reciente EMM02/H095, en el cual se comparaban el TASPE doble y el único, la SLP fue más prolongada en los pacientes con TASPE en tándem (Cavo et al., 2016). Sin embargo, los resultados del más reciente ensayo clínico estadounidense BMT CTN 0702 muestran que un segundo TASPE no supuso una mejora en la SLP ni en la SG de los pacientes, y concluyeron que el estándar de tratamiento para los pacientes candidatos a trasplante debería seguir siendo un único TASPE seguido de mantenimiento con lenalidomida (Stadtmauer et al., 2019). Por otra parte, el trasplante alogénico no está indicado como parte del tratamiento de primera línea y sólo debería utilizarse en ensayos clínicos (P Moreau et al., 2017).

En cuanto al tratamiento de consolidación posterior al TASPE, varios ensayos clínicos han demostrado que éste mejora la profundidad de la respuesta alcanzada (Philippe Moreau et al., 2015), pero tras la incorporación de los nuevos fármacos todavía no hay suficiente evidencia que justifique el tratamiento de consolidación de manera sistemática. Es más, en el reciente ensayo clínico estadounidense BMT CTN 0702 observaron que la consolidación con RVD después del TASPE no suponía una mejora en la supervivencia de los pacientes (Stadtmauer et al., 2019).

Finalmente, en cuanto a la terapia de mantenimiento tras el TASPE, varios ensayos clínicos fase III han demostrado que el mantenimiento con IMiDS, fundamentalmente lenalidomida, inducen una SLP más prolongada (Philippe Moreau et al., 2015). En un metaanálisis basado en los datos individuales de más de 1200 pacientes, se observó que el mantenimiento con lenalidomida tras el TASPE se asociaba con un beneficio de más de dos años en la SG (Attal et al., 2012). En 2017 la EMA aprobó el uso de lenalidomida como monoterapia en el mantenimiento para pacientes adultos con MM de nuevo diagnóstico sometidos a TASPE (P Moreau et al., 2017). El mantenimiento con bortezomib durante dos años también fue evaluado, y demostró un beneficio en supervivencia comparado con el mantenimiento con talidomida, pero el protocolo de inducción no fue idéntico en las dos ramas estudiadas (Sonneveld et al., 2012). El bortezomib y la talidomida no están aprobados en la terapia de mantenimiento (P Moreau et al., 2017).

3.1.2. Pacientes no candidatos a trasplante

En pacientes de nuevo diagnóstico que no son candidatos a TASPE, la ESMO (P Moreau et al., 2017) recomienda de forma preferente en base a los ensayos clínicos fase III, dos opciones terapéuticas de inducción: bortezomib (subcutáneo), melfalán, prednisona (VMP) (Jesús F. San Miguel et al., 2008) o lenalidomida con dosis bajas de dexametasona (Rd) (Benboubker et al., 2014); ambas han sido aprobadas por la EMA. El tratamiento con Rd está aprobado por la EMA hasta que se produzca la progresión de la enfermedad. La terapia con melfalán, prednisona, talidomida (MPT) (Fayers et al., 2011) también está aprobada por la EMA pero es inferior a la Rd en términos de SLP y SG (Benboubker et al., 2014). Por otro lado, la combinación bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona (VCD) no está aprobada por la EMA, pero es ampliamente utilizada e induce buenas tasas de respuesta (Philippe Moreau et al., 2015). En un estudio comparativo reciente entre Rd y Rd con bortezomib (VRd) se demostró que la inclusión de bortezomib resultaba en una SLP y SG significativamente más prolongadas, con una relación entre riesgo y beneficio aceptable (Brian G M Durie et al., 2017). Esta triple combinación ha sido aprobada recientemente por la EMA para el tratamiento de pacientes no candidatos a trasplante. La terapia con bendamustina y prednisona está aprobada por la EMA para pacientes con neuropatía en el momento del diagnóstico, excluyendo el uso de

combinaciones de fármacos con talidomida (MPT) o con bortezomib (VMP) (Pönisch et al., 2006). La combinación melfalán, prednisona y lenalidomida (MPR) ha sido comparada en dos estudios prospectivos con melfalán y prednisona (MP) (Palumbo et al., 2012) y con MPT (Zweegman et al., 2016), en los que MPR no demostró ser superior a ninguna de las dos. Esta triple combinación está aprobada por la EMA pero no se usa de forma rutinaria y no puede ser considerada como un estándar de tratamiento (P Moreau et al., 2017). La combinación ciclofosfamida, talidomida, dexametasona (CTD) también ha sido comparada con MP y, pese a haber demostrado superioridad en tasas de respuesta, no induce un aumento de supervivencia comparado con MP (Morgan et al., 2011).

Después de la terapia de inducción, varios ensayos clínicos han estudiado el beneficio de la terapia de mantenimiento en la SG, utilizando IMiDs o bortezomib: MP o un esquema de inducción con dosis bajas de CTD (CTDa), con o sin talidomida de mantenimiento (Morgan et al., 2011), inducción con MP vs MPR vs MPR seguido de mantenimiento con lenalidomida (MPR-R) (Palumbo et al., 2012), bortezomib, melfalán, prednisona, talidomida seguido de bortezomib, talidomida (VMPT-VT) vs VMP (Palumbo et al., 2010) o VMP vs bortezomib, talidomida, dexametasona (VTD) seguido de mantenimiento con bortezomib, prednisona (VP) o bortezomib, talidomida (VT) (M. V. Mateos et al., 2012). Estos ensayos clínicos no han logrado demostrar un beneficio claro en cuanto a SG, y los fármacos todavía no han sido aprobados por la EMA, por lo que en 2017 no se recomendaba una terapia de mantenimiento sistemática para pacientes no candidatos a trasplante (P Moreau et al., 2017). Esta posición ha ido cambiando en consonancia con los resultados de nuevos ensayos clínicos fase III (Facon, Kumar, et al., 2019; M. V. Mateos et al., 2018).

3.2. Pacientes en recaída

La mayoría de los pacientes con MM sufren recaídas y necesitan ser tratados con terapias adicionales. Se ha observado que cuando los pacientes sufren múltiples recaídas la duración de la respuesta al tratamiento disminuye progresivamente, lo que es indicativo del desarrollo de refractariedad al tratamiento, y refleja la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con mecanismos de acción alternativos. La elección de la terapia en las recaídas depende de varios factores, como la edad del paciente, las comorbilidades, el tipo de

tratamiento previo recibido, su eficacia y la tolerancia a éste, el número de líneas de tratamiento recibidas, las opciones terapéuticas disponibles, el periodo transcurrido desde el último tratamiento o el tipo de recaída (clínica o bioquímica; en caso de ser bioquímica puede retrasarse el tratamiento) (**Figura 4**) (Laubach et al., 2016). Hasta 2015, la EMA aprobó el uso de lenalidomida en combinación con dexametasona y bortezomib, como agente único o en combinación con doxorubicina pegilada, para el tratamiento de la primera y posteriores recaídas (P Moreau et al., 2017). En 2015 y 2016, en base a los resultados obtenidos en ensayos clínicos fase III, la EMA aprobó nuevas combinaciones de tripletes. La combinación de panabinostat, un inhibidor de panHDAC, con bortezomib y dexametasona está actualmente indicada para el tratamiento de pacientes con MMRR que hayan recibido al menos dos esquemas de tratamiento previos con bortezomib y un IMID (San-Miguel et al., 2014). Carfilzomib, un inhibidor del proteasoma de segunda generación, también está aprobado en combinación con lenalidomida y dexametasona para el tratamiento de pacientes con al menos una línea de tratamiento previa (Stewart et al., 2015), y también está aprobado en combinación sólo con dexametasona en pacientes con al menos una línea de tratamiento previa (Meletios A Dimopoulos et al., 2016). Elotuzumab, un AcMo contra SLAMF7, está aprobado en combinación con lenalidomida y dexametasona para el tratamiento de pacientes que hayan recibido al menos una línea de tratamiento previa (S Lonial et al., 2015). Ixazomib, el primer inhibidor de proteasoma oral, en combinación con lenalidomida y dexametasona también está aprobado para el tratamiento de pacientes que hayan recibido al menos una línea de tratamiento previa (Philippe Moreau, Masszi, et al., 2016). En el caso de estadios muy avanzados de la enfermedad, la EMA aprobó otros dos fármacos para el tratamiento del MMRR: la pomalidomida y daratumumab. La pomalidomida, un IMID de tercera generación, en combinación con dosis bajas de dexametasona, está aprobado para pacientes que hayan recibido al menos dos líneas de tratamiento previas, las cuales hayan incluido lenalidomida y bortezomib, y cuya enfermedad progrese tras el tratamiento con estos fármacos (J. San Miguel et al., 2013). Daratumumab, un AcMo contra CD38, también fue aprobado para el tratamiento de pacientes con MMRR cuyos tratamientos previos incluyeran un inhibidor del proteasoma y un IMID y cuya enfermedad empeorara tras el tratamiento (Usmani et al., 2016). Daratumumab también ha demostrado ser eficaz en primeras recaídas y posteriores, en dos ensayos clínicos

fase III en los que se utilizó en combinación con bortezomib y dexametasona (Palumbo et al., 2016; Spencer et al., 2018) o con lenalidomida y dexametasona (M A Dimopoulos et al., 2016). Estas dos nuevas combinaciones de tres fármacos son estándares de tratamiento del MM en recaída.

En pacientes candidatos a trasplante, se puede considerar realizar un segundo TASPE, siempre y cuando el paciente haya respondido bien al primer TASPE y tenga una SLP superior a los 24 meses (Giralt et al., 2015). En cuanto al trasplante alogénico, en el caso de una recaída, solo debería de realizarse en el contexto de un ensayo clínico (P Moreau et al., 2017).

Actualmente están en marcha varios ensayos clínicos en los que se están estudiando nuevos fármacos, algunos de los cuales están aportando resultados prometedores (Bahlis et al., 2018; Maria-Victoria Mateos et al., 2018; Richardson et al., 2018; Shah et al., 2017).

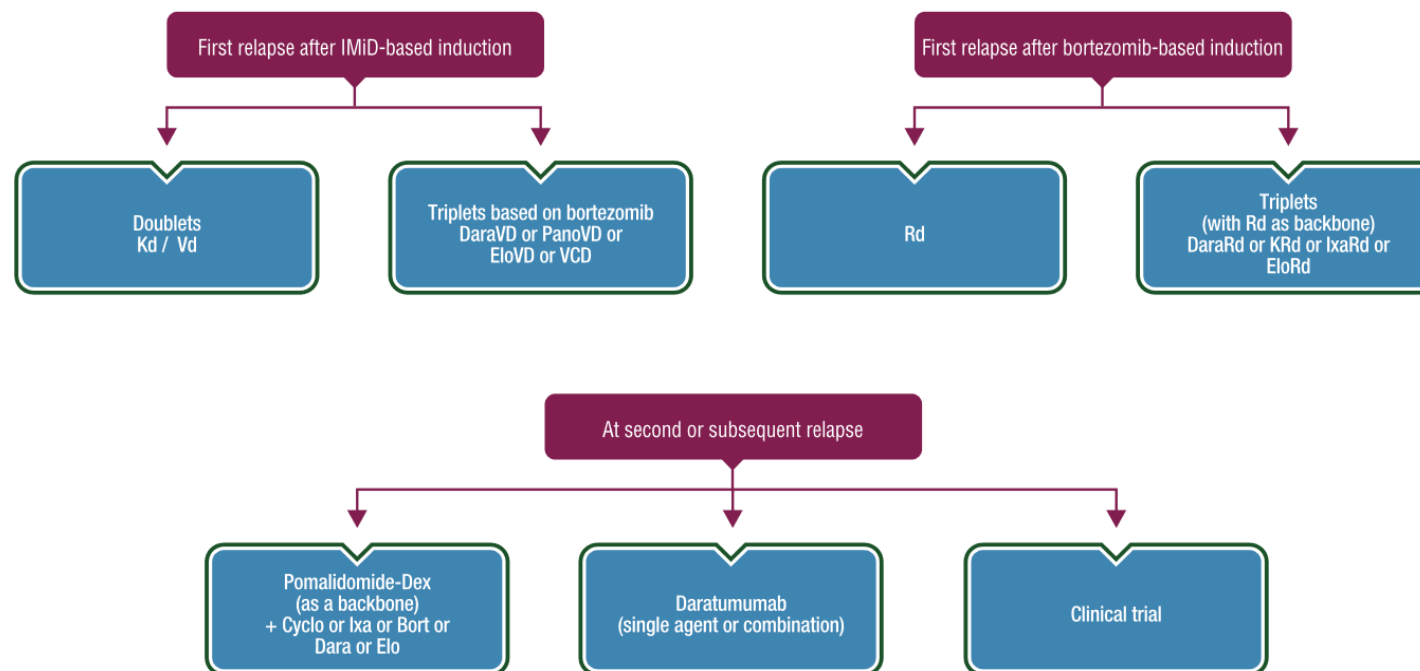


Figura 4. Tratamiento de rescate en mieloma múltiple. Para el tratamiento de la primera recaída de pacientes que hayan recibido una terapias de inducción basadas en fármacos inmunomoduladores (IMiDs), están aprobados los dobles de carfilzomib con dosis bajas de dexametasona (Kd) y bortezomib con dosis bajas de dexametasona (Vd) o las combinaciones de tripletes basados en bortezomib, como daratumumab, bortezomib, dexametasona (DaraVD), panobinostat, bortezomib, dexametasona (PanoVD), elotuzumab, bortezomib, dexametasona (EloVD) o bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona (VCD). Para el tratamiento de la primera recaída de pacientes que hayan recibido terapias de inducción basadas en bortezomib, están aprobados el tratamiento con lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (Rd) o combinaciones de tripletes con Rd, como daratumumab, lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (DaraRD), carfilzomib, lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (KRd), ixazomib, lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (IxaRd) o elotuzumab, lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (EloRd). Para el tratamiento de las segundas y posteriores recaídas están aprobados los tratamientos basados en pomalidomida y dexametasona, administrados junto con ciclofosfamida (Cyclo), ixazomib (Ixa), bortezomib (Bort), daratumumab (Dara) o elotuzumab (Elo); otra línea de tratamiento aprobada es la administración de daratumumab, como único agente o en combinación, y, por último, se ofrece la posibilidad de participar en ensayos clínicos. Reproducido de (P Moreau et al., 2017).

Sin duda, los IP, los IMiDs y los AcMo han supuesto un gran avance en el tratamiento del MMRR (Hervé Avet-Loiseau et al., 2017; M. Dimopoulos et al., 2018; McCarthy et al., 2017; Spencer et al., 2018; Stewart et al., 2015). Sin embargo, muchos pacientes continúan recayendo después de recibir varias líneas de tratamiento (Gandolfi et al., 2018; Majithia et al., 2016; Philippe Moreau, 2017), y que podrían beneficiarse de tratamientos alternativos. En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias farmacológicas, entre ellas y quizá una de las que mayor repercusión tuvo, la terapia celular CAR T (June et al., 2018; Wang et al., 2017; Zhang & Xu, 2017). Brevemente, la terapia consiste en insertar en el ADN de las células T del paciente el fragmento que codifica para el CAR, un receptor quimérico elaborado mediante ingeniería genética con capacidad para reconocer y unirse a un antígeno concreto de la célula tumoral y, de forma simultánea, inducir y dirigir la activación de las células T contra el tumor. En MM, la terapia con CAR T es todavía experimental. Actualmente hay varios ensayos clínicos con CAR T dirigidos frente a varios antígenos de las células de mieloma, como el antígeno de maduración de células B (BCMA), CD19, CD138, SLAMF7 o las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (Carpenter et al., 2013; Garfall et al., 2018; Gogishvili et al., 2017; B. Guo et al., 2016; Ramos et al., 2016) (**Figura 5**). La mayoría de los ensayos clínicos con CAR T en MM han ido dirigidos frente a BCMA, y los primeros resultados que demostraban la eficacia de un CAR T contra BCMA en MM fueron publicados en 2016 (Ali et al., 2016). De modo generalizado, los ensayos clínicos con CAR T dirigidos contra BCMA han mostrado altas tasas de respuesta en pacientes con MMRR (Brudno et al., 2018; Cohen et al., 2019; Raje et al., 2019; Xu et al., 2019; Zhao et al., 2018). Como ejemplo, en el ensayo clínico chino fase I (NCT03090659), en el que se trataron pacientes con MMRR con LCAR-B38M, un CAR T dirigido contra BCMA y con 4-1BB como molécula coestimuladora, el 74% de los pacientes alcanzaron RC, los cuales tuvieron una mediana de SLP de 24 meses y no alcanzaron la mediana de SG (Zhao et al., 2018). En la actualidad una variedad de productos diferentes de CAR T contra BCMA están siendo estudiados en distintos ensayos clínicos, y se espera que la terapia de CAR T contra BCMA sea aprobada pronto para el tratamiento de los pacientes con MMRR. Por otra parte, las terapias de CAR T contra CD138, SLAMF7, y cadenas ligeras de inmunoglobulinas están la mayoría en fase preclínica, pero los resultados aportados hasta ahora son prometedores (B. Guo et al., 2016; Mathur et al., 2017; Ramos et al., 2016). Por

último, las terapias con CAR T con doble diana están siendo estudiados en diferentes ensayos clínicos (Lin et al., 2019).

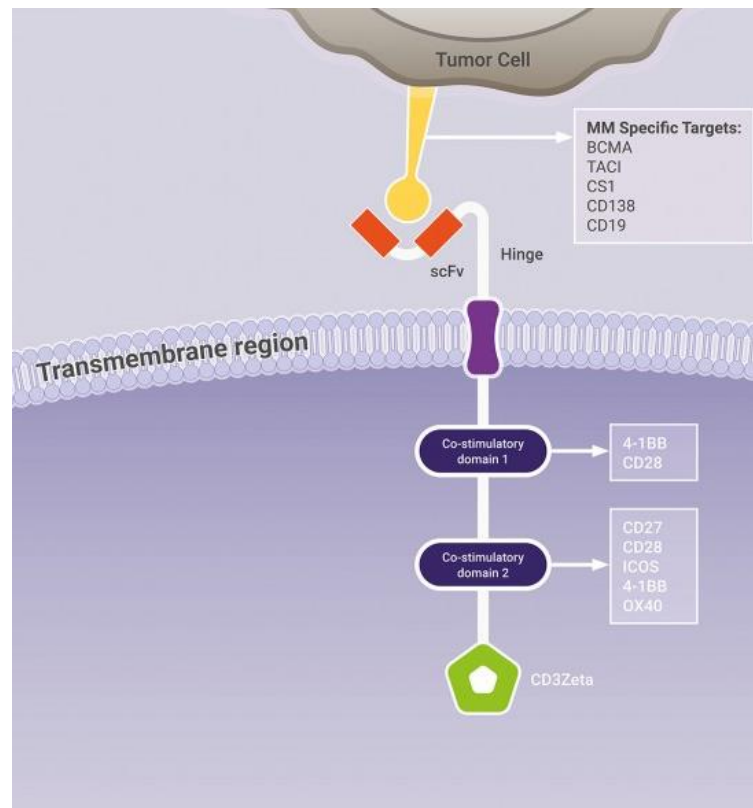


Figura 5. Representación esquemática de las construcciones CAR T contra las dianas específicas que están siendo estudiadas en mieloma múltiple (MM). Los antígenos BCMA, TACI, CS1 (SLAMF7), CD138 y CD19 son las principales dianas de los CAR T diseñados para el tratamiento del MM. El CAR T representado tiene un fragmento monocatenario (scFv) en la parte extracelular, que es el producto de la fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, encargado de reconocer el antígeno diana; en la parte intracelular tiene un dominio CD3Zeta (CAR T de primera generación), para activar la respuesta T y dos dominios de moléculas de coestimulación de la respuesta T, como 4-1BB, CD28, CD27, CD28, ICOS u OX40, por lo que se trata de un CAR T de tercera generación. Reproducido de <https://multiplemyelomahub.com/medical-information/original-review-driving-forward-with-car-t-therapy-what-does-this-mean-for-mm>.

Además, éstas mismas dianas también están siendo utilizadas para la construcción de otras estructuras diferentes para el tratamiento del MM, como los Acs biespecíficos. Los Acs biespecíficos constan de dos proteínas fusionadas, cada una de las cuales está diseñada para reconocer un antígeno concreto. Una de las proteínas reconoce un antígeno de la célula diana, y el otro suele reconocer un antígeno de los linfocitos T, CD3, uniéndose a éstos, con lo que se favorece la respuesta de los linfocitos T contra las células tumorales. Algunos tienen también un dominio Fc (Ac bioespecífico de tipo IgG). El primer Ac bioespecífico con resultados clínicos

en MM ha sido, AMG420, dirigido contra BCMA, con el cual se ha obtenido una tasa de respuesta del 70% (Topp et al., 2019). Otro Ac biespecífico contra BCMA con el que se han obtenido resultados prometedores ha sido CC-93269, con una tasa de respuestas global del 89% y un 44% de RC (Costa et al., 2019). Actualmente existen varios ensayos clínicos en marcha para estudiar otros Ac biespecíficos dirigidos contra BCMA y también contra otras dianas como CD38, CD19, SLAMF7 o GPRC5D.

Otra de las nuevas estructuras que se están estudiando para el tratamiento del MM son los conjugados fármaco-anticuerpo, dirigidos contra antígenos específicos de las células de MM como por ejemplo BCMA (GSK2857916).

4. EMR

4.1. Definición

La EMR se define como la cantidad de células tumorales que persiste en el organismo después del tratamiento y que no se detecta mediante técnicas convencionales.

4.2. Relevancia del estudio de EMR

En los últimos 15 años se ha experimentado un gran avance en el tratamiento del MM, con la introducción de nuevas y más eficaces combinaciones de fármacos, en combinación con el TASPE (M A Dimopoulos et al., 2016; S Lonial et al., 2015; Palumbo et al., 2016; San-Miguel et al., 2014; J. San Miguel et al., 2013; Jesús F. San Miguel et al., 2008; Stewart et al., 2015). Como consecuencia, los pacientes alcanzan respuestas más profundas, y más del 40-50% de los pacientes incluidos en ensayos clínicos alcanzan una RC (Landgren et al., 2018). Sin embargo, los datos de un metaanálisis de 5 estudios y 574 pacientes demostraron que entre los pacientes que alcanzaban RC, aquellos con EMR positiva tenían menor SLP y SG, comparado con los que tenían EMR negativa (Munshi et al., 2017). Más aún, se ha observado que entre los pacientes con RC, la mejora en SLP y SG estaba significativamente asociada a una EMR negativa, independientemente del estadio de la enfermedad o del riesgo citogenético al diagnóstico (Munshi et al., 2017). Estos resultados coinciden con los de Lahuerta et al. (J.-J. Lahuerta et al., 2017), publicados el mismo año, en el que analizaron los datos de 609

pacientes incluidos en tres ensayos clínicos PETHEMA/GEM. Los resultados mencionados demostraron que la EMR negativa superaba el valor pronóstico de la RC, tanto para SLP como para SG, independientemente del tipo de tratamiento recibido o del riesgo del paciente (J.-J. Lahuerta et al., 2017).

4.2.1. Pacientes candidatos a trasplante

En pacientes candidatos a trasplante, se ha demostrado en numerosos estudios que la detección de EMR tiene valor pronóstico. Los pioneros en ofrecer los primeros resultados fueron los grupos español y británico de MM. En el protocolo español PETHEMA/GEM2000, en el que los pacientes recibieron un tratamiento uniforme que incluía dosis altas de melfalán seguido de TASPE, la EMR negativa determinada mediante CFM de 4 colores (sensibilidad de 10^{-4}) fue el factor pronóstico más relevante y se asociaba a una mayor SLP y SG (B Paiva et al., 2008). En el ensayo clínico británico MRC myeloma IX, en el que los pacientes fueron aleatorizados a un tratamiento con CTD o con ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona (CVAD), seguido de dosis altas de melfalán y TASPE, los resultados demostraron que la EMR negativa post-TASPE determinada por CFM de 6 colores (sensibilidad de 10^{-4}) se asociaba a una SLP y SG significativamente superiores (Andy C. Rawstron et al., 2013). Estos resultados han sido extensamente corroborados en estudios posteriores en los que la EMR ha sido evaluada mediante MFC con sensibilidad de 10^{-5} (Hahn et al., 2019; Oliva et al., 2017), PCR-ASO (Ferrero et al., 2015; Puig et al., 2014) o NGS (J Martinez-Lopez et al., 2014; Perrot et al., 2018; Takamatsu et al., 2017).

4.2.2. Pacientes no candidatos a trasplante

A pesar de que estudios recientes indican que un número considerable de pacientes no candidatos a trasplante tratados con combinaciones terapéuticas optimizadas pueden alcanzar EMR negativa (Dytfeld et al., 2014; Korde et al., 2015), su significado clínico ha sido mucho menos estudiado en este grupo de pacientes ya que antes de la incorporación de nuevos fármacos se alcanzaban tasas muy bajas de RC. Sin embargo, es a los pacientes no candidatos a trasplante, los cuales son el subgrupo más frecuente de pacientes de MM y en los cuales es de máxima importancia lograr un equilibrio entre eficacia y toxicidad, a los que más

les podría beneficiar una evaluación sensible de la respuesta para evitar tratamientos excesivos o insuficientes. Uno de los estudios realizados sobre el valor pronóstico de la EMR en pacientes mayores no candidatos a trasplante fue en el ensayo clínico MRC mieloma IX, en el que el tratamiento consistió en la administración de melfalán y prednisona (MP) o CTD atenuada, y en el que los pacientes con EMR negativa no demostraron tener una SLP significativamente mayor (Andy C. Rawstron et al., 2013). En el ensayo clínico PETHEMA/GEM2005MAS65, en el que se administraron dos combinaciones de fármacos distintas que contenían bortezomib, los pacientes que alcanzaron RC por CFM tras tratamiento no alcanzaron la mediana de SLP ni SG tras un largo periodo de seguimiento, y la RC por CFM demostró ser un factor pronóstico independiente para la SLP y la SG (M. V. Mateos et al., 2014). Más recientemente, se publicaron los resultados del ensayo clínico NCRI Myeloma XI, en el que observaron que los pacientes que alcanzaban EMR negativa, evaluada con CFM de 6 colores (sensibilidad 10^{-4}), tenían una SLP significativamente más prolongada comparado con los pacientes con EMR positiva (Ruth Mary de Tute et al., 2016). Ese mismo año, se publicaron los datos sobre el valor pronóstico de la EMR en pacientes mayores no candidatos a trasplante incluidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65 (B Paiva, Cedena, et al., 2016), cuyos resultados están expuestos en esta tesis doctoral. Más recientemente, se han publicado los resultados de los ensayos clínicos ALCYONE (M. V. Mateos et al., 2018), MAIA (Facon, Kumar, et al., 2019) y CLARION (Facon, Lee, et al., 2019), en los que se han evaluado distintas estrategias de tratamiento para pacientes no candidatos a trasplante. En los ensayos clínicos ALCYONE y MAIA, la proporción de pacientes que alcanzaron EMR negativa fue significativamente mayor en la rama de tratamiento que incluía daratumumab, y la SLP de estos pacientes fue significativamente mayor que la de los pacientes de la rama de tratamiento control (Facon, Kumar, et al., 2019; M. V. Mateos et al., 2018). Por lo tanto, se podría concluir que la mayor proporción de casos con EMR negativa estaba asociada a una SLP superior observada en la rama experimental. En el ensayo clínico CLARION no se observaron diferencias significativas entre las dos ramas de tratamiento, ni en cuanto a la proporción de casos con EMR negativa, ni en cuanto a SLP (Facon, Lee, et al., 2019).

4.2.3. Escenario actual y perspectivas futuras

En los últimos años, la SLP ha sido considerada como el objetivo primario de los ensayos clínicos en MM, sustituyendo a la SG, con el fin de acelerar la aprobación de nuevos fármacos. Sin embargo, dadas las respuestas profundas y de larga duración que se están consiguiendo con los fármacos de segunda y tercera generación, especialmente en pacientes de nuevo diagnóstico, la SLP está pasando a ser una meta tardía que podría retrasar el proceso de aprobación de fármacos. En este sentido, hay una cantidad considerable de resultados que evidencian que la EMR podría ser un posible biomarcador para evaluar la eficacia de las distintas estrategias de tratamiento (Kenneth C. Anderson, 2017; Gormley et al., 2016; Harousseau & Avet-Loiseau, 2017; Mailankody et al., 2015; B Paiva et al., 2015). De hecho, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha autorizado recientemente un test de NGS para la detección de EMR en MM; de esta manera, la negatividad de EMR con una sensibilidad de 10^{-5} pasa a ser el objetivo primario en algunos ensayos clínicos iniciados recientemente (*FDA authorizes first next generation sequencing-based test to detect very low levels of remaining cancer cells in patients with acute lymphoblastic leukemia or multiple myeloma | FDA, n.d.*). Una manera eficaz de evaluar la EMR como herramienta a la hora de tomar decisiones terapéuticas, sería la realización de estudios en los que las opciones terapéuticas se tomaran en base a la EMR. De hecho, recientemente han comenzado a publicarse los primeros resultados de estudios basados en esta premisa. Por ejemplo, De La Puerta et al., estudiaron a un total de 66 pacientes con MM de nuevo diagnóstico y observaron que, comparado con los pacientes que siguieron una terapia preespecificada (no modificada en función de la profundidad de la respuesta alcanzada), los pacientes con un tratamiento dirigido en función de la EMR (se intensificó el tratamiento a los a los pacientes con EMR positiva) redujeron el riesgo de progresión o de muerte en un 90%, sin que se observara aumento en la toxicidad (De La Puerta Rueda et al., 2019). Además, hay varios ensayos clínicos en marcha en los que también se está evaluando la intensificación del tratamiento en pacientes con EMR positiva después de recibir el tratamiento estándar (por ejemplo, NCT03901963 o NCT03710603).

Por otra parte, a pesar del uso de combinaciones de fármacos de alta eficacia, mediante técnicas de detección de EMR de nueva generación se ha observado que un gran

número de pacientes aún tienen EMR positiva tras tratamiento (H Avet-Loiseau et al., 2015; Flores-Montero et al., 2017). Debido a diversos factores clínicos y biológicos, estos pacientes podrían tener periodos de supervivencia muy distintos entre sí (Bruno Paiva et al., 2012). De esta forma, la estratificación del riesgo en pacientes con EMR positiva emerge como un campo de investigación inexplorado que podría aportar información adicional para diseñar una correcta estrategia de tratamiento y monitorización de la enfermedad en estos pacientes.

Otra cuestión pendiente en MM es la de establecer el mejor momento para la monitorización de EMR. Frecuentemente la EMR se mide en momentos concretos a lo largo del tratamiento (tras inducción, al día +100 post-TASPE, después de la consolidación, antes y durante el mantenimiento) (Ferrero et al., 2015; Oliva et al., 2016; B Paiva et al., 2008; Roussel et al., 2014), o en el caso de los tratamientos continuos, usualmente utilizados para tratar pacientes no candidatos a trasplante, la evaluación de la EMR se suele hacer en el momento de sospecha de RC o RCs, y en momentos posteriores concretos (Facon, Kumar, et al., 2019). En el ensayo clínico Myeloma IX, en el que la EMR se monitorizó con CFM con sensibilidad 10^{-4} , se observó una SLP superior en los pacientes que tuvieron EMR negativa después de la inducción así como después del TASPE, comparado con los pacientes que tuvieron EMR positiva tras la inducción y EMR negativa después del TASPE (Andy C. Rawstron et al., 2013). De forma destacable, en el mismo estudio observaron que por cada reducción de un logaritmo en los niveles de EMR, los pacientes tenían un beneficio de un año en la mediana de SG (A C Rawstron et al., 2015). Por otro lado, Hahn et al. demostraron que los pacientes candidatos a trasplante que tuvieron EMR negativa antes del TASPE, antes del mantenimiento, y un año después del TASPE, tuvieron una SLP superior comparado con los pacientes con EMR positiva (Hahn et al., 2019). Gu et al. utilizaron CFM para monitorizar los niveles de EMR en 104 pacientes tras la inducción y en distintos momentos después del TASPE (entre los 3 y 24 meses), observando que los pacientes con EMR negativa mantenida hasta los 24 meses después del TASPE tuvieron un TTP y SG superiores, comparado con los pacientes que tuvieron EMR negativa después de la inducción, pero positiva en los 24 meses tras el TASPE (Gu et al., 2018). En conjunto, estos resultados sugieren que la duración de la EMR negativa podría ser importante para prolongar la supervivencia de los pacientes, lo que implicaría la necesidad de realizar una monitorización de EMR periódica. Sin embargo, de momento hay

pocos datos sobre la duración mínima necesaria para que una EMR negativa se pueda considerar como sostenida en el tiempo. Ensayos clínicos actualmente en marcha, y futuros, podrán determinar la definición de EMR negativa sostenida y evaluar su posible importancia a la hora de tomar decisiones terapéuticas.

Por último, uno de los principales inconvenientes a la hora de estudiar la EMR en MO es la heterogeneidad de la enfermedad. El análisis de EMR en MO se hace en aspirados de MO extraídos de un único punto, pero en algunos pacientes las células de mieloma tienen un patrón de infiltración parcheado, por lo que la muestra puede no ser representativa de los niveles de enfermedad (Lee et al., 2017). Realizar biopsias líquidas podría ser la solución para solventar este problema. La biopsia líquida es una estrategia de monitorización no invasiva en la que se analizan distintas moléculas o células en la SP de los pacientes. De esta manera, actualmente se encuentran en fase de investigación la detección de células tumorales circulantes (Sanoja-Flores et al., 2019), de ADN circulante derivado de las células tumorales (Mazzotti et al., 2018) y de péptidos de la proteína M (Mills et al., 2017; Thoren, 2018).

4.3. Técnicas para la monitorización de la EMR

Como consecuencia de la profundización en la respuesta de los pacientes y la mejora en la sensibilidad de las técnicas de detección de EMR, el IMWG publicó una actualización de los criterios de respuesta que incluía una recomendación sobre los métodos que se deben emplear para la detección de EMR (S. Kumar et al., 2016). En resumen, el IMWG recomienda la tomografía por emisión de positrones-tomografía computada (PET/CT) como método de imagen para la detección de EMR extramedular, y la NGS o la NGF para la detección de EMR en MO.

Las técnicas de imagen han demostrado que el MM tiene un patrón de distribución heterogéneo. De esta forma, algunos estudios sugieren que más del 10% de los pacientes al diagnóstico tienen enfermedad extramedular en tejido blando y grandes órganos, y sugieren que, en las recaídas, una alta proporción de pacientes también tienen enfermedad extramedular (Bladé et al., 2012; Dores et al., 2009; Sheth et al., 2009; Short et al., 2011; Usmani et al., 2012; Varettoni et al., 2010). Por este motivo, el IMWG incorporó las técnicas de

imagen, junto con la evaluación de la MO para mejorar la detección de la EMR (S. Kumar et al., 2016). El PET/TC con F¹⁸-FDG (FDG PET/CT) es una técnica de imagen sensible que permite determinar la actividad metabólica de las lesiones focales extramedulares y en MO, por lo que actualmente forma parte del protocolo asistencial estándar en muchos hospitales para evaluar la respuesta al tratamiento (Blade et al., 2011; Hillengass et al., 2011; Philippe Moreau, 2011). Su valor pronóstico y predictivo ha sido demostrado en varios estudios (Bartel et al., 2009; Philippe Moreau et al., 2017; Elena Zamagni et al., 2011). Por ejemplo, Moreau et al compararon el FDG PET/TC con la por resonancia magnética (RM), y observaron que si bien ambas técnicas mostraron una sensibilidad similar para la detección de lesiones óseas, la normalización del PET/TC tras tratamiento, pero no la de RM, tenía valor pronóstico (Philippe Moreau et al., 2017). Tanto en pacientes respondedores como no respondedores, las lesiones focales pueden permanecer positivas durante varios meses, por lo que la RM convencional puede ser inferior al PET/TC para evaluar EMR (Bartel et al., 2009; Hillengass et al., 2012; E Zamagni & Cavo, 2012)

La primera técnica molecular para evaluar EMR en MO fue la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO-PCR), cuyo valor pronóstico fue demostrado en varios estudios tanto en pacientes candidatos a TASPE (Bakkus et al., 2004; Korthals et al., 2012; Ladetto et al., 2010; Martinelli et al., 2000; Putkonen et al., 2010; Sarasquete et al., 2005) como en no candidatos (Joaquin Martinez-Lopez et al., 2013; Martínez-Sánchez et al., 2008; Puig et al., 2014). Sin embargo, diferentes aspectos limitaron su uso a favor de la NGS. Primero, su aplicabilidad, que variaba desde un 40 hasta un 60%, debido a la baja tasa de identificación de marcadores clonales al diagnóstico, ya que la ejecución de esta técnica se veía limitada por la tasa de hipermutación somática del loci de las inmunoglobulinas, lo que ocasionaba problemas en la secuenciación. Además, la necesidad de sintetizar cebadores específicos de paciente aumentaba la complejidad de esta técnica (Gambella et al., 2019; Ladetto et al., 2010; Puig et al., 2014). La NGS es un método implementado hace pocos años para el estudio de la EMR en MM, que se basa en el uso de conjuntos de cebadores específicos de los locus IGH e IGK (locus de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas), para la amplificación y secuenciación de los reordenamientos clonales de las inmunoglobulinas. Ladetto et al. (Ladetto et al., 2014) compararon la qPCR-ASO y la NGS

en cuanto a su capacidad para detectar EMR, y observaron que tanto la capacidad como la sensibilidad para detectar clonotipos (lecturas de secuencia idénticas) era comparable entre ambas técnicas, siendo de al menos 1 célula tumoral en 10^5 células normales. Sin embargo, la NGS tenía las ventajas de no requerir cebadores específicos de paciente y una mayor aplicabilidad (Ladetto et al., 2014). Además, otros estudios demostraron que la NGS puede alcanzar una sensibilidad de 10^{-6} (H Avet-Loiseau et al., 2015) y que eso contribuía a una mejor estratificación de los pacientes con MM (Korde et al., 2015; J Martinez-Lopez et al., 2014; P Moreau et al., 2006). En el ensayo clínico IFM2009, se compararon la NGS (sensibilidad 10^{-6}) frente a la MFC de 7 colores, (sensibilidad 10^{-4}), y los resultados mostraron que la NGS era claramente superior a la MFC puesto que varios pacientes con EMR negativa por MFC, tenían EMR positiva por NGS (H Avet-Loiseau et al., 2015). Actualmente hay en marcha varios estudios en los que se está evaluando la NGS vs NGF y su correlación. En el estudio CASSIOPEIA, se ha observado una buena correlación (83,5% en muestras pareadas) utilizando la misma sensibilidad (10^{-5}), lo que indica que ambas técnicas son equiparables en la evaluación de la EMR (Herve Avet-Loiseau et al., 2019).

4.4. CFM para la detección de EMR en MM

4.4.1. Metodología de primera y segunda generación

Los primeros estudios de detección de EMR en MM mediante CFM se realizaron con tecnología de primera generación, en la que las muestras se analizaban con combinaciones de 4 colores y se adquirían al menos entre 2×10^4 y 1×10^5 células totales por combinación (Almeida et al., 1999; Manzanera et al., 2005; J F San Miguel et al., 2002). En consecuencia, se alcanzaba una sensibilidad de una célula de mieloma en 10^4 células totales (sensibilidad 10^{-4}). Al igual que al diagnóstico, el empleo de marcadores que permitían identificar las CPs en el total de células de la MO (fundamentalmente el CD38) y la caracterización de fenotipos aberrantes (por aquel entonces sin el marcaje citoplasmático de cadenas κ y λ), permitía discriminar con alguna eficacia CPs normales y patológicas dentro del compartimento de CPs en MO (Mauricio Ocqueteau et al., 1998).

Varios estudios han demostrado la eficacia de la CFM de primera generación en la detección de EMR en MO (B Barlogie et al., 2008; B Paiva et al., 2008, 2011; Bruno Paiva et al., 2012; Puig et al., 2014; Andy C. Rawstron et al., 2013; Sarasquete et al., 2005). Rawstron et al. (2002) demostraron que los pacientes con EMR negativa por CFM tras el TASPE tenían una SLP significativamente mayor comparado con los pacientes que tenían EMR positiva (Andy C. Rawstron et al., 2002). Además, demostraron que la CFM tiene mayor sensibilidad que la inmunofijación en la evaluación de la respuesta al tratamiento (Andy C. Rawstron et al., 2002). Los resultados de San Miguel et al. (J F San Miguel et al., 2002) fueron muy similares a estos resultados iniciales del grupo británico. El grupo español de mieloma (PETHEMA/GEM) (B Paiva et al., 2008) estudió una serie amplia con 295 pacientes candidatos a trasplante, y demostraron que la EMR por CFM era uno de los predictores más importantes de la evolución de los pacientes, con valor pronóstico tanto para la SLP como para la SG. Paiva et al. (Bruno Paiva et al., 2012) estudiaron una serie de 241 pacientes en RC incluidos en los ensayos clínicos GEM2000 y GEM2005MENOS65, y demostraron que la persistencia de EMR post-TASPE y la citogenética de alto riesgo al diagnóstico son los mejores predictores de una recaída temprana en pacientes que alcanzan RC. Estos resultados van en consonancia con los obtenidos por un estudio previo de Barlogie et al. (B Barlogie et al., 2008).

Sin embargo, en los últimos años se ha introducido progresivamente una tecnología de CFM más sofisticada, de segunda generación (Korde et al., 2015; Roussel et al., 2014), en la que se utilizan combinaciones de 8 colores, se adquiere aproximadamente un total de 2×10^6 células por combinación (Stetler-Stevenson et al., 2016) y se utiliza un sistema de procesamiento de señales digital, que permite el análisis de una mayor cantidad de datos en menor tiempo, y que se debería traducir en un aumento de eficacia. Ciertamente, se espera una mejora en la sensibilidad y la especificidad en la monitorización de EMR, pero hasta el momento de la realización de esta tesis doctoral, no se había determinado el alcance de esta mejora.

Por otra parte, el estudio de EMR mediante CFM ofrece una serie de ventajas a parte de la detección de CPs clonales. Debido a la necesidad de realizar el análisis en muestras frescas y de la expresión de los antígenos utilizados para la detección de EMR en otras

poblaciones celulares de la MO, la CFM ofrece la posibilidad de obtener datos, en tiempo real, de otros parámetros además de la EMR. De esta forma, el estudio de EMR por CFM permite evaluar la calidad de los aspirados de MO y poder, así, descartar muestras hemodiluidas (Flores-Montero et al., 2017). Además, permite realizar una caracterización global del compartimento de CPs (J F San Miguel et al., 2002), ofrece información sobre posibles dianas terapéuticas en las células patológicas (B. Paiva et al., 2015; Bruno Paiva et al., 2010; Raja et al., 2010) y sobre la biología de las células quimiorresistentes de la EMR (Paino et al., 2015; B Paiva, Corchete, et al., 2016), también aporta información sobre la reconstitución del sistema inmune tras tratamiento (Pessoa de Magalhaes et al., 2013) y, por último, la CFM también podría ser utilizada para obtener información de valor pronóstico basada en el fenotipo de las CPs aberrantes. De hecho, varios grupos de investigación han publicado resultados que demuestran el valor pronóstico de distintos marcadores en MM (W I Gonsalves et al., 2016; J. Guo et al., 2016; Mateo et al., 2008; P Moreau et al., 2004, 2006; B Paiva et al., 2012; Pan et al., 2016). En un estudio más reciente, se han identificado patrones de expresión de antígenos, basados en CD19 y CD81, que definían subgrupos de CPs normales y clonales con distinto grado de diferenciación. Mediante una comparación longitudinal entre muestras al diagnóstico y tras evaluación de EMR, estos patrones fueron útiles para identificar un grupo de pacientes con peor pronóstico, en los que predominaban subclones de CPs menos diferenciados tras la presión inducida por el tratamiento (B Paiva et al., 2017). Sin embargo, existe una falta de consenso a la hora de determinar los marcadores con valor pronóstico debido, entre otros factores, a la variabilidad en las técnicas inmunofenotípicas utilizadas y la escasez de estudios con cohortes grandes de pacientes. Además, son pocos los datos publicados sobre el valor pronóstico del fenotipo tras la incorporación al tratamiento del MM de nuevos fármacos como los IPs o los IMiDs (W I Gonsalves et al., 2016; B Paiva et al., 2012, 2017).

4.4.2. NGF

En los últimos años, la CFM ha experimentado una evolución desde la CFM de primera y segunda generación hasta la NGF, debido al análisis simultáneo de 8 o más marcadores y a la capacidad de interrogar un mayor número de células que ofrecen protocolos optimizados de procesamiento de muestras y los nuevos programas informáticos. Recientemente, el consorcio

EuroFlow ha propuesto un protocolo optimizado con el objetivo de aumentar la sensibilidad y estandarizar la detección de EMR en MM mediante CFM. Han elaborado un panel de AcMo con dos tubos de 8 colores, en los que se incluyen marcadores de superficie, para la discriminación entre CPs aberrantes y normales, así como las cadenas ligeras κ y λ citoplasmáticas para confirmar la clonalidad de las células fenotípicamente aberrantes (Flores-Montero et al., 2017; B Paiva et al., 2015; Stetler-Stevenson et al., 2016; van Dongen et al., 2012) (**Tabla 4**). Además, el protocolo incorpora un paso de *bulk-lysis*, que permite el análisis de más de 5×10^6 células por tubo (Flores-Montero et al., 2017). Por otra parte, el consorcio EuroFlow también ha definido los reactivos que se deben utilizar y las variables de adquisición y de identificación de las CPs clonales, y ha desarrollado programas informáticos con algoritmos para el análisis automatizado de CPs clonales en MM (Flores-Montero et al., 2017). Este protocolo desarrollado por EuroFlow ha sido extensamente validado, con más de 100 muestras de EMR analizadas (Flores-Montero et al., 2017).

Tabla 4. Panel optimizado por Euroflow para la detección de enfermedad mínima residual (EMR) en mieloma múltiple (MM) por citometría de flujo de nueva generación (NGF)

Tubo	BV421	BV510	FITC	PE	PerCPsCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
2	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	citok	cito λ

Además de los paneles de 8 colores, también se están empezando a utilizar paneles de 9 o 10 colores pero no se ha demostrado que la pérdida de estandarización conlleve a un aumento de sensibilidad (Blum et al., 2019; Flores-Montero et al., 2017; Roshal et al., 2017; Royston et al., 2016), y sería deseable que, en la medida de lo posible, hubiera una fuerte adhesión a los métodos recomendados por el IMWG.

El IMWG ha recomendado la NGF, junto con la NGS, como métodos para la detección de EMR en MO en MM, y propuso su inclusión en futuros ensayos clínicos (S. Kumar et al., 2016). Como se muestra en la **Tabla 5**, ambos métodos ofrecen ventajas e inconvenientes, y son varias las características que pueden influir a la hora de elegir un método u otro.

Tabla 5. Comparación de distintas técnicas utilizadas para la detección de enfermedad mínima residual (EMR) en médula ósea (MO)

	Citometría de nueva generación (NGF)	Secuenciación de nueva generación (NGS)
Aplicabilidad	Casi del 100%	≥90%
Disponibilidad	La mayoría de hospitales tienen citometría de flujo de 8 colores. experiencia.	Únicamente servicio comercial; actualmente plataformas académicas en desarrollo
Muestra al diagnóstico	No se requiere	Se requiere para la identificación del clonotipo dominante
Número de células requeridas	Mínimo de 10 millones de células	1-2 millones de células/20µg de ADN
Procesamiento de la muestra	Necesita ser procesada a las 24-48h; requiere muestra fresca	Se pueden usar muestras frescas o almacenadas
Estandarización	Estandarizado por el consorcio EuroFlow	Compañías comerciales (Adaptive Biothechnologies) También hay disponibles metodologías académicas
Control de calidad de la muestra	Posible de evaluar mediante un análisis global de la médula ósea	No es posible
Cuantitativo	Sí	Sí
Sensibilidad	1 en 10 ⁵ -10 ⁶	1 en 10 ⁵ -10 ⁶
Tiempo de respuesta y complejidad	3-4h. Requiere conocimiento en citometría de flujo Disponibile software automatizado	Una semana. Las metodologías académicas requieren soporte bioinformático
Evolución clonal	Evaluable. Puede tener en cuenta cambios fenotípicos	Evaluable. Puede tener en cuenta todos los clones menores

Adaptado de.(Oliva et al., 2020).

4.5. Criterios de respuesta al tratamiento

Numerosos estudios han demostrado que una respuesta profunda al tratamiento se asocia a una mayor supervivencia, tanto en pacientes candidatos como en no candidatos a trasplante (Gay et al., 2011; J. J. Lahuerta et al., 2008; J. San Miguel et al., 2013), lo que subraya la relevancia clínica de la evaluación de la respuesta en MM. Esta estuvo basada durante décadas en la detección de proteína M en suero u orina mediante electroforesis o inmunofijación (BladÉ et al., 1998; B G M Durie et al., 2006), y en la cuantificación de CPs en MO mediante análisis morfológico. Así, la definición de RC requería únicamente que hubiera menos de un 5% de CPs en MO, sin tener en cuenta si eran clonales o no (BladÉ et al., 1998; B G M Durie et al., 2006). Más tarde, la definición de RC fue refinada a RCs, al incorporar la determinación de sFLC junto con la evaluación de biopsias de trefina por inmunohistoquímica (B G M Durie et al., 2006; S. V. Rajkumar et al., 2011). De esta forma, la RCs se alcanza con una inmunofijación negativa, la desaparición de los plasmocitomas, menos de 5% de CPs en MO, ausencia de CPs clonales en MO por inmunohistoquímica y una ratio de CLL normal. La RCs ha sido, hasta hace poco, el criterio que definía el nivel de respuesta más profunda en MM. Sin embargo, debido a diversas circunstancias comentadas anteriormente, entre ellas la eficacia mejorada de las nuevas estrategias de tratamiento, y al desarrollo de métodos más sensibles para la detección de EMR, era evidente la necesidad de redefinir los criterios de respuesta al tratamiento en MM. En consecuencia, el IMWG publicó en 2016 los nuevos criterios de respuesta, introduciendo la definición de EMR como la presencia de células tumorales a un nivel de una en al menos 10^5 células normales (S. Kumar et al., 2016). De esta forma, incorporaron los términos EMR negativa por NGF, NGS, PET/CT y EMR negativa mantenida, para su empleo estandarizado en ensayos clínicos (S. Kumar et al., 2016). En la **Tabla 6** se muestra una descripción de los criterios de respuesta “*standard*” del IMWG de RC y RCs, y los nuevos criterios de respuesta EMR negativa por NGF, NGS, PET/CT incorporados por el IMWG en 2016.

Tabla 6. Criterios de respuesta establecidos por el International *Myeloma Working Group* (IMWG) para la evaluación de enfermedad mínima residual (EMR) en mieloma múltiple (MM)

Criterios de respuesta*	
Criterios de respuesta "standard" IMWG	
Respuesta completa	Inmunofijación negativa en suero y en orina y desaparición de los plasmocitomas en tejido blando y <5% de células plasmáticas en aspirados de médula ósea
Respuesta completa estricta	Respuesta completa como está arriba descrita y ratio FLC normal y ausencia de células clonales en biopsias de médula ósea por inmunohistoquímica (ratio $\kappa/\lambda \geq 4:1$ o $\leq 1:2$ para pacientes κ o λ , respectivamente, tras contar ≥ 100 células plasmáticas†)
Criterios de respuesta adicionales IMWG (2016)	
EMR mantenida	Negatividad de EMR en médula ósea (NGF, NGS o ambas) y por imagen tal como se describe abajo, confirmado como mínimo durante un año
EMR negativa por NGF	Ausencia de células plasmáticas aberrantes por fenotipo mediante NGF en aspirados de médula ósea usando los protocolos de EuroFlow para la detección de EMR en mieloma múltiple (o por un método equivalente validado) con un mínimo de sensibilidad de 1 en 10^5 células nucleadas
EMR negativa por NGS	Ausencia de células plasmáticas clonales por NGS en aspirados de médula ósea. La clonalidad requiere dos lecturas de secuenciación idénticas obtenidas tras la secuenciación de DNA de aspirados de médula ósea utilizando la plataforma LymphoSIGHT (o por un método equivalente validado) con un mínimo de sensibilidad de 1 en 10^5 células nucleadas
Prueba de imagen y EMR negativas	EMR negativa determinada por NGF o NGS y desaparición de cada área de captación aumentada al diagnóstico o en PET/TC previo o descenso de la captación SUV respecto a sangre de mediastino o tejido normal adyacente

*Abreviaturas: EMR, enfermedad mínima residual; NGF: citometría de nueva generación (next-generation flow); NGS, secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing); FLC, cadenas ligeras libres (free light chain); SUV, Valor de captación estandarizado (standardised uptake value).** Se recomienda realizar estudio de EMR tras cada fase del tratamiento (tras inducción, TASPE, consolidación, mantenimiento). La detección de EMR debería realizarse únicamente cuando se sospeche respuesta completa. †La presencia o ausencia de células clonales en inmunohistoquímica se basa en la ratio κ/λ . Una ratio anormal que refleja la presencia de un clon es κ/λ of $>4:1$ $<1:2$, y es necesario analizar al menos 100 células plasmáticas para determinarlo. Adaptado de (S. Kumar et al., 2016).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años ha habido un gran desarrollo en los estudios inmunofenotípicos para la detección de EMR en MM, evolucionando desde la CFM convencional (de primera generación) hasta la más reciente NGF. Durante esta evolución se ha desarrollado la CFM de segunda generación, hoy en día ampliamente instalada en los laboratorios de diagnóstico, sobre todo aquellos que por determinadas razones aún no han podido dar el salto a la NGF. Sin embargo, a pesar de que se asume que aporta una mayor sensibilidad en la detección de EMR comparado con la CFM de primera generación, hasta el momento no se ha determinado el aumento de sensibilidad o especificidad con la CFM de segunda generación.

Por otra parte, el valor pronóstico de la monitorización de EMR ha sido ampliamente validado en pacientes con MM candidatos a trasplante. Sin embargo, su impacto en pacientes mayores no candidatos a trasplante aún no estaba bien definido.

Por último, la estratificación pronóstica de pacientes con EMR positiva emerge como un campo de investigación inexplorado que podría aportar información adicional para diseñar una correcta estrategia de tratamiento y monitorización de la enfermedad en estos pacientes.

Por todo ello, en esta tesis doctoral hemos establecido los siguientes objetivos principales:

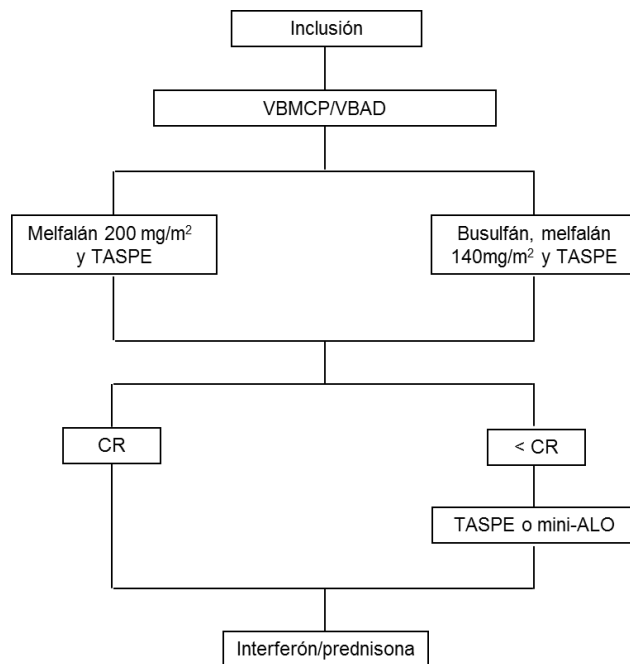
1. Determinar la sensibilidad y especificidad en la detección de EMR en MM mediante CFM de primera versus segunda generación, y estudiar su significado clínico en pacientes mayores no candidatos a trasplante.
2. Identificar nuevos algoritmos que permitan la estratificación pronóstica de pacientes con EMR positiva

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes y diseño de los ensayos clínicos

Para estudiar el valor pronóstico del perfil fenotípico de las CPs clonales, se analizaron los datos de 1265 pacientes de MM de nuevo diagnóstico incluidos en cuatro protocolos consecutivos de PETHEMA/GEM (GEM2000 y GEM2005MENOS65 para pacientes candidatos a trasplante, y GEM2005MAS65 y GEM2010MAS65 para pacientes no candidatos a trasplante) y con datos disponibles del perfil fenotípico de las CPs clonales al diagnóstico. Para estudiar el valor pronóstico de la EMR en pacientes no candidatos a trasplante, se analizaron un total de 162 pacientes de los 241 incluidos en el ensayo clínico GEM2010MAS65, los cuales tenían datos de EMR. A continuación, se describen los esquemas de tratamiento administrados en cada uno de los ensayos clínicos objeto de esta tesis, así como las estrategias utilizadas para la evaluación de EMR.

En el protocolo PETHEMA/GEM2000 (NCT00560053) (J. J. Lahuerta et al., 2008) un total de 685 pacientes fueron tratados con 6 ciclos alternos de vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida y prednisona (VBMCP) y vincristina, BCNU, doxorubicina, dexametasona (VBAD). La terapia de condicionamiento previo a TASPE consistió inicialmente en melfalán y busulfán, pero fue sustituido por altas dosis de melfalán debido a efectos adversos del primer



régimen. A los pacientes que no alcanzaron RC o “respuesta cercana a RC” (del inglés, *near CR*) se les ofreció un TASPE tándem o un condicionamiento de intensidad

Figura 6. Diseño del protocolo de tratamiento PETHEMA/GEM2000. VBMCP: vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida y prednisona; VBAD: vincristina, BCNU, doxorubicina, dexametasona; TASPE: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica; RC: respuesta completa; mini-ALO: condicionamiento de intensidad reducida previo a alotrasplante.

reducida previo a un alotrasplante en caso de tener disponible un familiar donante idéntico. Por

último, todos los pacientes recibieron terapia de mantenimiento durante dos años con interferón y prednisona (**Figura 6**).

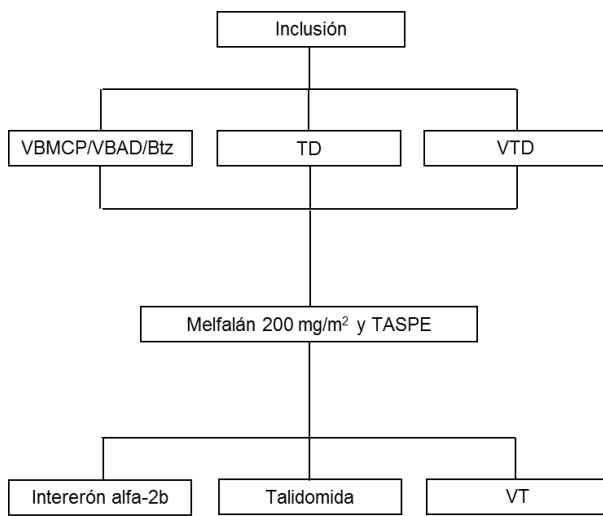


Figura 7. Diseño del ensayo clínico PETHEMA/GEM2005MENOS65. VBMCP: vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida y prednisona; VBAD: vincristina, BCNU, doxorubicina, dexametasona; Btz: bortezomib, TD: talidomida, dexametasona; VTD: bortezomib, talidomida, dexametasona; VT: talidomida y bortezomib; TASPE: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

En el estudio PETHEMA/GEM2005MENOS65 (NCT00461747) (Rosiñol et al., 2012), 390 pacientes fueron aleatorizados, en una proporción 1:1:1, para la administración de la terapia de inducción basada en TD, VTD o VBMCPs/VBAD, seguido de bortezomib (VBMCPs/VBAD/B). Tras la inducción, todos los pacientes se sometieron a TASPE con dosis altas de melfalán, tras lo cual se les asignaba un tratamiento de mantenimiento de nuevo aleatorizado, con interferón alfa-2b, talidomida o talidomida y bortezomib (VT) (**Figura 7**).

En el ensayo clínico PETHEMA/GEM2005MAS65 (NCT00443235) (M. V Mateos et al., 2010), 260 pacientes fueron reclutados y tratados aleatoriamente, en una proporción 1:1, con 6 ciclos de VMP o VTD, tras lo cual, los pacientes de cada uno de los dos grupos de tratamiento de inducción recibieron mantenimiento aleatorio, en una proporción 1:1, con VT o VP (**Figura 8**).

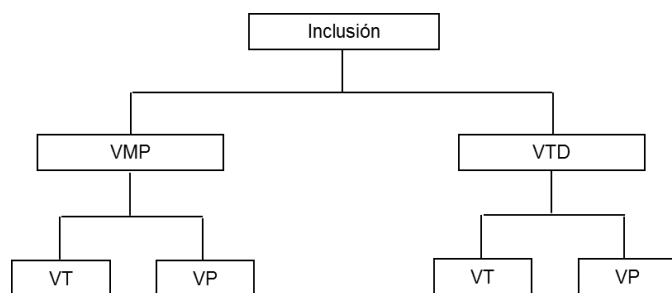


Figura 8. Diseño del ensayo clínico PETHEMA/GEM2005MAS65. VMP: bortezomib, melfalán, prednisona; VTD: bortezomib, talidomida, dexametasona; VT: talidomida y bortezomib; VP: bortezomib, prednisona.

En el ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65 (NCT01237249) (M. V Mateos et al., 2016), 241 pacientes fueron tratados de forma aleatoria con una administración secuencial o alternante de 9 ciclos de VMP seguidos de 9 ciclos de Rd, hasta 18 ciclos (**Figura 9**).

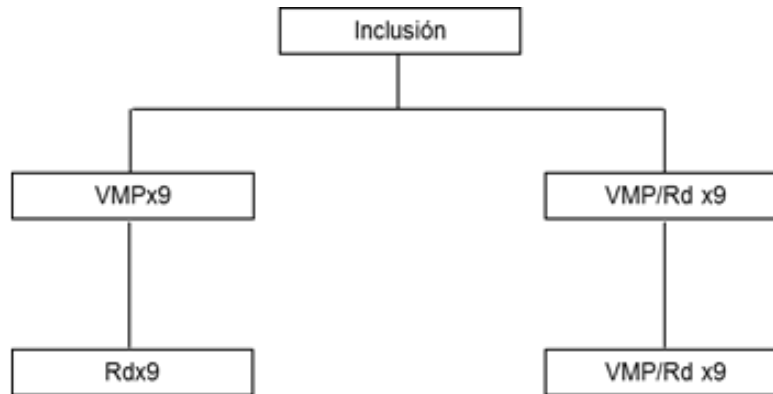


Figura 9. Diseño del ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65. Esquema secuencial (VMPx9 y Rdx9) y alternante (VMP/Rdx9 y VMP/Rdx9). VMP: bortezomib, melfalán, prednisona. Rd: lenalidomida y dosis bajas de dexametasona.

Aunque en el protocolo del ensayo estaban previstos aspirados de MO para el estudio de EMR tras 9 y 18 ciclos de tratamiento independientemente de la respuesta alcanzada, en la práctica la selección de los pacientes para la detección de EMR se realizó en función de la respuesta basada en los niveles de proteína M. De esta forma, el 80% de los pacientes alcanzaron al menos muy buena respuesta parcial, y el 50% alcanzaron RC según los criterios establecidos por el IMWG (B G M Durie et al., 2006). Se realizó el estudio de inmunofenotipo en MO al diagnóstico a un total de 225 pacientes, de los cuales 6 (3%) fueron excluidos para la monitorización de EMR debido a la ausencia de fenotipos aberrantes (**Figura 10**). La distribución de los pacientes entre las dos ramas de tratamiento fue balanceada (n=78 y n=84, para la administración secuencial o alternante, respectivamente). La mediana de seguimiento tras la inclusión en el estudio para los 162 pacientes fue de 36 meses (y de 30 meses para la serie global de 241 pacientes (M. V Mateos et al., 2016)). A los 36 meses, 79 de los 162 pacientes (49%) estaban en progresión y 34 (21%) habían fallecido.

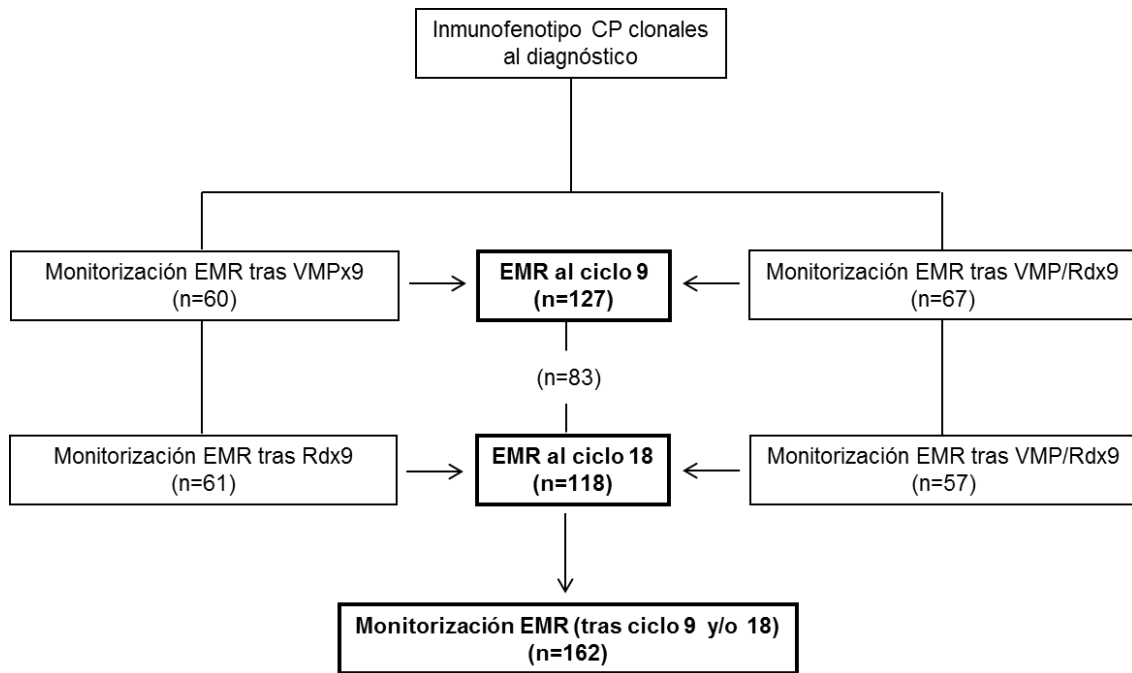


Figura 10. Diagrama del estudio de enfermedad mínima residual (EMR) en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65. 162 de los 241 pacientes incluidos en el ensayo clínico tenían datos de al menos uno de los dos estudios de EMR realizados; tras el ciclo 9 se recogieron datos de EMR de 127 pacientes, de los cuales 60 pacientes habían recibido el esquema de administración consecutivo y 67 pacientes el alterno. Tras el ciclo 18 se recogieron datos de EMR de 118 pacientes, 61 de los cuales habían recibido el esquema de administración secuencial y 57 pacientes habían recibido el esquema alterno. Por lo tanto, los datos de EMR se determinaron en el ciclo 18 para 118 de los 162 pacientes, y los 44 casos restantes fueron determinados únicamente en el ciclo 9 debido a que los aspirados de médula ósea de estos pacientes no fueron centralizados fundamentalmente por progresión de la enfermedad (32%), toxicidad (20%), retirada del consentimiento informado (9%) o exitus (5%). Un total de 83 pacientes tenían datos de EMR tanto tras al ciclo 9 como tras el 18.

Los datos demográficos y las características clínicas de los pacientes incluidos en estos ensayos clínicos se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Datos demográficos y características clínicas de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos PETHEMA GEM2000, GEM2005MENOS65, GEM2005MAS65 y GEM2010MAS65.

	GEM2000 (n = 479)	GEM2005MENOS65 (n = 316)	GEM2005MAS65 (n = 238)	GEM2010MAS65 (n = 232)
Hombre / Mujer, %	56 / 44	54 / 46	48 / 52	52 / 48
Edad, años (rango)	59 (31 – 70)	56 (25 – 65)	73 (65 – 84)	74 (65 – 89)
Subtipo de mieloma, %				
IgG	54	60	59	54
IgA	24	22	30	34
Cadenas ligeras	20	15	11	12
Otros	2	3	0	0
ISS I / II / III, %	32 / 43 / 25	39 / 41 / 20	25 / 44 / 31	21 / 47 / 32
Hemoglobina, g/L	105	100	104	105
Creatinina, mg/dL	1.1	0.9	1.0	0.9
Calcio, mg/dL	9.5	9.5	9.6	9.5
Citogenética (n = 777), %				
t(4;14)	6	15	9	19
t(11;14)	10	18	13	46
t(14;16)	6	3	1	8
del(13q)	32	52	39	50
del(17p)	6	8	10	10
Alto riesgo	12	21	19	19
Mediana seguimiento, años	12	6	6	3

Para investigar la estabilidad antigénica de las CPs clonales desde el diagnóstico hasta los distintos momentos de evaluación de EMR, se analizaron los datos recogidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2012MENOS65, en el cual se incorporó la NGF de 8 colores, debido a que en los ensayos clínicos anteriores los estudios de inmunofenotipo se realizaron con CFM de 4 colores (GEM2000, GEM2005MENOS65, GEM2005MAS65) u 8 colores, pero sin protocolos que garantizaran la estabilidad de los sistemas luminoso y óptico de los citómetros de flujo para comparar el perfil fenotípico de las CPs clonales al diagnóstico vs EMR.

En el ensayo clínico PETHEMA/GEM2012MENOS65 (NCT01916252), todos los pacientes fueron tratados con seis ciclos de inducción con VRd tras lo cual los pacientes fueron aleatorizados en una proporción 1:1 para recibir tratamiento de acondicionamiento con dosis altas de melfalán o melfalán y busulfán seguido de TASPE, y una consolidación con dos ciclos

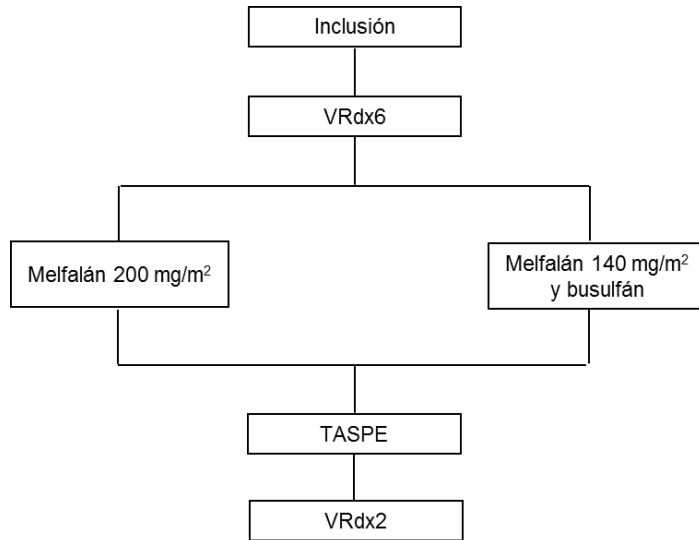


Figura 11. Diseño del protocolo de tratamiento de los pacientes del ensayo clínico PETHEMA/GEM2012MAS65, mostrando los puntos de monitorización de enfermedad mínima residual (EMR). VRd: bortezomib, lenalidomida, dexametasona. TASPE: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

de VRd para todos los pacientes. Durante el seguimiento, los estudios de EMR se realizaron tras inducción, TASPE y al final de la consolidación. Se seleccionaron aleatoriamente 25 pacientes que tuvieron EMR positiva en cada uno de los momentos de evaluación de EMR, y se comparó el perfil fenotípico de las CPs clonales al diagnóstico con el de los estudios longitudinales de EMR (Figura 11).

La mediana de seguimiento del global de pacientes de todas las series fue de 69 meses.

Todas las muestras fueron recogidas tras recibir el consentimiento informado de cada uno de los pacientes, de acuerdo con los comités éticos locales y a la Declaración de Helsinki.

2. CFM

2.1. CFM de primera generación

En el protocolo PETHEMA/GEM2000 se procesaron muestras de MO de 479 pacientes al diagnóstico. Las muestras fueron marcadas usando una técnica de inmunofluorescencia directa de 4 colores, descrita previamente en detalle (Mateo et al., 2008; B Paiva et al., 2008; J F San Miguel et al., 2002). De esta forma, se utilizaron las siguientes combinaciones de AcMo (FITC/PE/PerCPs-Cy5.5/APC): (1) CD38/CD56/CD19/CD45, (2) CD138/CD28/CD33/CD38 y

(3) CD20/CD117/CD138/CD38. Tras la lisis de los eritrocitos, se utilizaron citómetros FACSCalibur (BD, San José, CA, EEUU) para la adquisición de los datos, de acuerdo a métodos establecidos (Manzanera et al., 2005). Se grabó la información de al menos 3×10^3 CPs de cada combinación de AcMo y el análisis de las CPs se realizó utilizando el programa informático Paint-Gate-PRO (BD), publicado previamente (Manzanera et al., 2005).

En los ensayos clínicos GEM2005MENOS65 y GEM2005MAS65, se procesaron aspirados de MO de 316 y 238 pacientes, respectivamente. Las muestras fueron marcadas con una técnica de inmunofluorescencia de 4 colores descrita en detalle en varios estudios (Mateo et al., 2008; B Paiva et al., 2011), utilizando las siguientes combinaciones de AcMo: (FITC/PE/PerCPs-Cy5.5/APC): (1) CD38/CD56/CD19/CD45, (2) CD38/CD27/CD45/CD28 y (3) β 2-microglobulina/CD81/CD38/CD117. Tras realizar la lisis de los eritrocitos, la adquisición de las muestras se realizó con un protocolo de dos pasos utilizando citómetros FACSCalibur (BD) y el programa informático CellQUESTPRO (BD), grabando la información de 3×10^3 CPs de cada combinación de AcMo utilizada (Mateo et al., 2008; B Paiva et al., 2011).

2.2. CFM de segunda generación

En el ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65 fueron procesados los aspirados de MO de 232 pacientes. Se siguieron las recomendaciones de EuroFlow sobre el protocolo de marcaje, los reactivos y la estrategia de análisis (van Dongen et al., 2012). Al diagnóstico, aproximadamente 100 μ l de MO anticoagulada con EDTA fueron marcados con un protocolo de inmunofluorescencia de 8 colores con las siguientes 2 combinaciones de AcMo (PacB/OC515/FITC/PE/PerCPs-Cy5.5/PE-Cy7/APC/APCH7): (1) CD45/CD138/CD38/CD56/ β 2-microglobulina/CD19, cito κ , cito λ y (2) CD45/CD138/CD38/CD28/CD27/CD19/CD117/CD81. Tras tratamiento, aproximadamente 200 μ l de MO anticoagulada con EDTA fueron marcados con la siguiente combinación de AcMo (PacB/OC515/FITC/PE/PerCPs-Cy5.5/PE-Cy7/APC/APCH7): CD45/CD138/CD38/CD56/CD27/CD19/CD117/CD81. Para la adquisición de las muestras se utilizaron citómetros FACS Canto II (BD), y el programa informático FACSDiva 6.1 (Beckton Dickinson Bioscience, San José, CA, EEUU). El análisis de los datos se realizó con el programa informático Infinicyt (Cytognos SL, Salamanca, España). Se determinó EMR negativa cuando se detectaban menos de 20 CPs clonales en 2×10^6 leucocitos o más

(<0,001%, límite de detección: 10^{-5}). La detección de EMR se centralizó en tres laboratorios PETHEMA/GEM, sin que los analistas tuvieran acceso a los datos clínicos de los pacientes.

La identificación de CPs fenotípicamente aberrantes se realizó siguiendo las recomendaciones del consorcio EuroFlow (van Dongen et al., 2012). Brevemente, las CPs con fenotipo aberrante fueron identificadas por la infra expresión de CD19, CD27, CD38, CD45 y/o CD81, sobreexpresión de CD56 y expresión asincrónica de CD117. Era necesaria la presencia de al menos dos marcadores aberrantes (por ejemplo, de CD56 y CD117) para definir un *cluster* de CPs clonales. En seis de los 225 pacientes (3%) se detectaron CPs clonales con restricción de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, pero en ausencia de marcadores aberrantes. Debido a que el estudio de cadenas ligeras no se realizó con CFM de segunda generación, se consideró que estos casos no eran válidos para la detección de CPs aberrantes mediante inmunofenotipo y fueron desestimados para la monitorización de la EMR. Por lo tanto, la aplicabilidad de la CFM de segunda generación fue del 97%.

Por otro lado, la combinación de hasta 8 AcMo también permite la identificación de varias poblaciones celulares como los progenitores hematopoyéticos eritroides (CD117⁺, CD38^{-/low}, CD45^{-/low}, SSC^{lo}) y mieloides (CD117⁺, CD38⁺, CD45^{low}, SSC^{hi}), los eritroblastos, (CD45⁻, CD38⁻, SSC^{low}), mastocitos (CD117^{bright}, CD45^{low}), eosinófilos (CD45^{bright}, CD81^{bright}, SSC^{hi}), basófilos (CD38⁺, CD81⁻, CD45^{low}), monocitos (CD45⁺, CD38⁺, CD81⁺, SSC^{int}), neutrófilos (CD45^{low}, CD81⁻, SSC^{hi}), linfocitos B y sus precursores (CD19⁺, CD45^{low}, CD38^{bright}, CD27⁻), linfocitos B vírgenes (CD19⁻, CD45⁺, CD38^{-/low}, CD27⁻) y linfocitos B de memoria (CD19⁺, CD45⁺, CD38^{-/low}, CD27⁺), así como células NKT y células NK (CD45⁺, CD56⁺, CD19⁻, SSC^{low}) y linfocitos T (CD45⁺, CD56⁻, CD19⁻, SSC^{low}) (**Figura 12**).

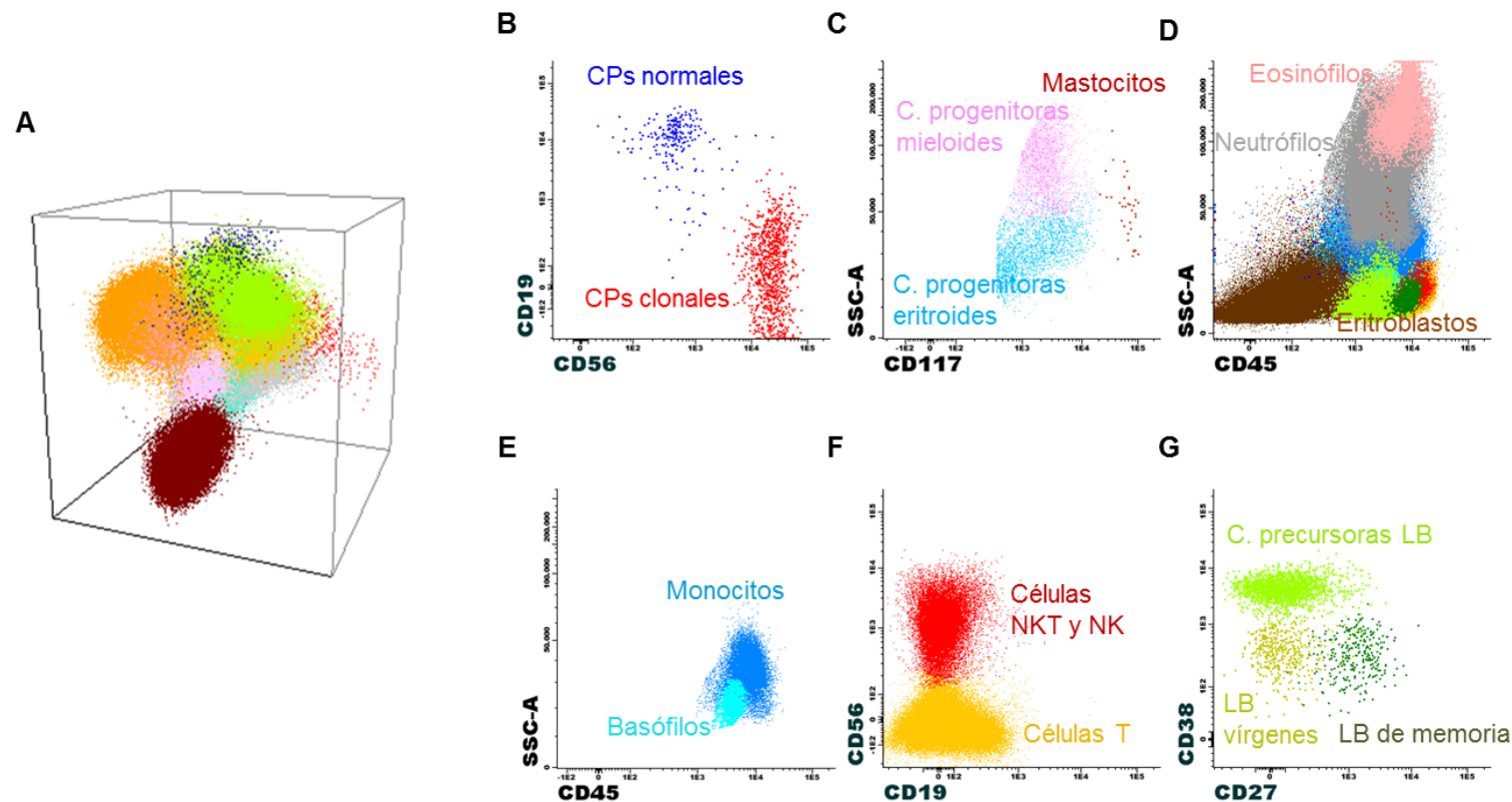


Figura 12. Análisis del perfil inmune durante la evaluación de enfermedad mínima residual en médula ósea (MO) mediante citometría de flujo multiparamétrica de segunda generación en mieloma múltiple. (A) Visualización del total de las poblaciones celulares analizadas en el diagrama de separador automatizado de poblaciones APS del programa Infinicyt. **(B)** Las células plasmáticas (CPs) totales se diferencian del resto de células de la MO mediante los marcadores de identificación CD38 y CD138, después el resto de los marcadores, como CD19 y CD56, se utilizan para distinguir CPs normales (en azul) y CPs clonales residuales (en rojo). **(C-E)** Visualización de distintas poblaciones mieloides en función de la expresión de CD117, CD45 y SSC. **(F)** Las células NK y NKT y los linfocitos T se identifican haciendo una primera selección de la población linfocitaria y excluyendo las células CD19+, después, se distinguen entre sí por la expresión de CD56, entre otros marcadores. **(G)** Las distintas poblaciones celulares de línea B (precursores B, linfocitos B vírgenes y de memoria) se identifican haciendo una primera selección de las células CD19+, después, se distinguen entre sí en función de la expresión de CD45, CD38, CD81 y CD27.

Estos datos se utilizaron para generar perfiles inmunes en 146 pacientes. Para ello, se realizó un análisis PCA basado en las 13 poblaciones mencionadas utilizando el separador de poblaciones automatizado (que enfrenta componente principal 1 vs. componente principal 2), una herramienta de análisis multivariante y de representación gráfica del programa informático Infinicyt (Cytognos SL), descrito anteriormente (B Paiva, Vídriales, et al., 2013).

2.3. NGF

Se utilizó NGF para la monitorización de EMR de 25 pacientes incluidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2012MENOS65. De forma resumida, el método de procesamiento se basó en un protocolo estandarizado de lisis, lavado y marcaje de las muestras, que permite el análisis de un gran número de células (al menos $2 \times 5 \times 10^6$ células/tubo). Para la identificación de las CPs y la discriminación entre aberrantes y normales, se utilizó un panel de marcaje optimizado (Flores-Montero et al., 2017) que consistía en las siguientes dos combinaciones de 8 colores: (BV421/BV510/FITC/PE/PerCPs-Cy5.5/PE-Cy7/APC/APCH7): (1) CD138/CD27/CD38/CD56/CD45/CD19/CD117/CD81 y (2) CD138/CD27/CD38/CD56/CD45/CD19/citok/cito λ . Esta estrategia permitía la detección de EMR debido a su fenotipo aberrante, definido por la infra expresión de CD19, CD27, CD38, CD45 o CD81, o a la sobreexpresión de CD56, CD117 o CD138, y a su monoclonalidad (restricción de cadenas ligeras) . Se utilizaron nuevas herramientas informáticas que permitían la fusión de los datos de las dos combinaciones de AcMo y el análisis automatizado del compartimento de CPs (Flores-Montero et al., 2017), lo que supuso alcanzar un límite de detección de EMR de 2×10^{-6} .

3. Caracterización citogenética

Se realizaron estudios de hibridación fluorescente in situ (FISH) al diagnóstico, en muestras enriquecidas de CPs mediante selección inmunomagnética, a 777 de los 1265 pacientes analizados incluidos en los cuatro protocolos PETHEMA (GEM2000, GEM2005MENOS65, GEM2005MAS65 y GEM2010MAS65). Entre otras alteraciones citogenéticas, se estudiaron las traslocaciones t(4;14) y t(14;16) y la delección del(17p). Los pacientes que tenían alguna de estas tres alteraciones eran clasificados con MM de alto riesgo citogenético mientras los demás casos eran clasificados con MM de riesgo estándar.

En el caso concreto de los 162 pacientes incluidos en el protocolo PETHEMA/GEM2010MAS65 con datos de EMR, se le realizó FISH al diagnóstico a 132 de los 162 pacientes. Se analizaron las traslocaciones que involucran IGH, ganancia de 1q y delección del(17p). De esta forma, los casos con t(4;14), t(14;16) y/o del(17p) fueron clasificados de alto riesgo citogenético (n=26) y el resto de los casos se clasificaron de riesgo estándar (n=106).

4. Análisis estadístico

En el estudio del valor pronóstico del perfil fenotípico de CPs clonales realizado con los datos de 1265 pacientes incluidos en los ensayos PETHEMA GEM2000, GEM2005MENOS65, GEM2005MAS65 y GEM2010MAS65, la SLP se midió desde el momento del diagnóstico hasta la progresión o fallecimiento por cualquier causa. La SG se definió como el tiempo desde el diagnóstico hasta el fallecimiento por cualquier causa. Se utilizó el método Kaplan-Meier para analizar la supervivencia de los pacientes y la significancia de la diferencia entre las curvas se evaluó con el test de Log-Rank a dos colas. Se realizó un análisis univariante para medir el impacto en la SLP y la SG de la elegibilidad para trasplante, así como de varios factores pronósticos de referencia, incluyendo el sistema de estratificación de riesgo ISS, los niveles séricos de LDH, y la clasificación citogenética. Además, se hizo un análisis multivariante de las variables con significancia estadística en el análisis univariante con el objetivo de estudiar su valor pronóstico independiente en SLP y SG, para lo cual se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox. El análisis multivariante y la visualización de los perfiles fenotípicos y citogenéticos se realizaron utilizando una escala de 0 a 100 para representar los perfiles de expresión de los antígenos, representados gráficamente mediante t-SNE (Infinicyt, Cytognos).

Para evaluar de forma longitudinal y comparar los parámetros cuantitativos y cualitativos del perfil fenotípico de las CPs clonales al diagnóstico y en los diferentes momentos de evaluación de EMR, se utilizaron respectivamente el test de Friedman y el test de ANOVA para medidas repetidas, aplicando el factor de corrección Greenhouse-Geisser.

En el estudio del perfil inmune de los 146 pacientes del ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65, la significancia estadística de las diferencias observadas en la distribución de las poblaciones de los diferentes grupos de pacientes fue analizada mediante el

test de Kruskal-Wallis. Las curvas de supervivencia fueron calculadas mediante el método Kaplan-Meier y comparadas utilizando el test Log-Rank a dos colas. El TTP se definió como el tiempo transcurrido desde el estudio de EMR hasta la progresión de la enfermedad, y la SG se definió como el tiempo desde el estudio de EMR hasta el fallecimiento por cualquier causa. Se realizó un análisis univariante para medir el impacto en la supervivencia de diferentes factores, incluyendo la edad, el riesgo del paciente según el sistema ISS, la clasificación citogenética, la profundidad serológica de la respuesta y la EMR. El valor pronóstico independiente de aquellos factores con impacto significativo en el estudio univariante se estudió mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

En todos los test estadísticos realizados se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (versión 20.0; IBM, Chicago, IL, EEUU) y con el programa estadístico R (versión 3.2.3, *The R Foundation for Statistical Computing*).

RESULTADOS

1. Evaluación de EMR mediante CFM de segunda generación

Empezamos analizando las diferencias en especificidad y sensibilidad entre la CFM de primera generación, basada en cuatro antígenos (CD19, CD38, CD45 y CD56) y en la evaluación de 2×10^5 células, y la CFM de segunda generación que combina ocho marcadores (CD19, CD38, CD45 y CD56, CD27, CD81, CD117, CD138) y en la que se evaluaron aproximadamente 2×10^6 células. Para ello, construimos una base de datos de referencia con los datos de CPs clonales y normales de MO mediante el programa informático Infinicyt. Brevemente, se analizaron muestras de MO de 71 pacientes con MM en el momento del diagnóstico y de 17 individuos sanos. Estos casos se agruparon mediante el programa informático Infinicyt para formar un archivo de datos de referencia y un modelo de PCA (**Figura 13**).

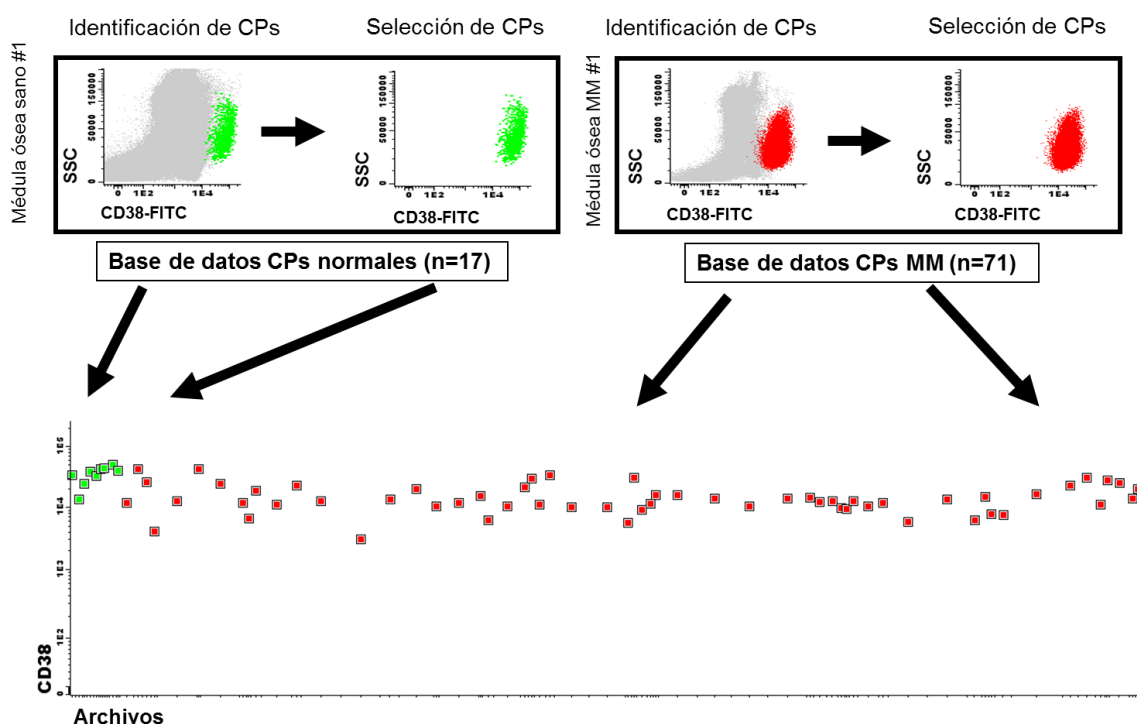


Figura 13. Construcción de la base de datos de referencia de células plasmáticas (CPs) normales y clonales. Se identificaron y se seleccionaron las CPs normales (en verde) y clonales (en rojo) de médula ósea de 17 individuos sanos y de 71 pacientes con mieloma múltiple (MM) al diagnóstico, respectivamente. Todas las muestras fueron marcadas con el panel de 8 colores CD138-BV421, CD27-BV510, CD38-FITC, CD56-PE, CD45-PerCPsCy5.5, CD19-PECy7, CD117-APC, CD81-APCH7, cuyos marcadores sirvieron para la identificación de las CPs y también para la discriminación entre CPs normales y patológicas en las muestras de los pacientes con MM. Posteriormente, los archivos generados con la selección de las CPs normales y clonales fueron fusionados para crear la base de datos mediante las herramientas proporcionadas por el programa informático Infinicyt.

Primero, estudiamos la contribución individual de cada marcador para discriminar entre CPs normales y aberrantes (**Figura 14A**). CD56 fue el antígeno con mayor poder discriminatorio, seguido de CD19, CD81, CD27, CD117, CD45, CD38 y CD138. Por lo tanto, tres de los marcadores incluidos en los nuevos paneles de 8 colores - CD81, CD27 y CD117 -, tuvieron mayor poder discriminativo que los marcadores convencionales CD45 o CD38. A continuación, identificamos y seleccionamos CPs clonales de muestras de MO estudiadas durante la evaluación de EMR en 50 pacientes con EMR positiva incluidos en el protocolo PETHEMA/GEM2010MAS65 y elegidos de forma aleatoria. Analizamos las CPs clonales correspondientes a la EMR positiva de esos 50 pacientes en un PCA que incluía la base de datos de CPs clonales y normales descrita anteriormente, para comparar la capacidad de discriminación de las estrategias de 4 y 8 colores a la hora de clasificar las CPs clonales de EMR como patológicas o normales. En el análisis de PCA basado en 4 colores, 9 de 50 pacientes se situaban en la zona donde se superponían las curvas de la primera y segunda desviación estándar (DE) de las referencias de CPs normales y clonales (82% de precisión, **Figura 14B**). Por el contrario, en el análisis PCA con 8 colores todos los pacientes excepto dos, fueron clasificados correctamente dentro de la referencia de CPs aberrantes, fuera de las curvas de primera y segunda DE de la referencia normal (96% de precisión, **Figura 14C**).

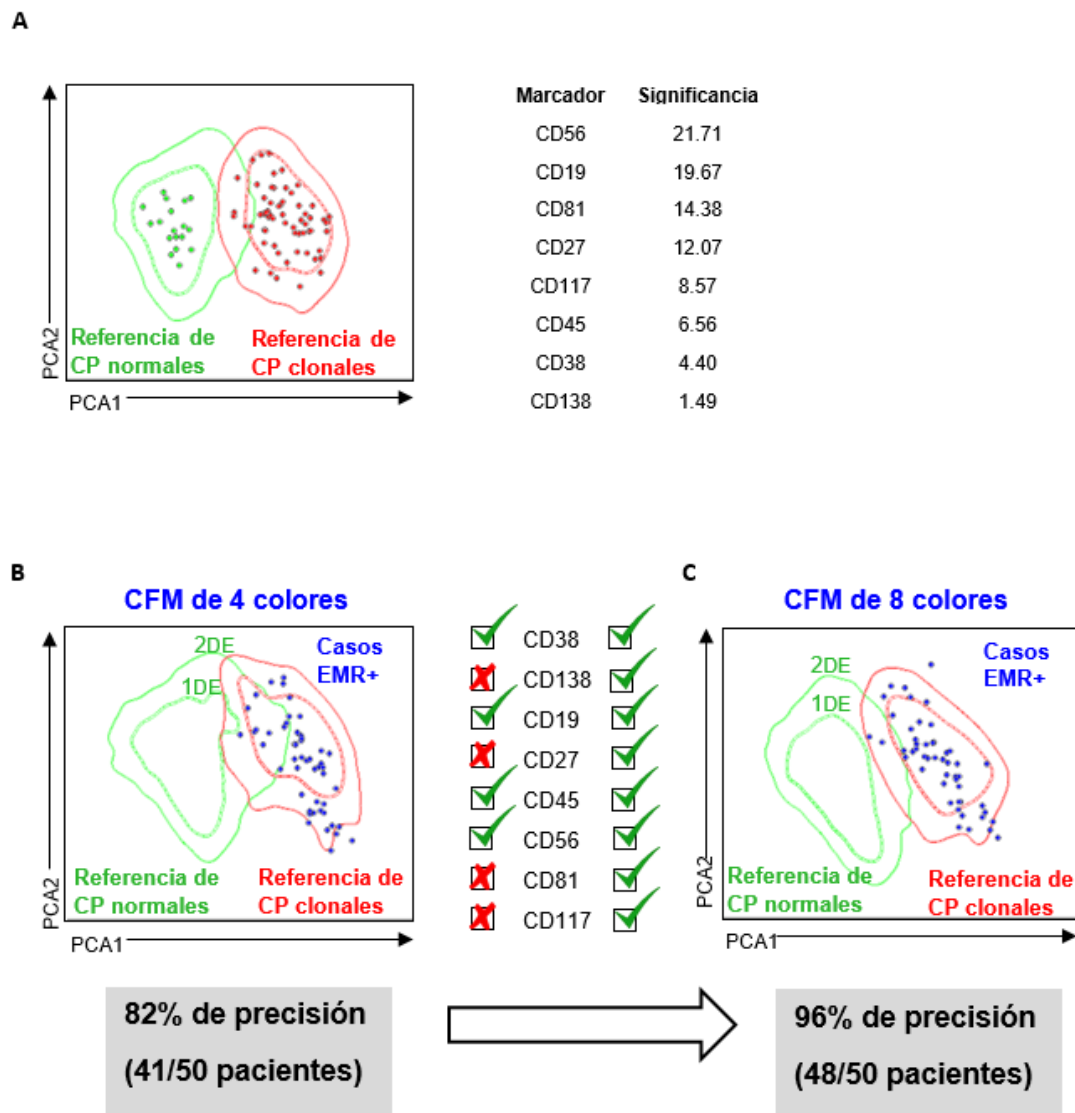


Figura 14. Evaluación de la especificidad de la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) de segunda generación vs CFM de primera generación en la monitorización de enfermedad mínima residual (EMR) en mieloma múltiple (MM). (A) Análisis de componentes principales (PCA) para la discriminación basada en el fenotipo entre células plasmáticas (CPs) normales de médula ósea (MO) de individuos sanos ($n=17$) (en color verde) y CPs clonales de MO de pacientes con MM ($n=71$) (en color rojo). Cada control o paciente está representado por un único punto, y aparecen representadas las curvas de 1 desviación estándar (DE) (línea discontinua) y 2 DE (línea continua) de las referencias de CPs normales y clonales. (B&C) CPs clonales de 50 pacientes con EMR positiva (puntos azules) seleccionadas en base al fenotipo aberrante de cada caso, fueron interpuestas al PCA seleccionando los 4 marcadores fenotípicos utilizados en la CFM de primera generación (CD38, CD19, CD45 y CD56) o seleccionando los 8 marcadores fenotípicos disponibles en la CFM de segunda generación (CD38, CD138, CD19, CD27, CD45, CD56, CD81 y CD117).

Además, quisimos evaluar el posible aumento de sensibilidad de la CFM de segunda frente a primera generación. Para ello, utilizamos el programa Infinicyt para reducir el número total de células a analizar desde 2×10^6 (segunda generación) hasta 2×10^5 (primera generación) en las muestras de CPs clonales de los 50 pacientes con EMR positiva descritos anteriormente.

De esta forma observamos que cuando sólo se analizaron 2×10^5 células (primera generación) 15 de los 50 casos (30%) eran clasificados erróneamente como EMR negativa, ya que las CPs clonales fueron indetectables o eran insuficientes para poder definir las como un *cluster* de EMR (Figura 15).

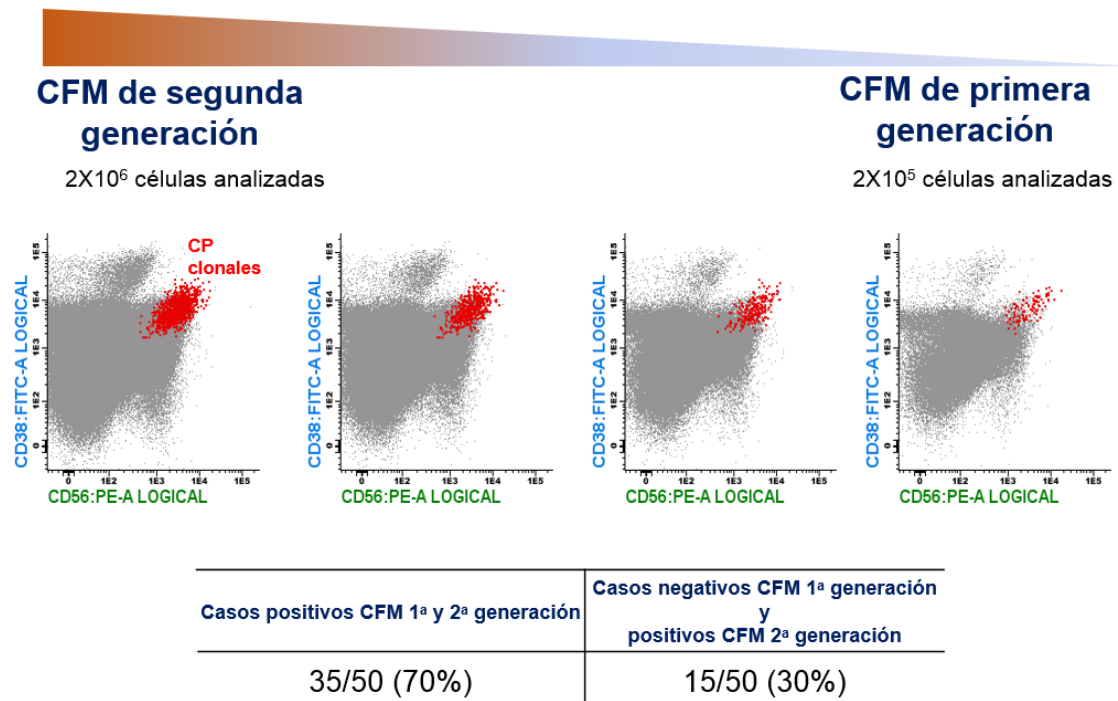


Figura 15. Evaluación de la sensibilidad de la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) de segunda vs primera generación en la monitorización enfermedad mínima residual (EMR) en mieloma múltiple. Se analizaron los archivos de citometría de 50 pacientes con EMR positiva incluidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65 utilizando un número de células totales de 2×10^6 (CFM de segunda generación) o 2×10^5 (CFM de primera generación) para evaluar el incremento de sensibilidad de la CFM de segunda generación sobre la CFM de primera generación. Cuando se analizaron solamente 2×10^5 células (CFM de primera generación), 15 de los 50 pacientes con EMR positiva (30%) fueron erróneamente clasificados como EMR negativa al no detectarse un *cluster* de EMR.

2. Significado clínico de la EMR negativa mediante CFM de segunda generación

De modo sorprendente, observamos que la detección de EMR en niveles inferiores a 10^{-4} (primera generación) tenía significado clínico, ya que solamente los pacientes con EMR negativa ($<10^{-5}$) tenían una supervivencia significativamente más prolongada, mientras que los pacientes con niveles de EMR entre 10^{-4} y 10^{-5} tenían un pronóstico similar al de los pacientes con niveles de EMR igual o superiores a 10^{-4} (Figuras 16A y 16B).

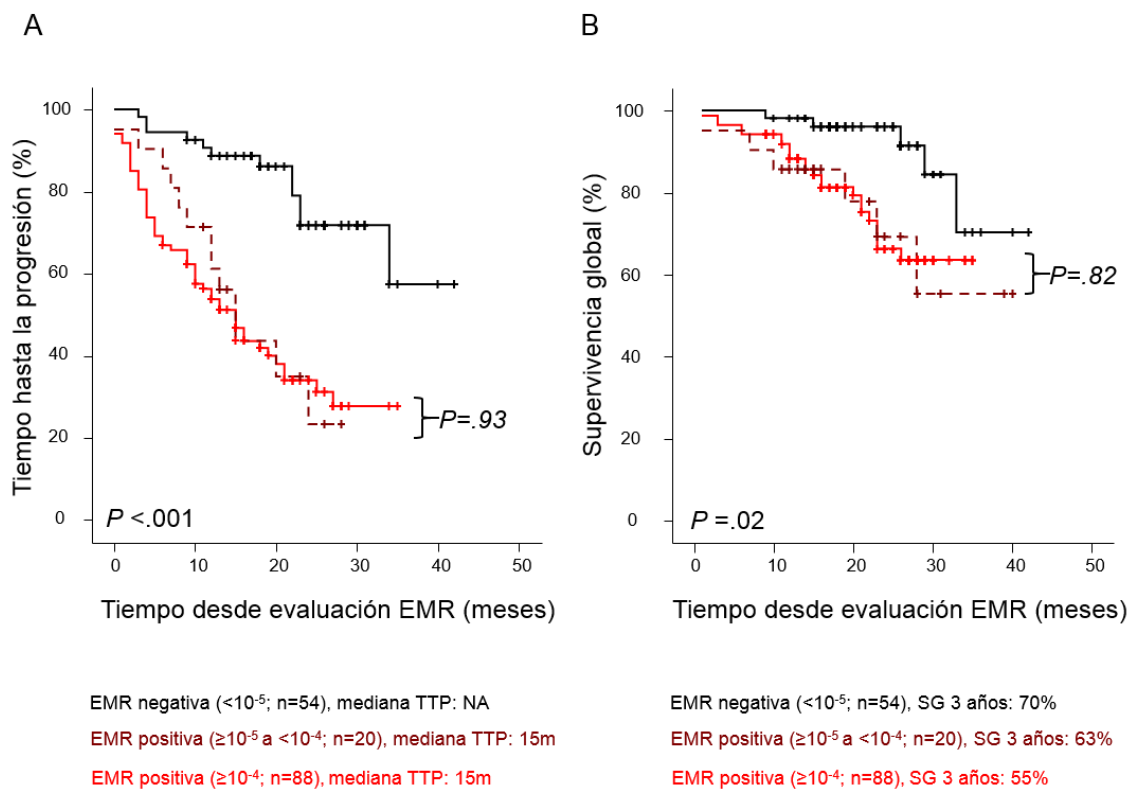


Figura 16. Supervivencia de los pacientes en base a los niveles de enfermedad mínima residual (EMR) detectados con citometría de flujo multiparamétrica de segunda generación. (A) Tiempo hasta la progresión (TTP) y (B) supervivencia global (SG) de los 162 pacientes estudiados. 54 pacientes tuvieron EMR indetectable o inferior a 0,001% (EMR negativa $<10^{-5}$), 20 casos tuvieron EMR detectable con niveles entre 0,001% y 0,009% (EMR positiva $\ge 10^{-5}$ a 10^{-4}) y los 88 pacientes restantes tuvieron EMR igual o superior a 0,01% (EMR positiva $\ge 10^{-4}$). NA: No alcanzada.

A continuación, evaluamos el impacto de los primeros 9 ciclos de quimioterapia en los niveles de EMR. Así, 25 de los 127 (20%) pacientes analizados tras el ciclo 9 tuvieron EMR negativa, sin que hubiera diferencias en cuanto a la proporción de casos que recibieron administración secuencial o alternante de fármacos (20% vs. 19%, $P=.97$). La estratificación de los pacientes en función del estatus de EMR reflejó diferencias significativas en supervivencia, ya que los pacientes con EMR negativa tras el ciclo 9 tenían un TTP y SG significativamente más prolongados comparado con los pacientes con EMR positiva, indistintamente de si habían o no alcanzado RC. De hecho, no hubo diferencias significativas en supervivencia entre los pacientes con EMR positiva y en RC respecto a los que no alcanzaron RC (Figuras 17A y 17B, respectivamente).

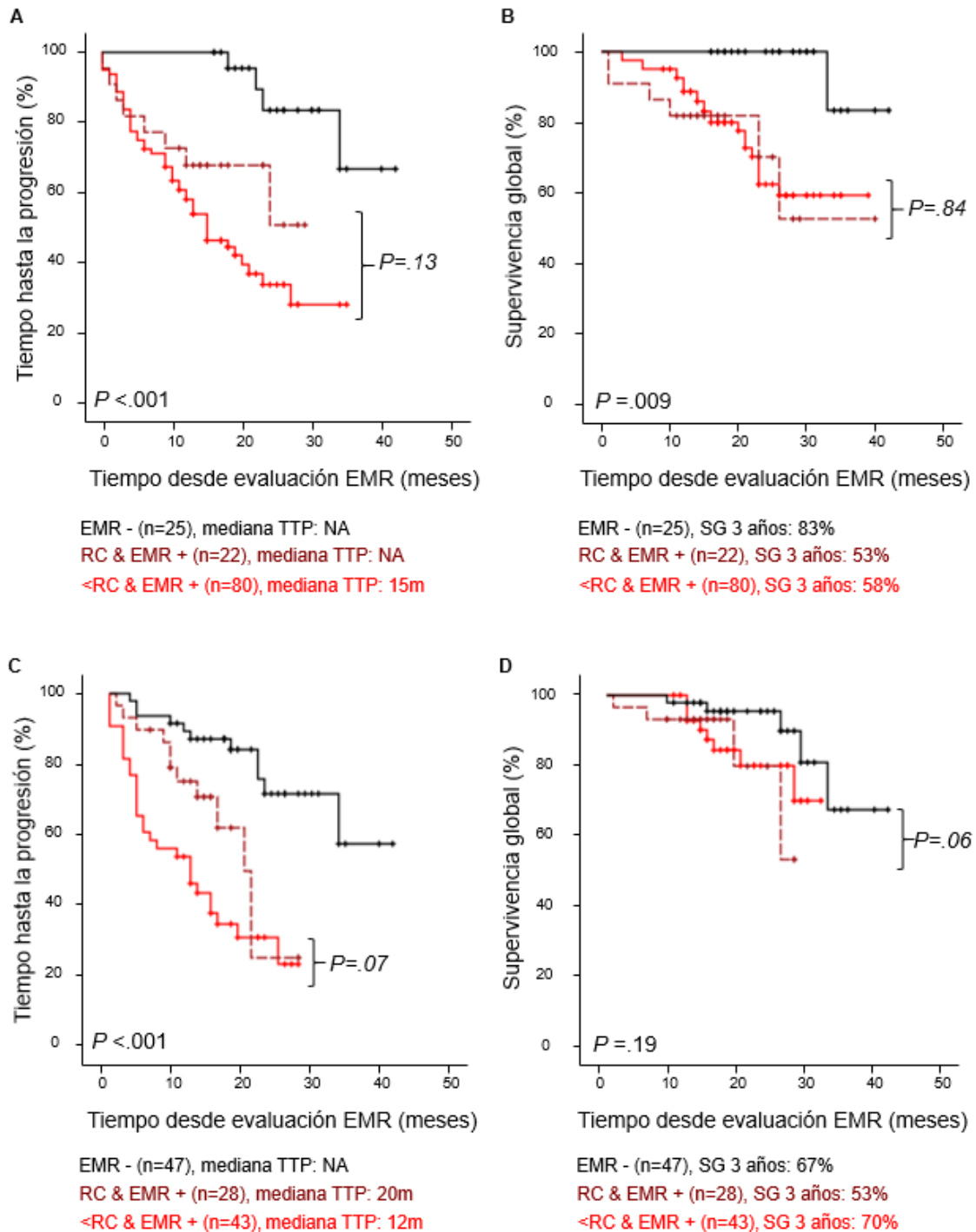


Figura 17. Supervivencia de los pacientes en base a los niveles de enfermedad mínima residual (EMR) detectados con citometría de flujo multiparamétrica de segunda generación: evaluación en los ciclos 9 y 18. (A) Tiempo hasta la progresión (TTP) y (B) supervivencia global (SG) de los pacientes con mieloma múltiple en el ciclo 9 (n=127) y en el ciclo 18 (paneles C y D, respectivamente; n=118). RC: remisión completa.

A continuación, analizamos el estatus de EMR a lo largo del tratamiento, para lo cual analizamos 83 pacientes que tenían estudios de EMR tras los ciclos 9 y 18. Dieciséis pacientes (19%) con EMR positiva tras ciclo 9 alcanzaron EMR negativa tras el ciclo 18, sin diferencias en

la proporción de pacientes a los que se les administró el esquema secuencial o el alterno (23% vs 15%, respectivamente; $P=.28$). No hubo ningún caso con EMR negativa tras el ciclo 9 que se positivizase tras el ciclo 18. La proporción de pacientes que alcanzaron EMR negativa tras el ciclo 18 fue ligeramente superior, aunque no significativamente, en el grupo de pacientes que siguieron el esquema de administración secuencial frente a los que siguieron el esquema alterno (46% vs 33%, $P=.16$). Por otro lado, el diseño del ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65 (18 ciclos de tratamiento sin mantenimiento) permitía evaluar el impacto de la EMR en la supervivencia de los pacientes sin la variable de confusión que supone el tratamiento continuado hasta progresión de la enfermedad. De esta forma, observamos que la mediana de TTP desde la evaluación de la EMR tras el ciclo 18 fue de sólo 12 meses para los pacientes que no alcanzaron RC, de 20 meses para los pacientes en RC y que, sin embargo, tenían EMR positiva, mientras que los pacientes con EMR negativa no alcanzaron la mediana (**Figuras 17C y 17D**).

Después, quisimos investigar el significado clínico de la negativización de EMR en dos subgrupos de pacientes: de riesgo estándar y de alto riesgo citogenético. Cabe señalar que los pacientes de alto riesgo que alcanzaron EMR negativa presentaban un TTP significativamente más prolongado que los pacientes con EMR positiva y de alto riesgo, y similar a la de los pacientes de riesgo estándar con EMR negativa. Por el contrario, los pacientes con EMR positiva, a pesar de tener riesgo estándar tuvieron un TTP significativamente menor, aunque superior al de los pacientes con alto riesgo citogenético y EMR positiva (**Figura 18**).

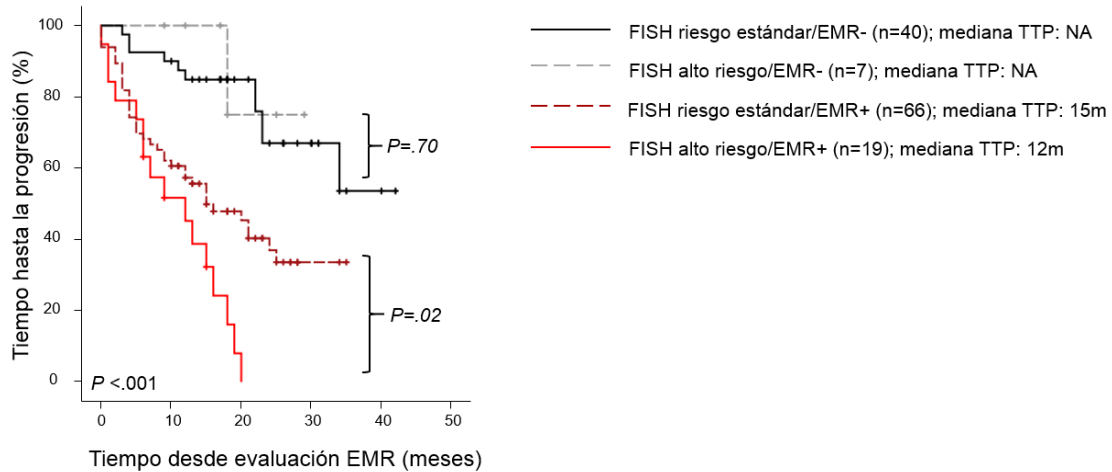


Figura 18. Impacto de alcanzar enfermedad mínima residual (EMR) negativa en el tiempo hasta la progresión (TTP) de los pacientes con mieloma múltiple en base a su perfil citogenético (n=132). NA: No alcanzado

También quisimos determinar si el impacto de alcanzar EMR negativa se mantenía en pacientes muy mayores. Así, mientras que ninguno de los grupos de pacientes con EMR negativa, ni los que tenían edades entre los 65 y 75 años, ni los mayores de 75, alcanzaron la mediana de TTP desde el momento de evaluación de EMR, los pacientes con EMR positiva tuvieron un TTP significativamente inferior, indistintamente de la edad de los pacientes (**Figura 19**).

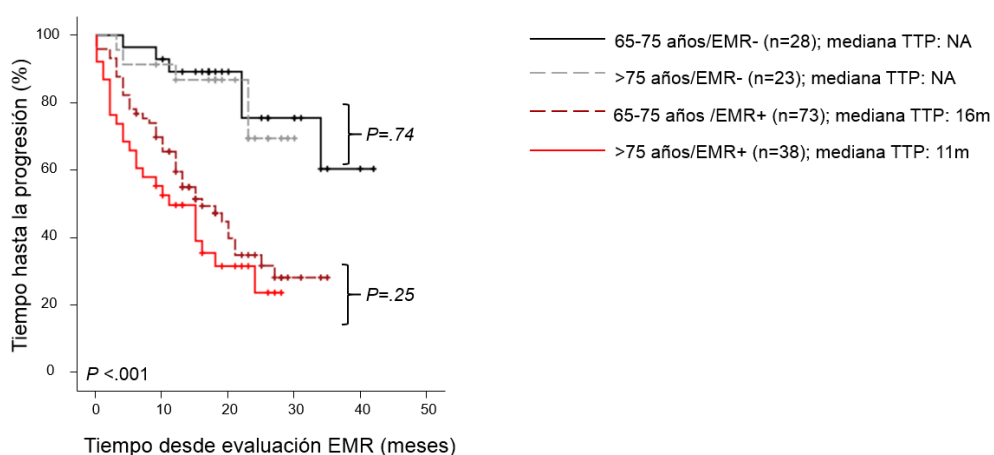


Figura 19. Impacto de alcanzar enfermedad mínima residual (EMR) negativa en el tiempo hasta la progresión (TTP) de los pacientes con mieloma múltiple en base a su edad (n=162). NA: No alcanzado

Por último, el análisis multivariante que incluía factores pronósticos basales o posteriores al tratamiento con impacto en supervivencia mediante análisis univariante (la edad, el riesgo según el sistema ISS, el perfil citogenético mediante FISH, la profundidad de la respuesta al tratamiento o el estatus de EMR), reveló que únicamente la citogenética y la evaluación de EMR retenían valor pronóstico independiente para el TTP y la SG (**Tabla 8**).

Tabla 8. Análisis multivariante incluyendo los factores pronósticos basales o posteriores al tratamiento con impacto en el tiempo hasta la progresión (TTP) o en la supervivencia global (SG) en el análisis univariante.

	TTP		SG	
	HR (95% IC)	P	HR (95% IC)	P
Edad (<75 vs ≥75 años)	-	-	1.7 (0.8-3.7)	.16
ISS (estadio I vs II y III)	-	-	2.0 (0.6-6.8)	.28
Citogenética de riesgo estándar vs alto riesgo*	2.0 (1.1-3.4)	.02	4.3 (2.0-9.2)	<.001
Profundidad de la respuesta (RC vs <RC)	1.7 (0.9-3.4)	.07	1.2 (0.5-2.8)	.63
EMR (negativa vs positiva)	2.7 (1.3-5.5)	.007	3.1 (1.1-8.8)	.04

Abreviaturas: HR, *hazard ratio*; IC, intervalo de confianza; ISS, *International Staging System* (sistema de estadiaje internacional). *Citogenética de alto riesgo incluye t(4;14), t(14;16) y/o del(17p); citogenética estándar incluye el resto de los casos.

3. Valor pronóstico del perfil inmune durante la evaluación de EMR

Para investigar si el perfil inmune de los pacientes durante la monitorización de EMR también puede tener valor pronóstico, evaluamos el patrón de distribución en MO de 13 poblaciones celulares identificadas mediante CFM de segunda generación en un total 146 pacientes (n=58 tras el ciclo 9, n=88 tras el ciclo 18). De este modo, con el programa Infinicyt y la herramienta APS pudimos comprobar que los pacientes se agrupaban en tres grupos en función de su perfil inmune, denominados A (n=16), B (n=117) y C (n=13), que se diferenciaban por un número de eritroblastos progresivamente mayor, junto con un descenso progresivo en el compartimento de linfocitos B vírgenes y de memoria (**Figura 20**). No hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos en cuanto a la proporción de pacientes que recibieron el esquema de administración secuencial o el alterno (38% vs 62%, 53% vs 47% y 36% vs 64% en los grupos A, B y C, respectivamente), ni en cuanto a la estratificación según el sistema ISS

(paciente en grupos I vs II y III: 19% vs 81%, 20% vs 80% y 15% vs 85% en los grupos A, B y C, respectivamente) o al perfil citogenético mediante FISH (pacientes de alto riesgo vs riesgo estándar: 7% vs 93%, 23% vs 77% y 17% vs 83% en los grupos A, B y C, respectivamente); sin embargo, aunque no se hayan visto diferencias significativas, habría que validar estos hallazgos en series de pacientes más amplias.

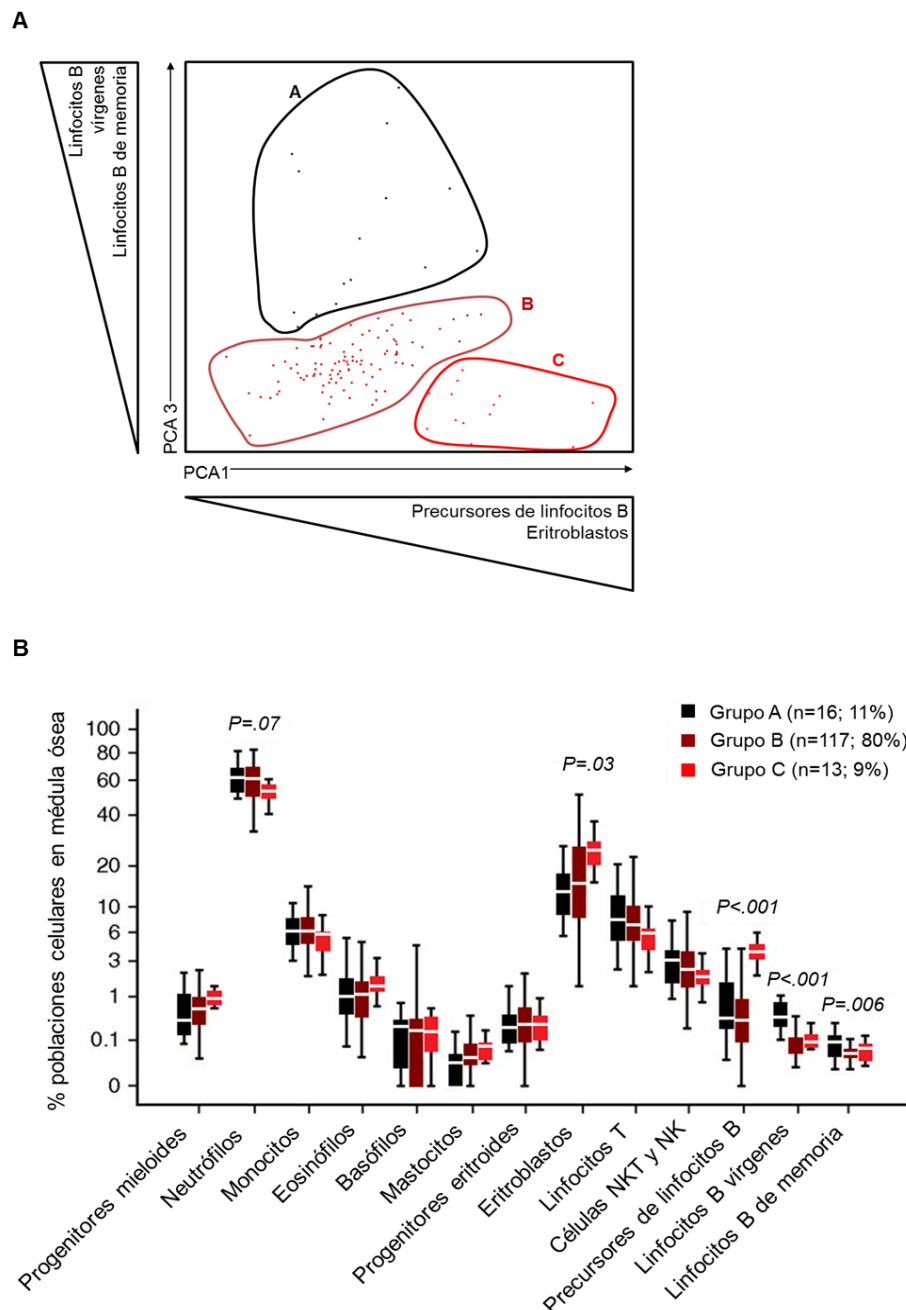


Figura 20. Análisis del perfil inmune de pacientes con mieloma múltiple durante la monitorización de enfermedad mínima residual (EMR). (A) Análisis de componentes principales (PCA) del perfil inmune de los pacientes definido por la distribución de 13 poblaciones celulares (excluyendo células plasmáticas normales y clonales) en la médula ósea durante la evaluación de EMR (n=146). **(B)** Distribución de las 13 poblaciones celulares en los grupos de pacientes A (n=16), B (n=116) y C (n=13).

Al evaluar el valor pronóstico de la clasificación inmune, observamos que los pacientes del grupo A mostraban una tendencia hacia un mayor TTP y tenían una SG significativamente más prolongada comparado con los grupos B y C (**Figuras 21A y 21B**). Cabe destacar que no hubo diferencias significativas en el estatus de EMR entre los tres grupos de pacientes, y que, incluso en los pacientes con EMR persistente, el perfil inmune seguía teniendo valor pronóstico con una SG a los tres años de 100%, 65% y del 0% para los grupos A, B y C, respectivamente ($P=.003$) (**Figuras 21C y 21D**).

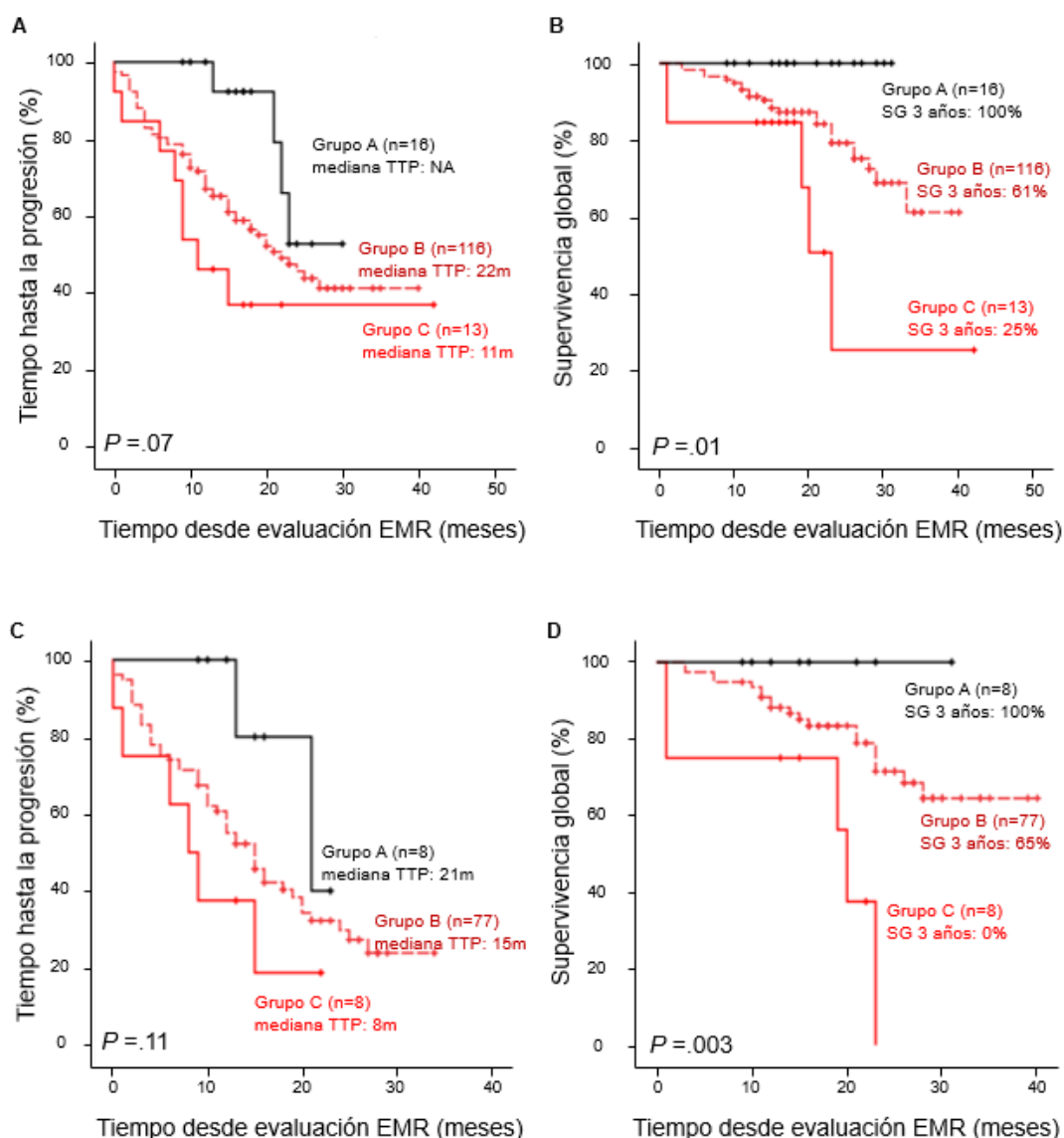


Figura 21. Supervivencia en base al perfil inmune. (A) Tiempo hasta la progresión (TTP) y (B) supervivencia global (SG) del total de pacientes de los grupos A ($n=16$), B ($n=116$) y C ($n=13$), y de los pacientes de los grupos A ($n=8$), B ($n=77$) y C ($n=8$) con enfermedad mínima residual (EMR) positiva (paneles C y D, respectivamente).

4. Valor pronóstico de la expresión antigénica

4.1. Valor pronóstico de la expresión antigénica al diagnóstico

Antes de centrarnos en la identificación de aquellos antígenos que podían contribuir a la estratificación de pacientes con EMR positiva, comenzamos el estudio investigando el valor pronóstico de todos los marcadores que se utilizan para monitorizar EMR en una serie de 1265 pacientes de nuevo diagnóstico incluidos en los protocolos GEM2000 y GEM2005MAS65 para pacientes candidatos a trasplante y GEM2005MENOS65 y GEM2010MAS65 para pacientes mayores no candidatos a trasplante. Los pacientes fueron dicotomizados en base al porcentaje de CPs clonales positivas para los marcadores con patrón de expresión bimodal (CD19, CD27, CD45, CD56, CD81 y CD117), o en base a la MFI de las CPs clonales para los marcadores con patrón de expresión unimodal (alta o baja intensidad de expresión de CD38 o CD138), teniendo como referencia el patrón observado en otras células nucleadas de la muestra. Para el primer tipo de marcadores, los puntos de corte de expresión óptimos se establecieron basados en el cuartil de porcentaje con el valor P más bajo alcanzado para SLP (es decir: 0%, 25%, 50%, 100% de CPs clonales positivas para el marcador). El análisis conjunto de los datos de los 1265 pacientes estudiados mostró que todos los marcadores excepto CD56 tenían valor pronóstico (**Tabla 10**). Sin embargo, al fraccionar el análisis en base al tipo de tratamiento recibido, observamos que el impacto negativo de CD19 (cuando se expresaba en al menos el 50% de las CPs clonales) y particularmente, la expresión de CD45 (cuando el 25% o más de las CPs clonales eran positivas) sólo fue significativo en pacientes mayores no candidatos a trasplante (mediana de SLP de 22 vs 32 meses, $P=.001$; mediana de SG de 43 vs 60 meses, $P=.016$). Al contrario, el efecto favorable de la expresión de CD117 (cuando era positivo en al menos el 50% de las células) sólo fue significativo en pacientes candidatos a trasplante que no recibieron IPs y/o IMIDS (mediana de SLP de 44 vs 32 meses, $P=.004$; mediana de SG de 88 vs 52 meses, $P<.001$). En cambio, los patrones de expresión de CD38, CD81 y CD138 demostraron valor pronóstico en todos los protocolos en los que se analizaban estos marcadores (**Tabla 9**).

Tabla 9. Valor pronóstico de la expresión antigénica en las células plasmáticas (CPs) clonales en pacientes con mieloma múltiple (MM) de nuevo diagnóstico.

Expresión del antígeno (% punto de corte)	Serie global		No IPs o IMIDs		IPs o IMIDs			
			TASPE		TASPE		No TASPE	
	SLP	SG	SLP	SG	SLP	SG	SLP	SG
CD19 ($\geq 50\%$)*								(↓)
CD27 ($\geq 25\%$)*	(↓)	(↓)	NE	NE				(↓)
CD45 ($\geq 25\%$)*	(↓)						(↓)	(↓)
CD56*								
CD81 ($\geq 25\%$)*	(↓)	(↓)	NE	NE	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)
CD117 ($\geq 50\%$)*	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)				
CD38 ^{low} #	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)		(↓)
CD138 ^{low} #	(↓)	(↓)	(↓)		NE	NE	(↓)	(↓)
*Pacientes clasificados en base a menor vs igual o mayor porcentaje de CPs que expresan el marcador.								
# Pacientes clasificados en base a baja (<i>low</i>) o alta (<i>bright</i>) intensidad en la expresión del marcador.					$P < .09$	$P < .05$	$P < .01$	$P < .001$

Abreviaturas: TASPE, trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica; IMIDs, inmunomoduladores; IPs; inhibidores de proteasoma; NE: No estudiado. Análisis del total de 1265 pacientes incluidos en cuatro ensayos clínicos consecutivos PETHEMA/GEM: GEM2000, GEM2005MENOS65, GEM2005MAS65 y GEM2010MAS65. El impacto individual de los ocho antígenos utilizados para la monitorización de la enfermedad mínima residual (CD38, CD138, CD19, CD27, CD45, CD56, CD81 y CD117) en la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) está representado mediante un código de colores basado en el valor P. Para cada antígeno está indicado el porcentaje de expresión con la cual se alcanzaba el máximo valor pronóstico para SLP. Para CD38 y CD138 los pacientes fueron clasificados (low o bright) en base a la interpretación visual de su intensidad media de fluorescencia (MFI) en las CPs clonales vs el resto de las células nucleadas. El valor pronóstico de la expresión de los antígenos fue estudiado en la serie global de pacientes y también de forma específica en los pacientes candidatos a trasplante antes (GEM2000) y después de la introducción de IPs e IMIDs (GEM2005MENOS65), así como en pacientes no candidatos a trasplante (GEM2005MAS65, GEM2010MAS65). Las flechas indican pronóstico favorable (↑) o adverso (↓).

Los pacientes con baja densidad de CD38 en las CPs clonales tuvieron una SLP inferior comparado con los pacientes que tenían expresión intensa de CD38 (mediana de 30 vs 38 meses, $P < .001$) y también una menor SG (mediana de 58 vs 77 meses; $P < .001$) (**Figuras 22A y 22B**). Observamos resultados comparables con los pacientes cuyas CPs clonales tenían

una densidad de CD138 baja comparado con los pacientes que expresaban intensamente CD138 (mediana de SLP de 29 vs 34 meses, $P=.003$; mediana SG de 55 vs 67 meses, $P=.04$). Por último, los pacientes con una expresión de CD81 en al menos el 25% de las CPs clonales tenían una SLP y SG inferiores comparado con el resto de los pacientes (mediana de 24 vs 38 meses, $P=.004$; mediana de 53 vs 81 meses, $P<.001$) (**Figuras 22C y 22D**).

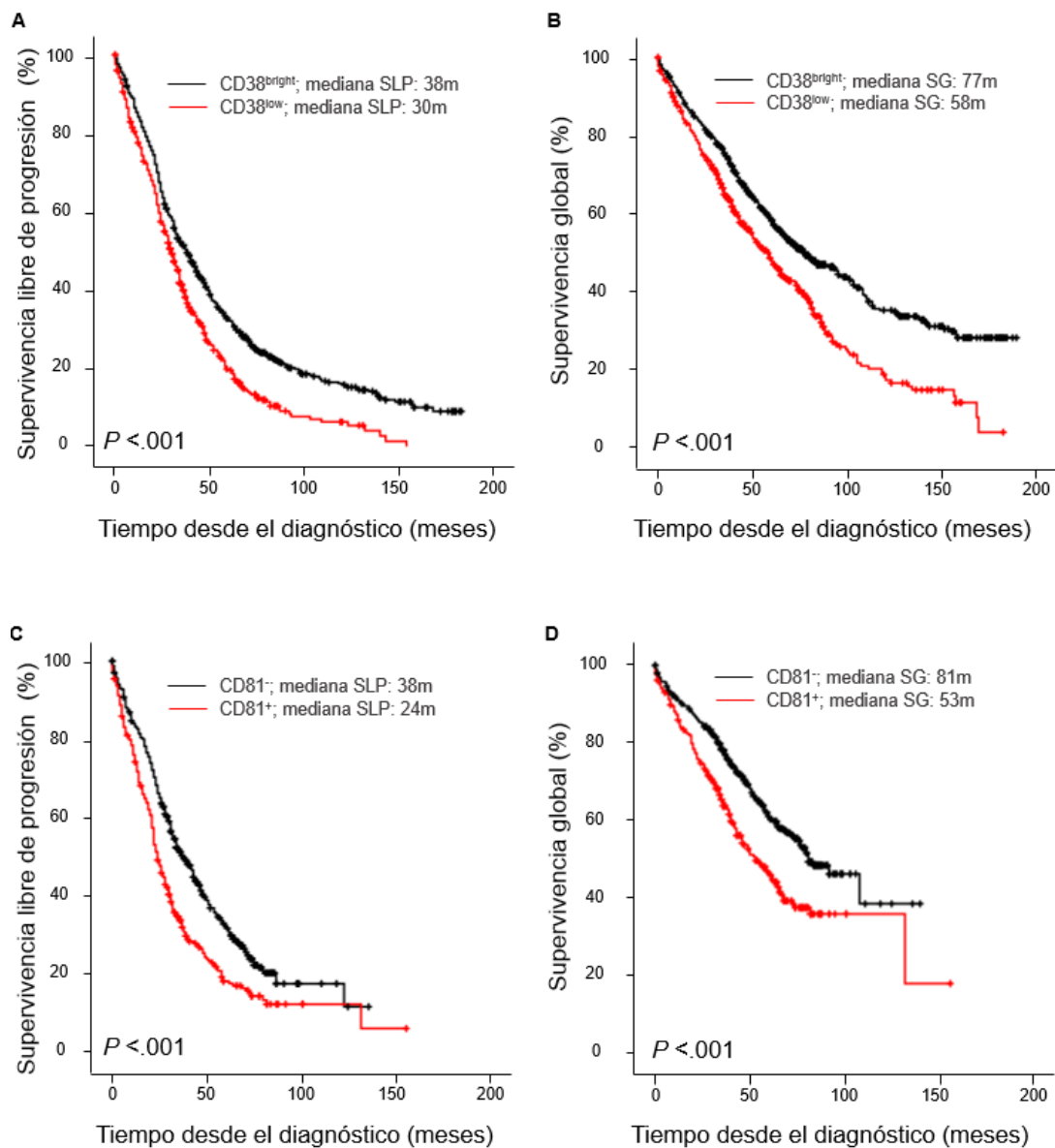


Figura 22. Supervivencia libre de progresión (SLP) (**A**) y supervivencia global (SG) (**B**) del total de los pacientes con patrón de expresión alta (bright; $n=764$) vs baja (low; $n=499$) de CD38, y de los pacientes con expresión positiva (en al menos el 25% de las células plasmáticas; $n=285$) vs negativa ($n=500$) de CD81 (paneles **C** & **D**, respectivamente).

Estos resultados demostraban que la mayoría de los marcadores necesarios para la monitorización de EMR tienen valor pronóstico en pacientes con MM, pero también que el TASPE junto con el empleo de fármacos más eficaces, pueden modular el pronóstico adverso de determinados antígenos.

4.2. Comparación longitudinal de los perfiles fenotípicos de las CPs clonales desde el diagnóstico hasta los distintos momentos de evaluación de EMR

Hasta el momento, apenas se había investigado la estabilidad antigénica a lo largo del tratamiento del MM, lo cual nos animó a estudiar el perfil de expresión de los diferentes marcadores en las CPs clonales al diagnóstico y en distintos momentos de evaluación de EMR en 25 pacientes que recibieron un tratamiento uniforme establecido en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2012MENOS65, y que tuvieron EMR positiva tras cada una de las etapas del protocolo terapéutico. Este análisis tenía el objetivo de investigar si el fenotipo de las CPs clonales tras tratamiento era representativo del fenotipo que tenían las CPs clonales al diagnóstico, donde habíamos recogido el grueso de los resultados sobre el valor pronóstico de su perfil antigénico. Como era de esperar, la carga tumoral disminuyó significativamente desde el diagnóstico hasta la evaluación de EMR tras seis ciclos de inducción con VRd, tras el TASPE posterior a dosis altas de quimioterapia, y tras dos ciclos de consolidación con VRd (mediana de porcentaje de CPs clonales de 6%, 0,05%, 0,009% y 0,003%, respectivamente; $P < 0.001$) (**Figura 23**). Por lo tanto, la presión ejercida por el tratamiento sobre el total de las CPs clonales al diagnóstico provocó la selección de cantidades mínimas de CPs clonales quimiorresistentes (EMR).

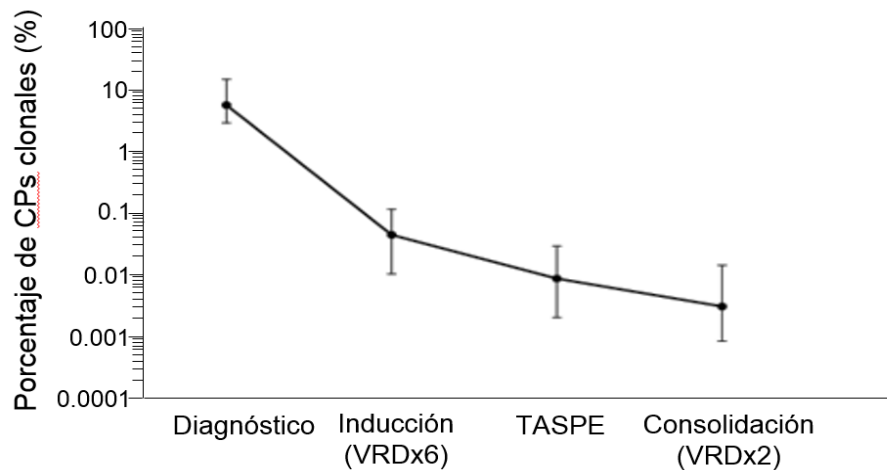


Figura 23. Porcentaje de células plasmáticas (CPs) clonales en médula ósea al diagnóstico y durante la monitorización de enfermedad mínima residual tras seis ciclos de inducción con bortezomib, lenalidomida y dexametasona (VRd), dosis altas de quimioterapia y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (TASPE), y dos ciclos de consolidación con VRd, de 25 pacientes incluidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2012MENOS65. Los puntos y las líneas verticales representan el valor medio y los percentiles 25 y 75, respectivamente.

Cuando se comparó el perfil fenotípico de las CPs clonales de EMR con las CPs clonales al diagnóstico de forma pareada, se observó un incremento progresivo en la expresión de CD81 a lo largo del tratamiento (porcentaje medio de CPs clonales positivas al diagnóstico, tras inducción, tras TASPE y tras consolidación de 14%, 15%, 22%, 28%, respectivamente; $P=0.002$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la intensidad de expresión de CD38 y CD138, ni en el porcentaje de expresión de CD19, CD27, CD45, CD56 o CD117 (**Figura 24**).

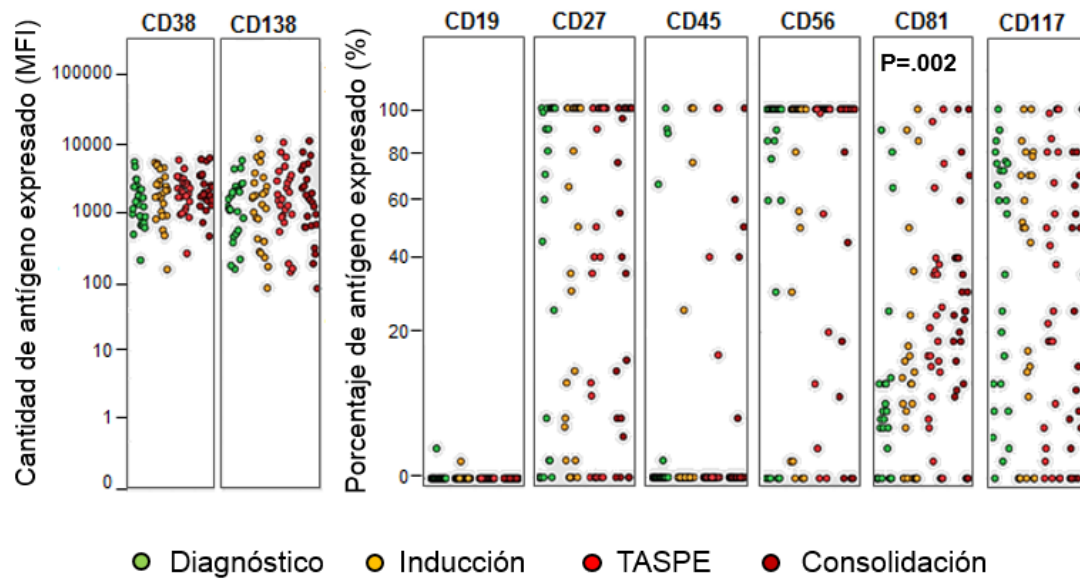


Figura 24. Análisis longitudinal de los perfiles fenotípicos de las células plasmáticas (CPs) clonales analizados al diagnóstico vs distintos momentos de monitorización de enfermedad mínima residual. La comparación de los perfiles fenotípicos se realizó en 25 pacientes incluidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2012MENOS65 y que tenían CPs clonales en todos los momentos de estudio (al diagnóstico, tras seis ciclos de inducción con bortezomib, lenalidomida y dexametasona (VRd), tras dosis altas de quimioterapia y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (TASPE), y tras dos ciclos de consolidación con VRd). La expresión del antígeno está representada como el porcentaje de CPs clonales que expresan el marcador, o como intensidad media de fluorescencia (MFI) en el caso de los marcadores con expresión unimodal (CD38 y CD138). Cada punto representa a un paciente.

Se observaron cambios en la expresión de un antígeno (definido como el paso desde una expresión negativa a una expresión positiva en al menos el 20% de las CPs clonales, o viceversa) en solamente 13 de las 75 muestras de EMR analizadas (17%). En la **Tabla 10** se muestran los casos de cambio de expresión antigénica observados en el global de las 75 muestras de EMR estudiadas. La mayoría de los cambios se produjeron en la expresión de CD81, y, por el contrario, no se observó ningún cambio de expresión en el caso de CD19, CD45 y CD56.

Tabla 10. Cambios de expresión antigénica observados en 25 pacientes incluidos en el ensayo clínico GEM2012MENOS65, desde el diagnóstico hasta los distintos momentos de evaluación de EMR (n=75).

Cambio de expresión del antígeno	CD27	CD81	CD117
Sin cambios	21/25 (84%)	18/25 (72%)	23/25 (92%)
De negativo a positivo	1/25 (4%)	7/25 (28%)	1/25 (4%)
De positivo a negativo	3/25 (12%)	0/25 (0%)	1/25 (4%)

No se observaron cambios en la expresión de CD19, CD45 y CD56.

Como ejemplo, en la **Figura 25** se muestra el caso de un paciente en el que se observó un cambio doble de expresión antigénica, concretamente en CD81 y CD117.

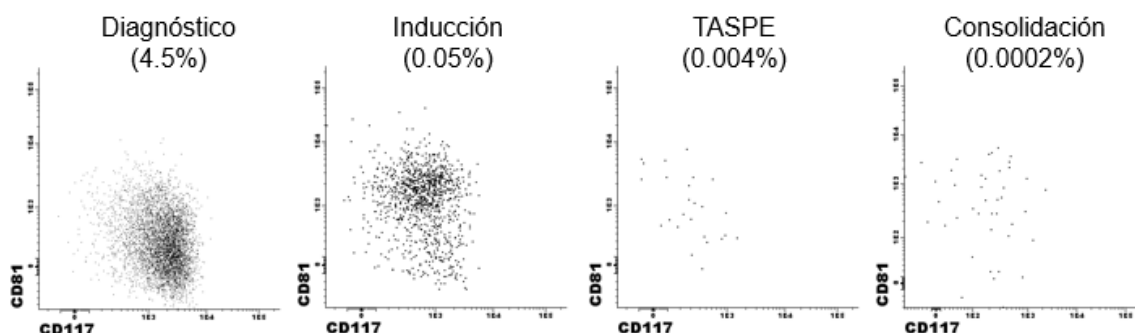
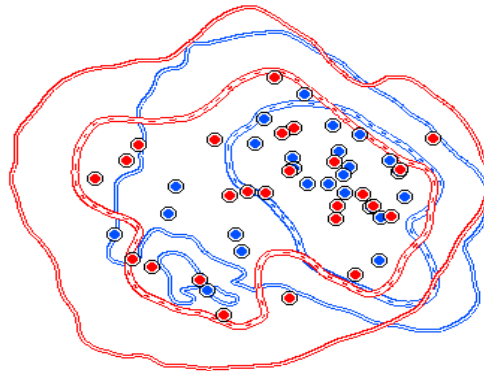


Figura 25. Diagramas de puntos de un caso representativo de cambios de expresión antigénica en las células plasmáticas (CPs) clonales desde el diagnóstico hasta las distintas etapas de monitorización de enfermedad mínima residual (EMR). En los diagramas aparecen representadas las CPs clonales en función de los niveles de expresión de CD81 y CD117, representados cada uno en un eje de los diagramas. El paciente sufre un doble cambio de expresión durante la monitorización de EMR, con ganancia de CD81 y pérdida simultánea de CD117.

Por lo tanto, estos resultados indican que de forma general el perfil fenotípico de las CPs clonales al diagnóstico se mantuvo estable en los diferentes momentos de evaluación de EMR. En consecuencia, el valor pronóstico del perfil fenotípico de las CPs resistentes tras el tratamiento puede ser inferido del que se ha establecido al diagnóstico (**Figura 26**).



APS 1

Figura 26. Perfiles de expresión antigénica de células plasmáticas (CPs) clonales al diagnóstico (color rojo) vs CPs clonales de enfermedad mínima residual (color azul) tras seis ciclos de inducción con bortezomib, lenalidomida y dexametasona (VRd) seguido de dosis altas de quimioterapia y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, y dos ciclos de consolidación con VRd (n=25). El perfil antigénico de cada paciente está representado mediante el diagrama de separador automatizado de poblaciones (APS1), basado en la representación gráfica del componente principal 1 (eje x) vs el componente principal 2 (eje y) de un total de 8 parámetros: CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117 y CD138.

4.3. Identificación de un perfil fenotípico con valor pronóstico al diagnóstico y durante la evaluación de EMR.

Tras observar el valor pronóstico de los marcadores utilizados para la detección de EMR, utilizamos el programa estadístico R para estudiar todas las posibles combinaciones de antígenos y, en base a su patrón de expresión, definir los perfiles fenotípicos con mayor impacto pronóstico. De esta forma, el perfil fenotípico definido por la expresión baja de CD38, junto con la reactividad para CD81 (al menos en el 25% de las CPs clonales), y en ausencia de expresión homogénea de CD117 (en menos del 50% de las CPs clonales), identificaba a un grupo de pacientes (n=100, 9%) que, comparado con el resto, tenían una SLP y SG significativamente inferiores (mediana de 22 vs 35 meses, $P < .001$; mediana de 43 vs 76 meses, $P < .001$) (**Figura 27**). Además, los pacientes con el perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ tenían una tasa de recaídas tempranas (en los 12 primeros meses) significativamente mayor (28% vs 17%; $P = .011$) que el resto de los pacientes.

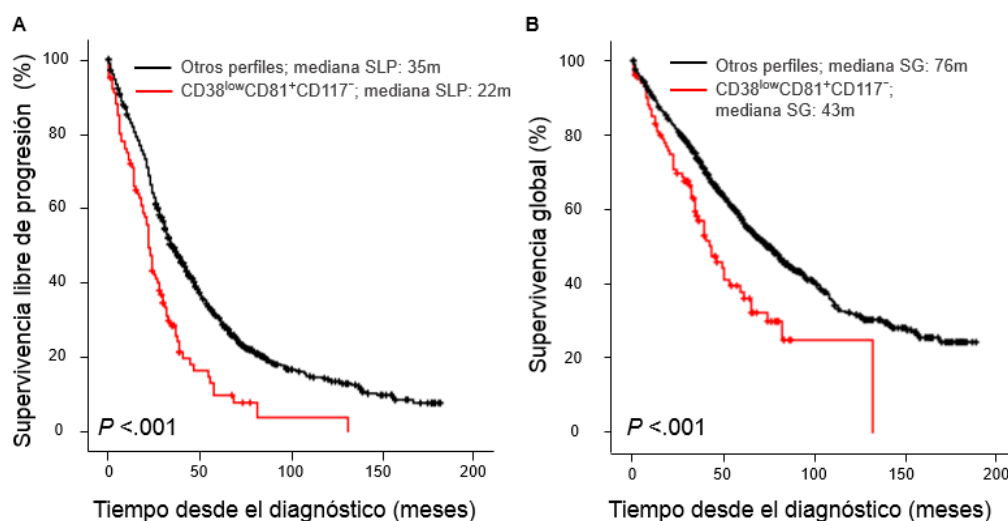


Figura 27. Supervivencia libre de progresión (SLP) (A) y supervivencia global (SG) (B) del total de los pacientes cuyas células plasmáticas clonales expresaban el perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ (n=100) vs los que expresaban otros perfiles (n=1049).

El análisis multivariante de los principales factores pronósticos para la supervivencia, que incluían el perfil fenotípico descrito, la elegibilidad de los pacientes para el trasplante, el riesgo según el ISS, los niveles de LDH, el perfil citogenético, y el estatus de EMR tras tratamiento, demostró que el perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ tenía valor pronóstico independiente, con efecto adverso en la SLP (cociente de riesgos instantáneos (HR): 1.69; P=.002), y también mostró una tendencia como factor adverso en la SG (HR: 1,46; P=.093) (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis multivariable del impacto pronóstico independiente de factores pronósticos en la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG).

	SLP		SG	
	HR	P	HR	P
No candidato vs candidato a trasplante	1.31	.019	1.79	<.001
ISS III vs. I/II	1.05	NS	1.29	NS
LDH sérica elevada vs normal	1.48	.028	1.93	.003
Citogenética de alto riesgo* vs riesgo estándar	1.50	.004	2.06	<.001
EMR post-tratamiento positiva vs negativa	2.13	<.001	2.08	<.001
Perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ vs otros	1.69	.002	1.46	.093

Abreviaturas: HR, hazard ratio; ISS, *International Staging System* (sistema internacional de estadiaje); LDH, lactato deshidrogenasa; NS, no significativo. *Citogenética de alto riesgo incluye t(4;14), t(14;16) y/o del(17p); citogenética estándar incluye el resto de los casos.

Cabe señalar que a pesar de que se hayan encontrado asociaciones significativas entre la expresión de determinados antígenos y la presencia de anomalías citogenéticas individuales (**Tabla 12**), la representación t-SNE del global de perfiles fenotípicos de las CPs clonales reveló que los pacientes con un perfil citogenético de alto riesgo (t(4;14), t(14;16) y/o del(17p)) no se agrupaban (**Figura 28**). Así mismo, los pacientes con el perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ no tenían una mayor frecuencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo comparado con el resto de los pacientes (20% vs 19%, P=.5).

Tabla 12. Asociación entre la expresión de cada antígeno y la presencia de anomalías citogenéticas.

	Expresión del antígeno	t(4;14)	Expresión del antígeno	t(11;14)	Expresión del antígeno	t(14;16)	Expresión del antígeno	del(13q)	Expresión del antígeno	del(17p)
CD45*	<20	15%								
	≥20	7.5%								
CD56*	<30	5%	<40	39%	<1	10%			<20	5%
	≥30	16%	≥40	10%	≥1	0.8%			≥20	10%
CD81*			<20	15%						
			≥20	25%						
CD117*			<15	20%						
			≥15	12%						
CD138#					<i>low</i>	16%				
					<i>bright</i>	2%				
*Pacientes clasificados en base a menor vs igual o mayor porcentaje de células plasmáticas que expresan el marcador.									<i>P</i> <.05	<i>P</i> <.001
# Pacientes clasificados en base a baja (<i>low</i>) o alta (<i>bright</i>) intensidad en la expresión del marcador.										

La significancia de la asociación entre los marcadores y las anomalías citogenéticas está representada mediante un código de colores basado en el valor P. Para cada antígeno aparece representado el porcentaje de expresión con el cual se conseguía la asociación con más significancia, y el porcentaje de pacientes con la anomalía citogenética. En el caso de CD138, los pacientes fueron clasificados (*low* o *bright*) en base a la interpretación visual de su intensidad media de fluorescencia (MFI) en las células plasmáticas clonales vs otras células nucleadas. No se observaron asociaciones significativas en los antígenos CD19, CD27 y CD38.

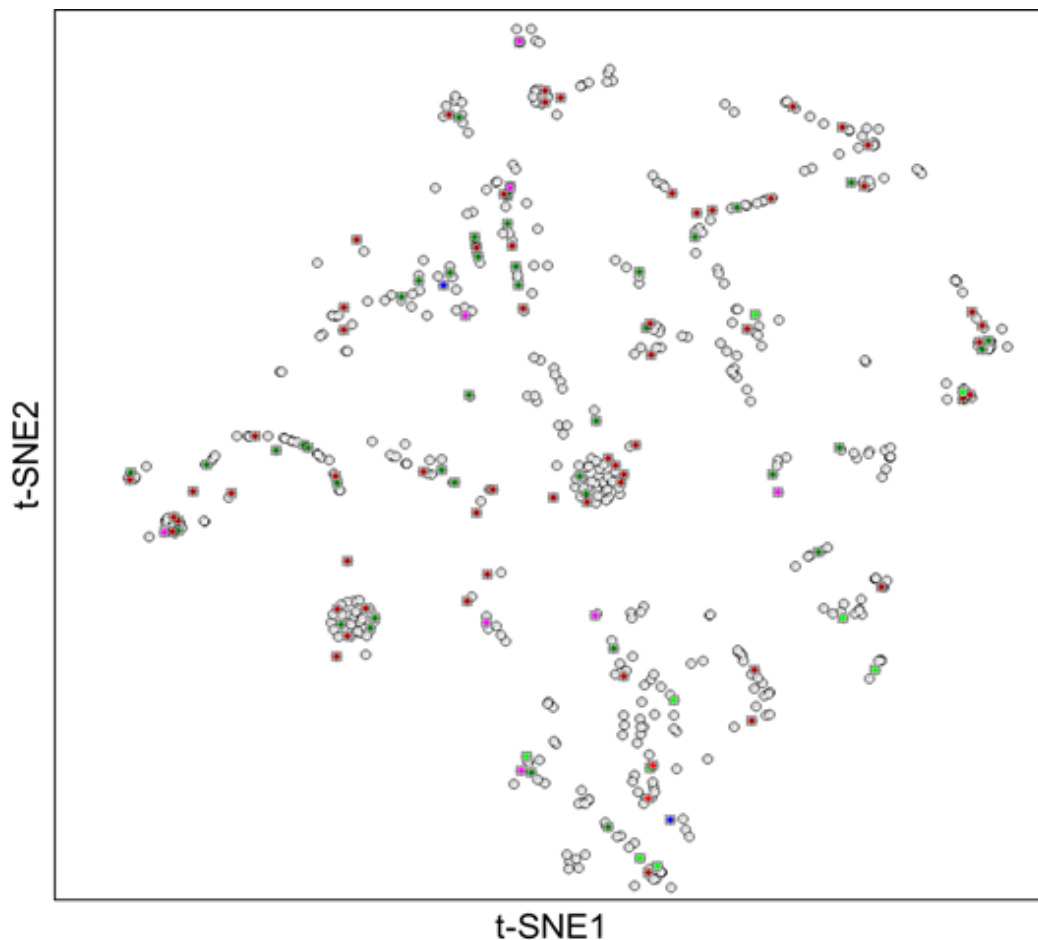


Figura 28. Correlación entre perfiles fenotípicos y citogenéticos. Proyección *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE, incrustación estocástica de vecinos con distribución t) de los perfiles fenotípicos de los pacientes, definidos por la expresión antigénica en las células plasmáticas clonales en el momento del diagnóstico ($n=672$). Los pacientes sin ninguna anomalía citogenética de alto riesgo [en esencia, $t(4;14)$, $t(14;16)$ y/o $del(17p)$] están representados con círculos de color gris ($n=544$), mientras que los pacientes con las anomalías $t(14;16)$ y $del(17p)$ ($n=2$), $t(4;14)$ y $del(17p)$ ($n=9$), $del(17p)$ ($n=44$), $t(4;14)$ y $t(14;16)$ ($n=2$), $t(14;16)$ ($n=9$), y $t(4;14)$ ($n=61$) están resaltadas como círculos de color azul, rosa, verde oscuro, verde claro y marrón, respectivamente.

Además, quisimos investigar si el perfil fenotípico adverso $CD38^{low} CD81^+ CD117^-$ tenía valor pronóstico en pacientes con EMR persistente al final del tratamiento ($n=396$). Así, comparado con el resto de los pacientes con EMR positiva, aquellos con el perfil fenotípico $CD38^{low} CD81^+ CD117^-$ ($n=45$, 11%) tenían una SLP significativamente inferior (mediana de 24 vs 36 meses, $P=.002$) y una tendencia hacia una menor SG (mediana de 53 vs 74 meses; $P=.058$) (**Figura 29**). Cabe señalar que los niveles de EMR no eran significativamente diferentes entre los pacientes con EMR positiva con el perfil fenotípico adverso y el resto de los pacientes con EMR positiva (mediana de 0,22% vs 0,11%, $P=.67$).

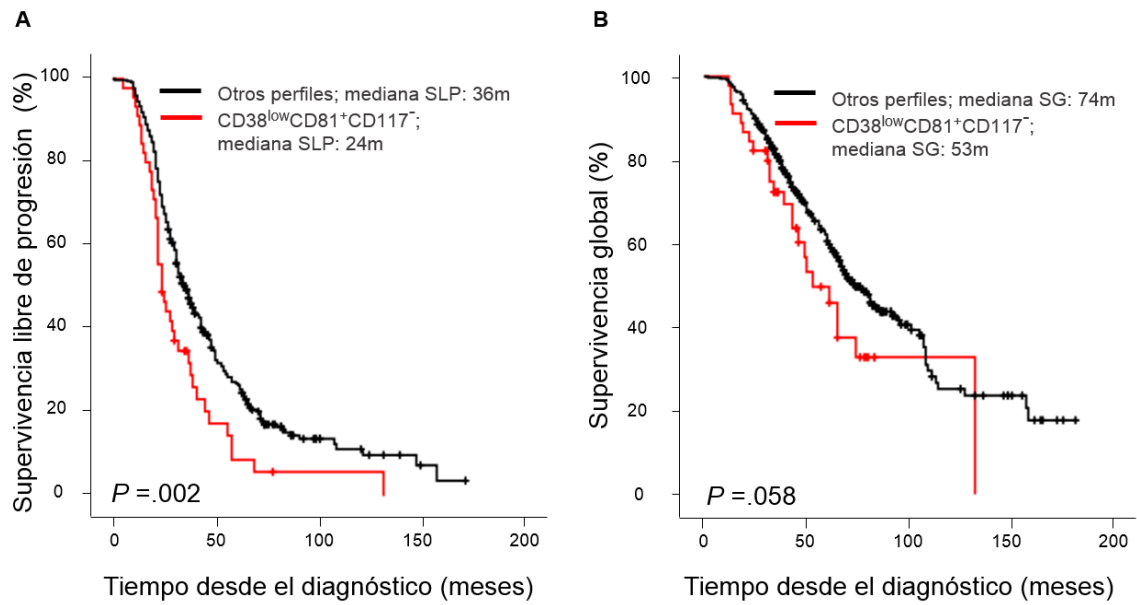


Figura 29. Supervivencia libre de progresión (SLP) **(A)** y supervivencia global (SG) **(B)** de los pacientes con enfermedad mínima residual positiva (n=396) cuyas células plasmáticas clonales expresaban el perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ (n=45) vs los que expresaban otros perfiles (n=351).

DISCUSIÓN

Vivimos en una época de notable progreso en el MM con la aprobación de nuevos fármacos como daratumumab, elotuzumab, pomalidomida, panabinostat o carfilzomib (Lokhorst et al., 2015; S Lonial et al., 2015; San-Miguel et al., 2014; J. San Miguel et al., 2013; Stewart et al., 2015) y un emergente conjunto de fármacos con nuevos mecanismos de acción que están demostrando ser de gran eficacia (Ocio et al., 2014), todo ello resultando en una prolongación muy significativa de la supervivencia y probablemente, en la posible curación de algunos pacientes (Bart Barlogie et al., 2014). La disponibilidad de nuevos fármacos con un buen equilibrio entre eficacia y toxicidad ha permitido el diseño de estrategias de tratamiento más complejas y largas (Palumbo et al., 2014; Palumbo, Gay, et al., 2015), pero también ha evidenciado la necesidad de poder disponer de nuevos subrogados de supervivencia para agilizar la aprobación de nuevos fármacos (Landgren et al., 2014). En este sentido, en los últimos años, la relevancia de la monitorización de EMR en MM ha aumentado significativamente, ya que ha pasado de ser un biomarcador utilizado para evaluar la contaminación tumoral en los productos de aféresis hasta convertirse en uno de los factores pronósticos más potentes para SLP y SG (Harousseau & Avet-Loiseau, 2017). Sin duda, en pacientes candidatos a trasplante el valor pronóstico de la monitorización de EMR ha sido demostrado de forma contundente en un amplio número de estudios (Hahn et al., 2019; J Martínez-Lopez et al., 2014; B Paiva et al., 2008; Bruno Paiva et al., 2012; Perrot et al., 2018; Puig et al., 2014; Andy C. Rawstron et al., 2013; Roussel et al., 2014). Por otra parte, los estudios realizados en pacientes no candidatos a trasplante han sido menos numerosos. Así, en el momento en el que comenzamos nuestro proyecto de investigación, el valor pronóstico de la evaluación de EMR en pacientes mayores no candidatos a trasplante tan sólo se había estudiado en dos ensayos clínicos: el PETHEMA/GEM2005MAS65 (M. V Mateos et al., 2010) y el MRC Myeloma IX (Morgan et al., 2011). Mientras que alcanzar EMR negativa se asociaba a una prolongación significativa del TTP y SG en el estudio PETHEMA/GEM2005MAS65 (J Martínez-Lopez et al., 2014; B Paiva et al., 2011; Puig et al., 2014), no se observaron diferencias significativas entre los pacientes con EMR positiva y negativa en el ensayo clínico MRC Myeloma IX (Andy C. Rawstron et al., 2013). Por lo tanto, la relevancia de la monitorización de EMR en pacientes no candidatos a trasplante era por aquellas fechas, incierta. Sin embargo, los pacientes mayores no candidatos a trasplante serán muy

probablemente aquellos donde es aún más importante balancear eficacia y toxicidad, y la monitorización de EMR podría ser útil para individualizar el tratamiento. Esta situación nos animó a investigar el valor pronóstico del estudio de EMR en pacientes con MM mayores de 65 años incluidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65.

Por otra parte, y en respuesta a la mayor eficacia del tratamiento del MM, también surgió la necesidad de desarrollar técnicas de detección de EMR cada vez más sensibles. En este sentido, la CFM ha evolucionado considerablemente en los últimos años, desde aquella de 4 colores (primera generación) hasta la más reciente y ultra-sensible NGF, pasando por la CFM de 8 colores de segunda generación. Sin embargo, aunque se presuponía una mejoría en la sensibilidad con la CFM de segunda generación comparado con la de primera generación, aún no se había determinado el grado de mejora ni el significado clínico de esa evolución, lo cual nos motivó a investigar sobre ello en esta tesis doctoral. Cabe señalar que en inúmeros laboratorios aún no ha sido posible la implementación de la NGF, y en consecuencia siguen utilizando protocolos de CMF de segunda generación (Korde et al., 2015; Oliva et al., 2017).

El incremento de sensibilidad de las técnicas de detección de EMR supuso que el número de casos con EMR positiva se mantuvo relativamente estable pese a la mayor eficacia de los tratamientos actuales. Un estudio reciente en el que utilizaron NGF observaron que más de la mitad de los pacientes con una mediana de 5 años en RC tenían EMR positiva (Terpos et al., 2019). Además, si de modo generalizado los pacientes con EMR negativa alcanzan una mayor supervivencia (J Martínez-Lopez et al., 2014; B Paiva et al., 2008, 2011; Puig et al., 2014), también entre los pacientes con EMR positiva se han observado pequeños subgrupos con pronóstico favorable (Bart Barlogie et al., 2014; Joaquin Martínez-Lopez et al., 2011). Con estas premisas, creemos que es importante encontrar nuevas herramientas para la estratificación de los pacientes con EMR positiva, que sirvan para diferenciar aquellos con mayor riesgo de recaída de otros que puedan experimentar una mayor supervivencia pese a la persistencia de EMR. Además, sería deseable que la información necesaria para esa estratificación proviniera de los mismos estudios de EMR, sin la necesidad de incrementar costes o la cantidad de recursos utilizados.

A continuación, discutimos a cerca de los puntos más importantes de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

1. Incremento en sensibilidad y especificidad en la detección de EMR con la transición de CFM de primera a segunda generación

La mayoría de los estudios de EMR mediante CFM se han realizado con técnicas “de primera generación”, basadas en combinaciones de 4 o 6 colores con un límite de detección de 10^{-4} (Bruno Paiva et al., 2015), o más recientemente con NGF (Facon, Lee, et al., 2019; Flores-Montero et al., 2017; Bruno Paiva et al., 2019; Sanoja-Flores et al., 2019). Durante esa transición, una CFM más sofisticada “de segunda generación” se ha ido incorporando progresivamente para el análisis de EMR en MM (Korde et al., 2015; Roussel et al., 2014), la cual se asume que tenga mayor sensibilidad y especificidad en la detección de EMR, pero su alcance nunca ha sido estudiado con anterioridad. Con estos precedentes, en esta tesis doctoral quisimos evaluar el incremento en sensibilidad y especificidad que supuso la incorporación de la CFM de segunda generación para evaluar EMR en MM. Los resultados presentados, obtenidos con un protocolo desarrollado por el consorcio EuroFlow (Kalina et al., 2012; van Dongen et al., 2012), muestran que la transición desde una CFM de 4 colores a una CFM de 8 colores, que analiza una cantidad 10 veces mayor de células, resulta en una especificidad y sensibilidad significativamente mayores. Concretamente, observamos que al aplicar el límite de detección alcanzado en la CFM de primera generación (en definitiva, 10^{-4}), más del 30% de los pacientes con EMR positiva detectable mediante CFM de segunda generación eran clasificados erróneamente como EMR negativa, debido a la desaparición total o la presencia de un número insuficiente de eventos como para poder identificar el *cluster* de CPs clonales. Además, la CFM de segunda generación tenía mayor precisión (96%) en la identificación de CPs patológicas frente a la CFM de primera generación (84%).

2. Significado clínico de la EMR negativa mediante CFM de segunda generación

De forma paralela a la mayor eficacia de los nuevos fármacos para el tratamiento del MM, los métodos moleculares e inmunofenotípicos de detección de EMR han sido reemplazados por técnicas más sensibles de nueva generación. En consecuencia, el IMWG ha

definido nuevos criterios de respuesta: “EMR negativa por NGF” o “EMR negativa por NGS” (S. Kumar et al., 2016). Ciertamente, a lo largo de la década anterior distintos grupos han demostrado el valor añadido de la evaluación de EMR sobre los criterios de respuesta convencional en pacientes con MM candidatos a trasplante (J Martínez-Lopez et al., 2014; B Paiva et al., 2008; Bruno Paiva et al., 2012, 2015; Puig et al., 2014; Andy C. Rawstron et al., 2013; Roussel et al., 2014). Por otra parte, en los últimos años se ha observado que la negativización de la EMR también es posible en pacientes con MM mayores no candidatos trasplante, debido, principalmente, a la introducción de estrategias terapéuticas más eficaces (Dytfeld et al., 2014; Korde et al., 2015; J Martínez-Lopez et al., 2014; B Paiva et al., 2011; Puig et al., 2014; Andy C. Rawstron et al., 2013). Sin embargo, el significado clínico de los estudios de EMR en pacientes no candidatos a trasplante seguía sin definirse, debido a que su valor pronóstico se había investigado de forma esporádica y con CMF de primera generación (B Paiva et al., 2011; Andy C. Rawstron et al., 2013). Por este motivo, en esta tesis doctoral quisimos estudiar el valor pronóstico de la negativización de la EMR en esta población, para lo cual estudiamos pacientes no candidatos a trasplante incluidos en el ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS65, en el que la EMR se evaluó mediante CFM de segunda generación. En esta tesis doctoral hemos demostrado que la evaluación de EMR con CFM de segunda generación es clínicamente relevante, ya que la detección de EMR con una sensibilidad mayor que 10^{-4} permite identificar un grupo de pacientes, aquellos con EMR positiva en niveles entre 10^{-4} y 10^{-5} , con menor supervivencia que los pacientes con EMR negativa o inferior a 10^{-5} , y similar a la de los pacientes con EMR positiva igual o superior a 10^{-4} . Nuestros resultados van en consonancia con los publicados por Korde y col. (Korde et al., 2015), los cuales observaron que el valor pronóstico de la monitorización de EMR mediante CFM de 8 colores era comparable al de la NGS (una recaída entre los pacientes con EMR negativa mediante CFM vs ninguna recaída entre los pacientes con EMR negativa mediante NGS). Ese estudio también señalaba que la primera mostraba una aplicabilidad mayor que la segunda (98% vs 80% para CFM vs NGS, respectivamente) (Korde et al., 2015). Por último, de forma similar a lo que previamente se había descrito en pacientes candidatos a trasplante (B Paiva et al., 2008, 2015), la monitorización de EMR destacó como el factor pronóstico más relevante en pacientes con MM mayores no candidatos a trasplante. Sin duda, la incorporación

de la NGF, capaz de alcanzar una sensibilidad de 10^{-6} (Flores-Montero et al., 2017) y potencialmente estandarizable, conllevará una monitorización de EMR y una capacidad pronóstica aún más poderosos, como ya lo están demostrado los primeros resultados publicados (Facon, Lee, et al., 2019; Flores-Montero et al., 2017; Bruno Paiva et al., 2019; Terpos et al., 2019). Lo mismo se ha observado recientemente en relación a la evaluación de EMR mediante NGS en los ensayos clínicos ALCYONE y MAIA que habían incluido pacientes no candidatos a trasplante (Facon, Kumar, et al., 2019; M. V. Mateos et al., 2018). Así, ante la demostración inequívoca del valor pronóstico de la EMR en ensayos clínicos, la expectativa actual es poder incorporar la monitorización de EMR a la práctica clínica como una herramienta de apoyo en la toma de decisiones terapéuticas. Así mismo, se ha publicado recientemente un estudio del grupo de De La Puerta et al. (De La Puerta Rueda et al., 2019) con resultados prometedores, que demostraban que, en comparación con los procedimientos terapéuticos estándar, el tratamiento ajustado para lograr EMR negativa mantenida reduce considerablemente el riesgo de progresión o de fallecimiento sin aumentar la frecuencia de efectos adversos graves.

Por otra parte, también observamos que la monitorización de EMR con mayor sensibilidad tras los primeros 9 ciclos de tratamiento posibilitaba la discriminación entre grupos de pacientes con pronóstico significativamente distinto. De hecho, sólo el 16% de los pacientes con EMR negativa tras el ciclo 9 progresaron, mientras que más de la mitad (54%) de los pacientes con EMR positiva recayeron a pesar de que iban a recibir otros 9 ciclos de tratamiento. Es más, no se observaron diferencias en el pronóstico entre los pacientes con EMR positiva y en RC comparado con los que su respuesta fue menor que RC, lo que sugiere que los criterios de respuesta del momento, antes de la actualización de 2016 de la IMWG, no permitían identificar pacientes con una RC de alta calidad (en definitiva, asociada a una EMR negativa). Cabe señalar que si en estudios previos la EMR se estudiaba en etapas intermedias del tratamiento (por ejemplo, antes del mantenimiento) (B Paiva et al., 2011), el diseño del ensayo clínico PETHEMA/GEM2010MAS6 ha permitido estudiar el impacto directo de la EMR en el pronóstico de los pacientes en ausencia de tratamiento adicional (en definitiva, de mantenimiento). De esta manera, en este estudio mostramos que la EMR positiva al ciclo 18 y sin terapia adicional, se correlacionaba con un TTP de aproximadamente un año y medio, sin

que hubiera diferencias significativas en función de la profundidad de la respuesta serológica alcanzada (esto es, RC vs menor que RC). El significado clínico de estos resultados es doble. En primer lugar, dado el mal pronóstico que en general tienen, concluimos que los pacientes con EMR positiva deberían ser considerados candidatos a recibir tratamiento con nuevos fármacos con mecanismos de acción alternativos (por ejemplo, AcMo) (Lokhorst et al., 2015; S Lonial et al., 2015), con el objetivo de eliminar las CPs clonales resistentes. En segundo lugar, parece evidente que la redefinición de RC introducida por el IMWG beneficiará de modo particular a los pacientes mayores (B Paiva et al., 2015). Además, creemos que la monitorización secuencial sería particularmente útil para identificar pacientes con EMR negativa mantenida, ya que observamos que los pacientes con mejor pronóstico fueron los 18 casos con EMR negativa en los ciclos 9 y 18; en concreto, 15 pacientes (83%) no habían progresado y 17 (94%) estaban vivos, a pesar de no recibir terapia de mantenimiento.

Debido a su mal pronóstico y a la necesidad todavía no cubierta de nuevos fármacos, los pacientes con citogenética de alto riesgo son candidatos ideales para investigar el papel de la EMR como subrogado de supervivencia. En este estudio, hemos mostrado que los pacientes con alteraciones citogenéticas de alto riesgo que alcanzaban EMR negativa experimentaban un TTP similar a la de los pacientes con EMR negativa y citogenética estándar. Por el contrario, los pacientes con citogenética estándar, pero con EMR positiva experimentaban un TTP moderado, pero significativamente superior ($P=.02$) comparado con los pacientes con EMR positiva con citogenética de alto riesgo. Estos resultados subrayan el valor independiente y complementario que tienen la citogenética y la EMR en la estratificación pronóstica de los pacientes, sobre todo, de aquellos con EMR positiva.

3. Relevancia de alcanzar EMR negativa en pacientes de edad avanzada

Otro hallazgo de interés en esta tesis doctoral fue observar que, de forma similar a los pacientes candidatos a trasplante, la evaluación de EMR también es informativa en pacientes con MM mayores de 65 años, ya que aquellos con EMR negativa tuvieron un TTP significativamente más prolongado comparado con los pacientes con EMR positiva ($P<.001$). Estos resultados van en consonancia con los resultados previos del ensayo clínico PETHEMA/GEM2005MAS65, en el que los pacientes no candidatos a trasplante que

alcanzaron EMR negativa tuvieron un TTP y SG significativamente superiores (J Martínez-Lopez et al., 2014; B Paiva et al., 2011; Puig et al., 2014) (M. V Mateos et al., 2014), y también están en línea con los resultados de los ensayos clínicos ALCYONE y MAIA, publicados más recientemente (Facon, Kumar, et al., 2019; M. V. Mateos et al., 2018). Cabe señalar que la proporción de pacientes que alcanzaron EMR negativa fue significativamente mayor en la rama de tratamiento que incluía daratumumab, y que estos pacientes tuvieron una SLP significativamente mayor que la de los pacientes de la rama de tratamiento control, en los que el porcentaje de casos con EMR negativa era significativamente menor (Facon, Kumar, et al., 2019; M. V. Mateos et al., 2018).

De un modo global, estos resultados nos llevan a plantear que la EMR negativa podría ser considerada como un objetivo terapéutico en pacientes mayores, siempre y cuando se garantice la tolerabilidad de las estrategias de tratamiento planteadas. Por otro lado, los pacientes con MM de riesgo estándar y los que alcancen RC con EMR positiva experimentan peores resultados, lo que justificaría individualizar su tratamiento con el fin de mejorar su supervivencia.

La disponibilidad de terapias más eficaces para pacientes de edad avanzada acentúa la necesidad de evaluar si una estrategia de tratamiento basada en la respuesta (en esencia, basada en la EMR) podría reducir las diferencias en supervivencia entre los pacientes candidatos a trasplante y los mayores, o incluso entre los pacientes de alto y bajo riesgo citogenético. Este tema de investigación requiere un esfuerzo cooperativo tal como el diseño de nuevos ensayos clínicos en los que los pacientes se estratifiquen en base a una evaluación sensible de EMR previa al tratamiento con estrategias alternativas, o incluso a la aleatorización entre tratamiento continuado *versus* de duración fija, en función de los niveles de EMR. Es necesario realizar estos ensayos clínicos para establecer el papel exacto de la EMR en pacientes con MM de edad avanzada.

4. Valor pronóstico del perfil inmune durante la monitorización de EMR

Hace pocos años, Barlogie et al. (Bart Barlogie et al., 2014) demostraron que la gran mayoría de los pacientes en RC que alcanzaban largos tiempos de supervivencia llegando

hasta los 10 años libres de recaídas, tenían EMR negativa. Sin embargo, también se observó que alcanzar una respuesta profunda no era un prerrequisito para lograr largos periodos de control de la enfermedad ya que un pequeño grupo de pacientes con EMR positiva (e incluso sin haber alcanzado RC) también lo lograba (Bart Barlogie et al., 2014; Joaquin Martinez-Lopez et al., 2011).

Como se ha mencionado previamente, el análisis de EMR mediante CFM de segunda generación permite evaluar de forma simultánea la reconstitución del sistema inmune en la MO tras tratamiento (Pessoa de Magalhaes et al., 2013), y con esta premisa, en esta tesis doctoral quisimos evaluar el posible valor pronóstico del perfil inmune evaluado de modo simultáneo a la monitorización de EMR. De esta forma, hemos demostrado por primera vez que el perfil inmune tras tratamiento aportaba información pronóstica adicional al permitir la identificación de un grupo de pacientes que, a pesar de tener EMR positiva, experimentaban una supervivencia prolongada debido a un perfil inmune singular caracterizado por una regeneración más prominente de linfocitos B maduros y un menor número de eritroblastos. Hasta la fecha, se han publicado los resultados de varios estudios sobre el valor pronóstico del sistema inmune en pacientes con MM, los cuales están en sintonía con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. En un estudio previo se ha descrito un perfil inmune similar en pacientes con EMR negativa y positiva que lograban el control de la enfermedad a largo plazo (Pessoa de Magalhaes et al., 2013). En un estudio posterior, se observó que entre los pacientes con EMR positiva, aquellos con mayor abundancia de linfocitos B totales, vírgenes y de memoria antes del TASPE presentaban una SLP y SG superior, lo que sugiere que la monitorización del perfil inmune, en conjunto con la detección de EMR, podría aportar mayor información pronóstica (Ho et al., 2017). En una publicación más reciente se demuestra que la monitorización de EMR mediante NGF permite identificar un grupo de pacientes, caracterizado por un mayor número de eritroblastos, con mayor riesgo de positivizar los niveles de EMR al final del tratamiento (Terpos et al., 2019). Cabe esperar que esta forma más pormenorizada de evaluación de la respuesta al tratamiento gane mayor preponderancia a medida que nuevas inmunoterapias se vayan incorporando al tratamiento del MM.

5. Valor pronóstico del fenotipo de las CPs clonales en la era de los nuevos fármacos

Recientemente se ha demostrado que, a pesar de la utilización de combinaciones de fármacos altamente eficaces, la evaluación de EMR mediante técnicas de nueva generación revela que al menos un 50% de los pacientes sigue teniendo EMR positiva tras tratamiento (H Avet-Loiseau et al., 2015; Flores-Montero et al., 2017). Además, mientras que con las terapias convencionales el pronóstico de los pacientes con EMR positiva ha sido tradicionalmente adverso (Attal et al., 2017; Ruth M. De Tute et al., 2016; J.-J. Lahuerta et al., 2017), estudios más recientes, particularmente aquellos que incluyeron daratumumab, revelaron que el pronóstico de algunos pacientes con EMR positiva puede no ser tan desfavorable (Meletios A. Dimopoulos et al., 2018; Facon, Kumar, et al., 2019; M. V. Mateos et al., 2018; Spencer et al., 2018). Ante la evidencia de que las terapias basadas en el uso de AcMo se convierten en un pilar importante en el tratamiento del MM, cobra importancia encontrar marcadores capaces de discriminar, entre pacientes con EMR positiva, aquellos que alcancen largos periodos de supervivencia de aquellos que estén en riesgo de progresión a corto plazo.

El análisis de EMR mediante CFM ofrece información adicional además de la identificación y cuantificación de las CPs clonales residuales, como por ejemplo su perfil fenotípico. En este sentido, varios grupos de investigación han publicado resultados que demuestran el valor pronóstico de distintos marcadores utilizados para la identificación de las CPs aberrantes en MM (W I Gonsalves et al., 2016; J. Guo et al., 2016; Mateo et al., 2008; P Moreau et al., 2004, 2006; B Paiva et al., 2012; Pan et al., 2016).

Con estos precedentes, investigamos el valor pronóstico de los marcadores utilizados para detectar EMR mediante CFM, para lo cual estudiamos una de las series más grandes de pacientes con MM de nuevo diagnóstico, incluidos en cuatro ensayos clínicos consecutivos de PETHEMA/GEM. Una limitación de este estudio ha sido el uso de distintos conjugados de AcMo entre los ensayos clínicos más antiguos y los más recientes. Sin embargo, cabe señalar que el porcentaje de expresión o MFI de los marcadores evaluados en las CPs clonales fue comparado con otras células nucleadas presentes en esa muestra, y no de forma longitudinal entre los cuatro ensayos clínicos. Dado que la evaluación del porcentaje o intensidad de expresión de cada marcador estaba de esta manera basada en los controles internos de cada

muestra (en esencia, otras células nucleadas de la MO), los datos de los distintos ensayos clínicos se pudieron agrupar con el fin de realizar un análisis robusto sobre el valor pronóstico de la expresión de los antígenos.

De esta forma, por una parte, observamos que la expresión aberrante de CD117 se asociaba a un mejor pronóstico, reproduciendo así resultados anteriores del grupo (Mateo et al., 2008). Además, en este trabajo aprovechamos la circunstancia de que los pacientes fueron tratados con cuatro protocolos terapéuticos distintos, y estudiamos el valor pronóstico de los marcadores en función del esquema terapéutico que recibieron los pacientes. Así, observamos que la expresión de CD117 perdía su valor pronóstico tras la introducción de IPs e IMiDs. Estos hallazgos podrían tener relación con la habilidad de estos fármacos de alterar el microambiente tumoral, ya que previamente a este estudio se ha sugerido que el pronóstico favorable de los pacientes con expresión de CD117 podría ser debido a un proceso de migración alterado de las CPs clonales en MO, dirigiéndolas hacia los nichos de los precursores de neutrófilos y preservando el nicho correspondiente a las CPs normales residuales (M Schmidt-Hieber et al., 2011).

Más recientemente demostramos que los pacientes con MM cuyas CPs tenían una menor diferenciación, definida en parte por la expresión de CD81, tenían peor pronóstico, lo cual podría estar relacionado con la mayor capacidad de resistencia de los clones más inmaduros de CPs (B Paiva et al., 2017). En este estudio confirmamos las observaciones previas sobre el valor pronóstico de CD81 en MM (B Paiva et al., 2012, 2017), y observamos que, de forma similar a lo que se ha descrito para pacientes no candidatos a trasplante (B Paiva et al., 2017), había un enriquecimiento en subclones de CPs menos diferenciados (CD81⁺) tras terapia intensiva.

Por otro lado, el perfil fenotípico de las células de EMR podría contribuir a la optimización del uso de inmunoterapias específicas contra antígenos de superficie en las mismas. En este estudio, coincidimos con resultados previos (Martin Perez-Andres et al., 2009) que indicaban que los pacientes con MM con CD38^{low} y CD138^{low} tenían una SLP y SG significativamente inferior comparado con pacientes con una expresión normal de ambos marcadores (en definitiva, intensa). CD38 es una glicoproteína multifuncional que sirve como

receptor para la transducción de señales de activación y proliferación, así como de ectoenzima que cataliza la producción de nucleótidos necesarios para la señalización mediada por calcio (Malavasi et al., 2008). Sin embargo, dado el fenotipo diferenciado, estado quiescente y larga supervivencia de las CPs CD38^{bright} comparado con el de los plasmablastos CD38^{low}, cabe la posibilidad de que más que participar en la señalización, CD38 actúa como una molécula de migración y adhesión entre las CPs y el estroma medular (S Deaglio et al., 1998; Silvia Deaglio et al., 2008). En ese sentido, las CPs tumorales circulantes expresan niveles más bajos de CD38 y CD138 en superficie comparado con las CPs tumorales que permanecen en MO (Chaidos et al., 2013; B Paiva, Paino, et al., 2013).

Utilizando nuevas aproximaciones estadísticas, descubrimos que el perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ era el que con mayor eficacia identificaba pacientes con peor pronóstico, y que permitía discriminar entre los pacientes con EMR positiva, aquellos con mayor o menor SLP y SG. Además, mediante t-SNE no encontramos una correlación inequívoca entre la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo y este perfil fenotípico, por lo que podría aportar información complementaria a la citogenética para estratificar el riesgo de los pacientes con EMR positiva.

En conclusión, en esta tesis doctoral mostramos cómo, de forma simultánea a la monitorización de la EMR, la CFM también puede aportar información adicional con valor pronóstico basada en el perfil fenotípico de las CPs clonales quimioresistentes. Ciertamente, hemos mostrado cómo la mayoría de los marcadores utilizados para la monitorización de EMR en MM tienen valor pronóstico; sin embargo, creemos que la intensificación de los protocolos de tratamiento y el uso de nuevos fármacos cada vez más eficaces, podrían modular el valor pronóstico de los antígenos y por tanto obligará a una revisión periódica de los mismos.

En este estudio también hemos aportado información novedosa y práctica para aquellos especialistas que utilicen NGF para monitorizar EMR en MM. Hemos demostrado por primera vez que los cambios en la expresión antigénica durante las distintas etapas del tratamiento ocurren en un pequeño porcentaje de los casos (17%), y que la mayoría de los cambios ocurren en la expresión de CD81 (7 de los 13 casos con cambios de expresión). Por lo tanto, mientras que la información del fenotipo de las CPs clonales al diagnóstico puede ser

útil para monitorizar la EMR, debe de tenerse en consideración que un grupo reducido de pacientes presentan inestabilidad antigénica desde el diagnóstico hasta las etapas de evaluación de EMR. En el caso de las leucemias agudas mieloides es bien sabido que el inmunofenotipo de las células leucémicas puede cambiar entre el diagnóstico y la recaída debido a la selección y evolución del clon, lo cual tiene consecuencias importantes para la detección de EMR debido a posibles falsos negativos tras la desaparición de los fenotipos aberrantes usados como marcadores de EMR (Zeijlemaker et al., 2013). No obstante, los cambios de expresión en un único antígeno no afectan a la detección de EMR en MM, la cual se basa en el estudio de múltiples aberraciones fenotípicas que son detectadas simultáneamente utilizando una combinación de AcMo óptima y mediante un análisis multidimensional (≥ 8 colores), hoy por hoy automatizado (Flores-Montero et al., 2017). Además, con NGF es posible detectar CPs clonales con mayor precisión ya que el panel de dos tubos de AcMo desarrollado para el análisis de CPs permite confirmar la naturaleza clonal de las CPs fenotípicamente aberrantes, por medio del estudio de restricción en la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulinas κ y λ citoplasmáticas (Flores-Montero et al., 2017). De esta forma, tal y como hemos mostrado en esta tesis doctoral, la capacidad de detectar EMR mediante CFM de 8 colores es comparable en pacientes con o sin estabilidad antigénica desde el diagnóstico hasta los distintos momentos de evaluación de EMR.

6. Nuevos algoritmos para la estratificación de pacientes con EMR positiva

La sensibilidad de la CFM para detectar EMR ha aumentado desde un límite de detección de 10^{-4} con técnicas convencionales hasta 10^{-6} con NGF (Facon, Lee, et al., 2019; Flores-Montero et al., 2017; Hahn et al., 2019; Oliva et al., 2017; Bruno Paiva et al., 2019; Sanoja-Flores et al., 2019; Terpos et al., 2019). Lo mismo se ha descrito en relación a la NGS frente a los métodos moleculares usados anteriormente (Facon, Kumar, et al., 2019; Korde et al., 2015; Mailankody et al., 2015; J Martinez-Lopez et al., 2014; M. V. Mateos et al., 2018; Perrot et al., 2018; Takamatsu et al., 2017). En consecuencia, el número de pacientes clasificados como EMR positiva no ha disminuido pese a la mayor eficacia de los nuevos tratamientos. En los ensayos clínicos CASTOR y POLLUX (Bahlis et al., 2020; Meletios A. Dimopoulos et al., 2018; Maria-Victoria Mateos et al., 2019; Spencer et al., 2018) se observó

que pacientes con EMR positiva tenían un pronóstico notablemente distinto en función del esquema de tratamiento recibido. Ciertamente, la SLP de los pacientes con EMR positiva tras recibir daratumumab en combinación con Rd (DRd) o daratumumab en combinación con bortezomib y dexametasona (DVd) era significativamente mayor comparado con pacientes con EMR positiva tratados con Rd o Vd. Por otra parte, debido a la mayor eficacia de las combinaciones de nuevos fármacos, existe el riesgo de que se considere de forma generalizada que la EMR positiva se equipare al fracaso del tratamiento, a pesar de que no todos los pacientes con EMR positiva tengan el mismo riesgo de progresión y algunos incluso alcancen tiempos de supervivencia largos (J.-J. Lahuerta et al., 2017). Con este escenario, nos planteamos que podría ser importante identificar biomarcadores con valor pronóstico capaces de identificar, entre los pacientes con EMR positiva, distintos grupos en función del riesgo de recaída y fallecimiento.

En esta tesis doctoral, hemos demostrado que la monitorización de EMR mediante CFM permite a la vez la caracterización fenotípica de las CPs clonales y del perfil inmune en MO, y que ambos aportan información que podría ser útil para la estratificación pronóstica de pacientes con EMR positiva. Por un lado, descubrimos que el perfil fenotípico caracterizado por la expresión simultánea de CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ tenía valor pronóstico independiente a la hora de identificar pacientes con peor pronóstico, y que también ofrecía información adicional útil para discriminar grupos de riesgo entre los pacientes con EMR positiva. Ciertamente, los pacientes con EMR positiva y con el perfil fenotípico CD38^{low} CD81⁺ CD117⁻ tenían un riesgo significativamente mayor de progresión o fallecimiento comparado con el resto de los pacientes en los que también persistía la EMR. Por otro lado, en cuanto al valor pronóstico de la reconstitución inmune tras tratamiento, observamos que los pacientes con un perfil inmune singular, caracterizado por una regeneración de linfocitos B maduros más prominente, experimentaban una supervivencia prolongada a pesar de tener EMR positiva.

CONCLUSIONES

1. La CFM de segunda generación aporta un aumento en la sensibilidad y especificidad en la detección de EMR en MM comparado con la CFM de primera generación.
2. La detección de EMR mediante CFM de segunda generación permite identificar un grupo de pacientes, aquellos con EMR positiva en niveles entre 10^{-4} y 10^{-5} , con menor supervivencia que los pacientes con EMR negativa, y similar a la de los pacientes con EMR positiva a un nivel igual o superior a 10^{-4} .
3. La EMR negativa tiene valor pronóstico en los pacientes con MM de edad avanzada. También los pacientes mayores de 75 años o aquellos con alteraciones citogenéticas adversas con EMR negativa con una sensibilidad de 10^{-5} , experimentan un aumento significativo en SLP y SG frente a los pacientes con EMR positiva.
4. La evaluación simultánea de EMR y del perfil inmune tras tratamiento puede permitir la identificación de un grupo de pacientes que, a pesar de tener EMR positiva, experimentan una supervivencia prolongada debido a un perfil inmune singular caracterizado por una regeneración más prominente de linfocitos B maduros y un menor número de eritroblastos.
5. La NGF ofrece información pronóstica adicional basada en el perfil fenotípico de las CPs clonales, ya que la mayoría de los marcadores utilizados para la detección de EMR con CFM de 8 colores tienen valor pronóstico en MM.
6. El perfil fenotípico caracterizado por la expresión débil de CD38, junto con la reactividad para CD81 y en ausencia de expresión homogénea de CD117, es el que con mayor significancia define a un grupo de pacientes con menor SLP y SG.
7. El perfil citogenético y el perfil fenotípico de las CPs clonales podrían ser herramientas complementarias para la estratificación pronóstica de los pacientes con EMR positiva.
8. A lo largo de los distintos momentos de evaluación de EMR, son pocos los cambios que se producen en la expresión antigénica de las CPs clonales. Además, la capacidad de detectarlas permanece invariable para los pacientes con cambios puntuales de expresión, utilizando los paneles de anticuerpos diseñados por el grupo EuroFlow para la detección de EMR mediante NGF.

9. CD81 fue el único antígeno que presentó un cambio significativo en su nivel de expresión en evaluaciones sucesivas de EMR. Este hallazgo sugiere que la presión ejercida por las distintas etapas del tratamiento produce una selección de CPs clonales quimioresistentes con un perfil fenotípico de mayor inmadurez (CD81⁺).

10. El perfil fenotípico de las CPs clonales y el perfil inmune tras tratamiento pueden ser útiles para identificar pacientes con EMR positiva y distinto pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

Agirre, X., Castellano, G., Pascual, M., Heath, S., Kulis, M., Segura, V., Bergmann, A., Esteve, A., Merkel, A., Raineri, E., Agueda, L., Blanc, J., Richardson, D., Clarke, L., Datta, A., Russiñol, N., Queirós, A. C., Beekman, R., Rodríguez-Madoz, J. R., ... Martín-Subero, J. I. (2015). Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Research*, 25(4), 478–487. <https://doi.org/10.1101/gr.180240.114>

Ali, S. A., Shi, V., Maric, I., Wang, M., Stroncek, D. F., Rose, J. J., Brudno, J. N., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S. A., Hansen, B. G., Fellowes, V. S., Hakim, F. T., Gress, R. E., & Kochenderfer, J. N. (2016). T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*, 128(13), 1688–1700. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-711903>

Almeida, J., Oreao, A., Ocqueteau, M., Mateo, G., Corral, M., Caballero, M. D., Blade, J., Moro, M. J., Hernandez, J., & San Miguel, J. F. (1999). High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 107(1), 121–131. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01685.x>

Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, E. B. (eds). (n.d.). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, . *National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, Based on November 2009 SEER Data Submission, Posted to the SEER Web Site, 2010.*

Alzrigat, M., Párraga, A. A., & Jernberg-Wiklund, H. (2018). Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 51, pp. 101–115). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.09.007>

Anderson, K. C., Bates, M. P., Slaughenhaupt, B. L., Pinkus, G. S., Schlossman, S. F., & Nadler, L. M. (1984). Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: A model of human B cell differentiation. *Blood*, 63(6), 1424–1433. <https://doi.org/10.1182/blood.v63.6.1424.bloodjournal6361424>

Anderson, Kenneth C. (2017). POINT Should minimal residual disease negativity be the end point of myeloma therapy? *Blood Advances*, 1(8), 517–521. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000117>

Antonio, J. D. S., Karnovsky, M. J., Gay, S., Sanderson, R. D., & Lander, A. D. (1994). Interactions of syndecan-1 and heparin with human collagens. *Glycobiology*, 4(3), 327–332. <https://doi.org/10.1093/glycob/4.3.327>

Attal, M., Harousseau, J.-L., Stoppa, A.-M., Sotto, J.-J., Fuzibet, J.-G., Rossi, J.-F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., Payen, C., & Bataille, R. (1996). A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 335(2), 91–97. <https://doi.org/10.1056/NEJM199607113350204>

Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Facon, T., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., MACRO, M., Belhadj, K., Garderet, L., Roussel, M., Mathiot, C., Avet-Loiseau, H., Munshi, N. C., Richardson, P. G., Anderson, K. C., Harousseau, Jean L., & Moreau, P. (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. <https://doi.org/10.1182/blood.v126.23.391.391>

Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., Roussel, M., Payen, C., Mathiot, C., Femand, J. P., Meuleman, N., Rollet, S., Maglio, M. E., Zeytoonjian, A. A., Weller, E. A., ... Moreau, P. (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma.

New England Journal of Medicine, 376(14), 1311–1320.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611750>

Attal, M., Lauwers-Cances, V., Marit, G., Caillot, D., Moreau, P., Facon, T., Stoppa, A. M., Hulin, C., Benboubker, L., Garderet, L., Decaux, O., Leyvraz, S., Vekemans, M.-C., Voillat, L., Michallet, M., Pegourie, B., Dumontet, C., Roussel, M., Leleu, X., ... Harousseau, J.-L. (2012). Lenalidomide Maintenance after Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 366(19), 1782–1791.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114138>

Avet-Loiseau, H., Corre, J., Lauwers-Cances, V., Chretien, M.-L., Robillard, N., Leleu, X., Hulin, C., Gentil, C., Arnulf, B., Belhadj, K., Brechignac, S., Garderet, L., Karlin, L., Marit, G., Benboubker, L., Orsini-Piocelle, F., Royer, B., Drenou, B., Tiab, M., ... N., M. (2015). Evaluation of Minimal Residual Disease (MRD) By Next Generation Sequencing (NGS) Is Highly Predictive of Progression Free Survival in the IFM/DFCI 2009 Trial. *Blood*, 126, 191.

Avet-Loiseau, Hervé, Bahlis, N. J., Chng, W. J., Masszi, T., Viterbo, L., Pour, L., Ganly, P., Palumbo, A., Cavo, M., Langer, C., Pluta, A., Nagler, A., Kumar, S., Ben-Yehuda, D., Rajkumar, S. V., San-Miguel, J., Berg, D., Lin, J., Van De Velde, H., ... Richardson, P. G. (2017). Ixazomib significantly prolongs progression-free survival in high-risk relapsed/refractory myeloma patients. *Blood*, 130(24), 2610–2618.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-791228>

Avet-Loiseau, Herve, Bene, M. C., Wuilleme, S., Corre, J., Attal, M., Arnulf, B., Garderet, L., Macro, M., Stoppa, A.-M., Delforge, M., Broijl, A., Zweegman, S., Jie, K.-S., Van de Donk, N., Pei, L., de Boer, C., Chiu, C., Vanquickenberghe, V., Kampfenkel, T., ... Sonneveld, P. (2019). Concordance of Post-consolidation Minimal Residual Disease Rates by Multiparametric Flow Cytometry and Next-generation Sequencing in CASSIOPEIA. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 19(10), e3–e4.
<https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.09.005>

Bahlis, N. J., Dimopoulos, M. A., White, D. J., Benboubker, L., Cook, G., Leiba, M., Ho, P. J., Kim, K., Takezako, N., Moreau, P., Kaufman, J. L., Krevvata, M., Chiu, C., Qin, X., Okonkwo, L., Trivedi, S., Ukropec, J., Qi, M., & San-Miguel, J. (2020). Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: extended follow-up of POLLUX, a randomized, open-label, phase 3 study. *Leukemia*.
<https://doi.org/10.1038/s41375-020-0711-6>

Bahlis, N. J., Sutherland, H., White, D., Sebag, M., Lentzsch, S., Kotb, R., Venner, C. P., Gasparetto, C., Col, A. Del, Neri, P., Reece, D., Kauffman, M., Shacham, S., Unger, T. J., Jeha, J., Saint-Martin, J. R., Shah, J., & Chen, C. (2018). Selinexor plus low-dose bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*, 132(24), 2546–2554. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-858852>

Bakkus, M. H., Bouko, Y., Samson, D., Apperley, J. F., Thielemans, K., Van Camp, B., Benner, A., Goldschmidt, H., Moos, M., & Cremer, F. W. (2004). Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 126(5), 665–674.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05120.x> [doi]

Barlogie, B., Anaissie, E., Haessler, J., van Rhee, F., Pineda-Roman, M., Hollmig, K., Alsayed, Y., Epstein, J., Shaughnessy Jr, J. D., & Crowley, J. (2008). Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma. *Cancer*, 113(2), 355–359. <https://doi.org/10.1002/cncr.23546> [doi]

Barlogie, Bart, Mitchell, A., Van Rhee, F., Epstein, J., Morgan, G. J., & Crowley, J. (2014). Curing myeloma at last: Defining criteria and providing the evidence. In *Blood* (Vol. 124, Issue 20, pp. 3043–3051). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-552059>

- Bartel, T. B., Haessler, J., Brown, T. L., Shaughnessy Jr, J. D., van Rhee, F., Anaissie, E., Alpe, T., Anagnostou, E., Walker, R., Epstein, J., Crowley, J., & Barlogie, B. (2009). F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood*, *114*(10), 2068–2076. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213280> [doi]
- Becker, N. (2011). Epidemiology of Multiple Myeloma. In *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* (Vol. 183, pp. 25–35). https://doi.org/10.1007/978-3-540-85772-3_2
- Benboubker, L., Dimopoulos, M. A., Dispenzieri, A., Catalano, J., Belch, A. R., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N., Banos, A., Tiab, M., Delforge, M., Cavenagh, J., Gheraldes, C., Lee, J.-J., Chen, C., Oriol, A., de la Rubia, J., ... FIRST Trial Team. (2014). Lenalidomide and Dexamethasone in Transplant-Ineligible Patients with Myeloma. *New England Journal of Medicine*, *371*(10), 906–917. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402551>
- Bergsagel, P. L., & Kuehl, W. M. (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, *20*(40), 5611–5622. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204641>
- Bladé, J., de Larrea, C. F., & Rosiñol, L. (2012). Extramedullary involvement in multiple myeloma. *Haematologica*, *97*(11), 1618–1619. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.078519>
- Blade, J., Fernandez de Larrea, C., Rosinol, L., Cibeira, M. T., Jimenez, R., & Powles, R. (2011). Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(28), 3805–3812. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.9290> [doi]
- Bladé, J., Samson, D., Reece, D., Apperley, J., Björkstrand, B., Gahrton, G., Gertz, M., Giral, S., Jagannath, S., Sundar, S., & Vesole, D. (1998). CRITERIA FOR EVALUATING DISEASE RESPONSE AND PROGRESSION IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA TREATED BY HIGH-DOSE THERAPY AND HAEMOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION. *British Journal of Haematology*, *102*(5), 1115–1123. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00930.x>
- Blum, A., Haussmann, K., Streitz, M., Schlickeiser, S., Tietze-Buerger, C., Blau, I. W., & Uharek, L. (2019). Standardized assay for assessment of minimal residual disease in blood, bone marrow and apheresis from patients with plasma cell myeloma. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39631-2>
- Bolli, N., Avet-Loiseau, H., Wedge, D. C., Van Loo, P., Alexandrov, L. B., Martincorena, I., Dawson, K. J., Iorio, F., Nik-Zainal, S., Bignell, G. R., Hinton, J. W., Li, Y., Tubio, J. M., McLaren, S., O'Meara, S., Butler, A. P., Teague, J. W., Mudie, L., Anderson, E., ... Munshi, N. C. (2014). Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications*, *5*, 2997. <https://doi.org/10.1038/ncomms3997> [doi]
- Braggio, E., Kortüm, K. M., & Stewart, A. K. (2015). SnapShot: Multiple Myeloma. In *Cancer Cell* (Vol. 28, Issue 5, pp. 678-678.e1). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.014>
- Brudno, J. N., Maric, I., Hartman, S. D., Rose, J. J., Wang, M., Lam, N., Stetler-Stevenson, M., Salem, D., Yuan, C., Pavletic, S., Kanakry, J. A., Ali, S. A., Mikkilineni, L., Feldman, S. A., Stroncek, D. F., Hansen, B. G., Lawrence, J., Patel, R., Hakim, F., ... Kochenderfer, J. N. (2018). T cells genetically modified to express an anti-B-Cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(22), 2267–2280. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8084>

- Carpenter, R. O., Evbuomwan, M. O., Pittaluga, S., Rose, J. J., Raffeld, M., Yang, S., Gress, R. E., Hakim, F. T., & Kochenderfer, J. N. (2013). B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2048–2060. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2422>
- Cavo, M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Pantani, L., Zweegman, S., Salwender, H. J., Lahuerta, J. J., Lokhorst, H. M., Petrucci, M. T., Blau, I., Oriol, A., Testoni, N., Weisel, K., Rios, R., Patriarca, F., Blanchard, J., Dozza, L., Mateos, M.-V., Galli, M., ... Sonneveld, P. (2018). Double Vs Single Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Long-Term Follow-up (10-Years) Analysis of Randomized Phase 3 Studies. *Blood*, 132(Supplement 1), 124–124. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112899>
- Cavo, M., Palumbo, A., Zweegman, S., Dimopoulos, M. A., Hajek, R., Pantani, L., Beksac, M., Wester, R., Johnsen, H. E., Mellqvist, U.-H., Petrucci, M. T., Driessen, C., Di Raimondo, F., Troia, R., Pezzi, A., van der Holt, B., Wu, K. L., Ludwig, H., Gay, F., & Sonneveld, P. (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). *Journal of Clinical Oncology*, 34(15_suppl), 8000–8000. https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.15_suppl.8000
- Chaidos, A., Barnes, C. P., Cowan, G., May, P. C., Melo, V., Hatjiharissi, E., Papaioannou, M., Harrington, H., Doolittle, H., Terpos, E., Dimopoulos, M., Abdalla, S., Yarranton, H., Naresh, K., Foroni, L., Reid, A., Rahemtulla, A., Stumpf, M., Roberts, I., & Karadimitris, A. (2013). Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma. *Blood*, 121(2), 318–328. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-436220>
- Child, J. A., Morgan, G. J., Davies, F. E., Owen, R. G., Bell, S. E., Hawkins, K., Brown, J., Drayson, M. T., Selby, P. J., & Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. (2003). High-Dose Chemotherapy with Hematopoietic Stem-Cell Rescue for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 348(19), 1875–1883. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022340>
- Chretien, M.-L., Corre, J., Lauwers-Cances, V., Magrangeas, F., Cleyne, A., Yon, E., Hulin, C., Leleu, X., Orsini-Piocelle, F., Blade, J.-S., Sohn, C., Karlin, L., Delbrel, X., Hebraud, B., Roussel, M., Marit, G., Garderet, L., Mohty, M., Rodon, P., ... Avet-Loiseau, H. (2015). Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*, 126(25), 2713–2719. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-650242>
- Cohen, A. D., Garfall, A. L., Stadtmauer, E. A., Melenhorst, J. J., Lacey, S. F., Lancaster, E., Vogl, D. T., Weiss, B. M., Dengel, K., Nelson, A., Plesa, G., Chen, F., Davis, M. M., Hwang, W. T., Young, R. M., Brogdon, J. L., Isaacs, R., Pruteanu-Malinici, I., Siegel, D. L., ... Milone, M. C. (2019). B cell maturation antigen–specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *Journal of Clinical Investigation*, 129(6), 2210–2221. <https://doi.org/10.1172/JCI126397>
- Costa, L. J., Wong, S. W., Bermúdez, A., de la Rubia, J., Mateos, M.-V., Ocio, E. M., Rodríguez-Otero, P., San-Miguel, J., Li, S., Sarmiento, R., Lardelli, P., Gaudy, A., Boss, I., Kelly, L. M., Burgess, M. R., Hege, K., & Bensinger, W. I. (2019). First Clinical Study of the B-Cell Maturation Antigen (BCMA) 2+1 T Cell Engager (TCE) CC-93269 in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Interim Results of a Phase 1 Multicenter Trial. *Blood*, 134(Supplement_1), 143–143. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-122895>
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., & Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 93(5), 1658–1667. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029595>

De La Puerta Rueda, J. E., Burgos, L., Letamendi Madariaga, G., Martínez Bilbao, C., Atutxa Aresti, L., Ojanguren Bergaz, J., Olivares Salaverri, M., Sancho Garaizabal, B., Uriarte, I., Vicente Olabarria, I., Pérez Garay, R., de Juan Arroyo, A., Amarika Ibarrondo, I., Carrascosa Vallejo, T., Casado Diez, A., Cortes Fernández, C., Etxeguren Urkixo, I., Gainza González, E., González Vallejo, I., ... Paiva, B. (2019). Precision Medicine Based on the Achievement of Sustained Undetectable Minimal Residual Disease (MRD) By Next-Generation Flow (NGF) and Imaging Leads to Significant Reduction in Risk of Progression of Patients with Multiple Myeloma (MM). *Blood*, *134*(Supplement_1), 3170–3170. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-125062>

De Tute, Ruth M., Rawstron, A. C., Gregory, W. M., Child, J. A., Davies, F. E., Bell, S. E., Cook, G., Szubert, A. J., Drayson, M. T., Jackson, G. H., Morgan, G. J., & Owen, R. G. (2016). Minimal residual disease following autologous stem cell transplant in myeloma: Impact on outcome is independent of induction regimen. In *Haematologica* (Vol. 101, Issue 2, pp. e69–e71). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.128215>

de Tute, Ruth Mary, Rawstron, A. C., Cairns, D. A., Pawlyn, C., Davies, F. E., Collett, C., Kaiser, M. F., Jones, J. R., Waterhouse, A., Striha, A., Cook, G., Jenner, M. W., Russell, N. H., Drayson, M. T., Gregory, W. M., Jackson, G. H., Morgan, G. J., & Owen, R. G. (2016). Impact of Minimal Residual Disease in Transplant Ineligible Myeloma Patients: Results from the UK NCRI Myeloma XI Trial. *Blood*, *128*(22), 245–245. <https://doi.org/10.1182/blood.v128.22.245.245>

Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C. M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., & Malavasi, F. (1998). Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *160*(1), 395–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551996>

Deaglio, Silvia, Aydin, S., Vaisitti, T., Bergui, L., & Malavasi, F. (2008). CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 14, Issue 5, pp. 210–218). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.02.005>

Dhodapkar, M. V., Sexton, R., Das, R., Dhodapkar, K. M., Zhang, L., Sundaram, R., Soni, S., Crowley, J. J., Orlowski, R. Z., & Barlogie, B. (2015). Prospective analysis of antigen-specific immunity, stem-cell antigens, and immune checkpoints in monoclonal gammopathy. *Blood*, *126*(22), 2475–2478. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-632919>

Dimopoulos, M., Weisel, K., van de Donk, N. W. C. J., Ramasamy, K., Gamberi, B., Streetly, M., Offidani, M., Bridoux, F., de la Rubia, J., Mateos, M. V., Ardizzoia, A., Kueenbourg, E., Collins, S., Di Micco, A., Rosettani, B., Li, Y., Bacon, P., & Sonneveld, P. (2018). Pomalidomide plus low-dose dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma and renal impairment: Results from a phase ii trial. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(20), 2035–2043. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.1742>

Dimopoulos, M A, Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N. J., Usmani, S. Z., Rabin, N., Orlowski, R. Z., Komarnicki, M., Suzuki, K., Plesner, T., Yoon, S. S., Ben Yehuda, D., Richardson, P. G., Goldschmidt, H., Reece, D., Lisby, S., Khokhar, N. Z., O'Rourke, L., ... Investigators, P. (2016). Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*, *375*(14), 1319–1331. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607751> [doi]

Dimopoulos, Meletios A., San-Miguel, J., Belch, A., White, D., Benboubker, L., Cook, G., Leiba, M., Morton, J., Joy Ho, P., Kim, K., Takezako, N., Moreau, P., Kaufman, J. L., Sutherland, H. J., Lalancette, M., Magen, H., Iida, S., Kim, J. S., Miles Prince, H., ... Usmani, S. Z. (2018). Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: Updated analysis of POLLUX. *Haematologica*, *103*(12), 2088–2096. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.194282>

- Dimopoulos, Meletios A, Moreau, P., Palumbo, A., Joshua, D., Pour, L., Hájek, R., Facon, T., Ludwig, H., Oriol, A., Goldschmidt, H., Rosiñol, L., Straub, J., Suvorov, A., Araujo, C., Rimashevskaya, E., Pika, T., Gaidano, G., Weisel, K., Goranova-Marinova, V., ... ENDEAVOR Investigators. (2016). Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *The Lancet Oncology*, 17(1), 27–38. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00464-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00464-7)
- Dores, G. M., Landgren, O., McGlynn, K. A., Curtis, R. E., Linet, M. S., & Devesa, S. S. (2009). Plasmacytoma of bone, extramedullary plasmacytoma, and multiple myeloma: incidence and survival in the United States, 1992-2004. *British Journal of Haematology*, 144(1), 86–94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07421.x>
- Durie, B G M, Harousseau, J.-L., Miguel, J. S., Bladé, J., Barlogie, B., Anderson, K., Gertz, M., Dimopoulos, M., Westin, J., Sonneveld, P., Ludwig, H., Gahrton, G., Beksac, M., Crowley, J., Belch, A., Boccadaro, M., Turesson, I., Joshua, D., Vesole, D., ... International Myeloma Working Group. (2006). International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20(9), 1467–1473. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404284>
- Durie, Brian G M, Hoering, A., Abidi, M. H., Rajkumar, S. V., Epstein, J., Kahanic, S. P., Thakuri, M., Reu, F., Reynolds, C. M., Sexton, R., Orlowski, R. Z., Barlogie, B., & Dispenzieri, A. (2017). Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 389(10068), 519–527. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31594-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31594-X)
- Durie, Brian G M, Kyle, R. A., Belch, A., Bensinger, W., Blade, J., Boccadaro, M., Child, J. A., Comenzo, R., Djulbegovic, B., Fantl, D., Gahrton, G., Harousseau, J. L., Hungria, V., Joshua, D., Ludwig, H., Mehta, J., Morales, A. R., Morgan, G., Nouel, A., ... Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. (2003). Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *The Hematology Journal: The Official Journal of the European Haematology Association*, 4(6), 379–398. <https://doi.org/10.1038/sj.thj.6200312>
- Dytfeld, D., Jasielc, J., Griffith, K. A., Lebovic, D., Vesole, D. H., Jagannath, S., Al-Zoubi, A., Anderson, T., Detweiler-Short, K., Stockerl-Goldstein, K., Ahmed, A., Jobkar, T., Durecki, D. E., McDonnell, K., Mietzel, M., Couriel, D., Kaminski, M., Vij, R., & Jakubowiak, A. J. (2014). Carfilzomib, lenalidomide, and low-dose dexamethasone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma. In *Haematologica* (Vol. 99, Issue 9). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.110395>
- Facon, T., Kumar, S., Plesner, T., Orlowski, R. Z., Moreau, P., Bahlis, N., Basu, S., Nahi, H., Hulin, C., Quach, H., Goldschmidt, H., O'Dwyer, M., Perrot, A., Venner, C. P., Weisel, K., Mace, J. R., Raje, N., Attal, M., Tiab, M., ... Usmani, S. Z. (2019). Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 380(22), 2104–2115. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817249>
- Facon, T., Lee, J. H., Moreau, P., Niesvizky, R., Dimopoulos, M., Hajek, R., Pour, L., Jurczyszyn, A., Qiu, L., Klippel, Z., Zahlten-Kumeli, A., Osman, M., Paiva, B., & San-Miguel, J. (2019). Carfilzomib or bortezomib with melphalan-prednisone for transplant-ineligible patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 133(18), 1953–1963. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874396>
- Fayers, P. M., Palumbo, A., Hulin, C., Waage, A., Wijermans, P., Beksac, M., Bringhen, S., Mary, J. Y., Gimsing, P., Termorshuizen, F., Haznedar, R., Caravita, T., Moreau, P., Turesson, I., Musto, P., Benboubker, L., Schaafsma, M., Sonneveld, P., & Facon, T. (2011). Thalidomide for previously untreated elderly patients with multiple myeloma: Meta-analysis of 1685 individual patient data from 6 randomized clinical trials. *Blood*, 118(5), 1239–1247. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-341669>

FDA authorizes first next generation sequencing-based test to detect very low levels of remaining cancer cells in patients with acute lymphoblastic leukemia or multiple myeloma | FDA. (n.d.). Retrieved March 25, 2020, from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-authorizes-first-next-generation-sequencing-based-test-detect-very-low-levels-remaining-cancer>

Ferrero, S., Ladetto, M., Drandi, D., Cavallo, F., Genuardi, E., Urbano, M., Caltagirone, S., Grasso, M., Rossini, F., Guglielmelli, T., Cangialosi, C., Liberati, A. M., Callea, V., Carovita, T., Crippa, C., De Rosa, L., Pisani, F., Falcone, A. P., Pregno, P., ... Palumbo, A. (2015). Long-term results of the GIMEMA VEL-03-096 trial in MM patients receiving VTD consolidation after ASCT: MRD kinetics' impact on survival. *Leukemia*, 29(3), 689–695. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.219>

Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Paiva, B., Puig, N., Garcia-Sanchez, O., Bottcher, S., van der Velden, V. H., Perez-Moran, J. J., Vidriales, M. B., Garcia-Sanz, R., Jimenez, C., Gonzalez, M., Martinez-Lopez, J., Corral-Mateos, A., Grigore, G. E., Fluxa, R., Pontes, R., Caetano, J., Sedek, L., ... Orfao, A. (2017). Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.29> [doi]

Fonseca, R., Bailey, R. J., Ahmann, G. J., Rajkumar, S. V., Hoyer, J. D., Lust, J. A., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Greipp, P. R., & Dewald, G. W. (2002). Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 100(4), 1417–1424. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149226>

Gambella, M., Omedé, P., Spada, S., Muccio, V. E., Gilestro, M., Saraci, E., Grammatico, S., Larocca, A., Conticello, C., Bernardini, A., Gamberi, B., Troia, R., Liberati, A. M., Offidani, M., Rocci, A., Palumbo, A., Cavo, M., Sonneveld, P., Boccadoro, M., & Oliva, S. (2019). Minimal residual disease by flow cytometry and allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with myeloma receiving lenalidomide maintenance: A pooled analysis. *Cancer*, 125(5), 750–760. <https://doi.org/10.1002/cncr.31854>

Gandolfi, S., Prada, C. P., & Richardson, P. G. (2018). How I treat the young patient with multiple myeloma. *Blood*, 132(11), 1114–1124. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-693606>

Garfall, A. L., Stadtmauer, E. A., Hwang, W. T., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Krevvata, M., Carroll, M. P., Matsui, W. H., Wang, Q., Dhodapkar, M. V., Dhodapkar, K., Das, R., Vogl, D. T., Weiss, B. M., Cohen, A. D., Mangan, P. A., Ayers, E. C., Nunez-Cruz, S., Kulikovskaya, I., ... June, C. H. (2018). Anti-CD19 CAR t cells with high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation for refractory multiple myeloma. *JCI Insight*, 3(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120505>

Gay, F., Larocca, A., Wijermans, P., Cavallo, F., Rossi, D., Schaafsma, R., Genuardi, M., Romano, A., Liberati, A. M., Siniscalchi, A., Petrucci, M. T., Nozzoli, C., Patriarca, F., Offidani, M., Ria, R., Omede, P., Bruno, B., Passera, R., Musto, P., ... Palumbo, A. (2011). Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood*, 117(11), 3025–3031. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307645> [doi]

Giralt, S., Garderet, L., Durie, B., Cook, G., Gahrton, G., Bruno, B., Hari, P., Lokhorst, H., McCarthy, P., Krishnan, A., Sonneveld, P., Goldschmidt, H., Jagannath, S., Barlogie, B., Mateos, M., Gimsing, P., Sezer, O., Mikhael, J., Lu, J., ... Stadtmauer, E. (2015). American Society of Blood and Marrow Transplantation, European Society of Blood and Marrow Transplantation, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, and International Myeloma Working Group Consensus Conference on Salvage Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Relapsed Multiple Myeloma. In *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (Vol. 21, Issue 12, pp. 2039–2051). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.09.016>

Gogishvili, T., Danhof, S., Prommersberger, S., Rydzek, J., Schreder, M., Brede, C., Einsele, H., & Hudecek, M. (2017). SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7+ normal lymphocytes. *Blood*, *130*(26), 2838–2847. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-778423>

Gonsalves, W. I., Timm, M. M., Rajkumar, S. V., Morice, W. G., Dispenzieri, A., Buadi, F. K., Lacy, M. Q., Dingli, D., Leung, N., Kapoor, P., Kyle, R. A., Gertz, M. A., & Kumar, S. K. (2016). The prognostic significance of CD45 expression by clonal bone marrow plasma cells in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia Research*, *44*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.03.003> [doi]

Gonsalves, Wilson I., Gertz, M. A., Gupta, V., Rajkumar, S. V., Morice, W. G., Timm, M. M., Singh, P. P., Dispenzieri, A., Buadi, F. K., Lacy, M. Q., Kapoor, P., & Kumar, S. K. (2014). Prognostic Significance of Quantifying Circulating Plasma Cells in Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, *14*, S147. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2014.06.087>

González, D., van der Burg, M., García-Sanz, R., Fenton, J. A., Langerak, A. W., González, M., van Dongen, J. J. M., San Miguel, J. F., & Morgan, G. J. (2007). Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, *110*(9), 3112–3121. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069625>

Gormley, N. J., Turley, D. M., Dickey, J. S., Farrell, A. T., Reaman, G. H., Stafford, E., Carrington, L., & Marti, G. E. (2016). Regulatory perspective on minimal residual disease flow cytometry testing in multiple myeloma. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *90*(1), 73–80. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21268> [doi]

Greipp, P. R., Miguel, J. S., Durie, B. G. M., Crowley, J. J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R. A., Lahuerta, J. J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I., ... Westin, J. (2005). International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(15), 3412–3420. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.242>

Gu, J., Liu, J., Chen, M., Huang, B., & Li, J. (2018). Longitudinal Flow Cytometry Identified “Minimal Residual Disease” (MRD) Evolution Patterns for Predicting the Prognosis of Patients with Transplant-Eligible Multiple Myeloma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *24*(12), 2568–2574. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.07.040>

Guo, B., Chen, M., Han, Q., Hui, F., Dai, H., Zhang, W., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, H., & Han, W. (2016). CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma. *Journal of Cellular Immunotherapy*, *2*(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.11.001>

Guo, J., Su, J., He, Q., Li, X., Zhao, Y., Gu, S., Fei, C., & Chang, C. (2016). The prognostic impact of multiparameter flow cytometry immunophenotyping and cytogenetic aberrancies in patients with multiple myeloma. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, *21*(3), 152–161. <https://doi.org/10.1179/1607845415Y.0000000010> [doi]

Hahn, T. E., Wallace, P. K., Fraser, R., Fei, M., Tario, J. D., Howard, A., Zhang, Y., Blackwell, B., Brunstein, C. G., Efebera, Y. A., Geller, N., Giral, S. A., Hari, P., Knust, K., Koreth, J., Krishnan, A., Landau, H., Shah, N., Somlo, G., ... Pasquini, M. C. (2019). Minimal Residual Disease (MRD) Assessment before and after Autologous Hematopoietic Cell Transplantation (AutoHCT) and Maintenance for Multiple Myeloma (MM): Results of the Prognostic Immunophenotyping for Myeloma Response (PRIMeR) Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *25*(3), S4–S6. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.687>

Hari, P. N., Zhang, M.-J., Roy, V., Pérez, W. S., Bashey, A., To, L. B., Elfenbein, G., Freytes, C. O., Gale, R. P., Gibson, J., Kyle, R. A., Lazarus, H. M., McCarthy, P. L., Milone, G. A., Pavlovsky, S., Reece, D. E., Schiller, G., Vela-Ojeda, J., Weisdorf, D., &

Vesole, D. (2009). Is the international staging system superior to the Durie–Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia*, 23(8), 1528–1534. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.61>

Harousseau, J. L., & Avet-Loiseau, H. (2017). Minimal residual disease negativity is a new end point of myeloma therapy. In *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 35, Issue 25, pp. 2863–2865). American Society of Clinical Oncology. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.1331>

Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2002). Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 927–937. <https://doi.org/10.1038/nrc952>

Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P. G., & Anderson, K. C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 585–598. <https://doi.org/10.1038/nrc2189>

Hillengass, J., Ayyaz, S., Kilk, K., Weber, M. A., Hielscher, T., Shah, R., Hose, D., Delorme, S., Goldschmidt, H., & Neben, K. (2012). Changes in magnetic resonance imaging before and after autologous stem cell transplantation correlate with response and survival in multiple myeloma. *Haematologica*, 97(11), 1757–1760. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.065359>

Hillengass, J., Bäuerle, T., Bartl, R., Andrusis, M., Mcclanahan, F., Laun, F. B., Zechmann, C. M., Shah, R., Wagner-Gund, B., Simon, D., Heiss, C., Neben, K., Ho, A. D., Schlemmer, H. P., Goldschmidt, H., Delorme, S., & Stieltjes, B. (2011). Diffusion-weighted imaging for non-invasive and quantitative monitoring of bone marrow infiltration in patients with monoclonal plasma cell disease: A comparative study with histology. *British Journal of Haematology*, 153(6), 721–728. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08658.x>

Ho, C. M., McCarthy, P. L., Wallace, P. K., Zhang, Y., Fora, A., Mellors, P., Tario, J. D., McCarthy, B. L. S., Chen, G. L., Holstein, S. A., Balderman, S. R., Cao, X., Paiva, B., & Hahn, T. (2017). Immune signatures associated with improved progression-free and overall survival for myeloma patients treated with AHST. *Blood Advances*, 1(15), 1056–1066. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005447>

Jakubowiak, A., Offidani, M., Pegourie, B., De La Rubia, J., Garderet, L., Laribi, K., Bosi, A., Marasca, R., Laubach, J., Mohrbacher, A., Carella, A. M., Singhal, A. K., Tsao, L. C., Lynch, M., Bleickardt, E., Jou, Y.-M., Robbins, M., & Palumbo, A. (2016). Randomized phase 2 study: elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM. *Blood*, 127(23), 2833–2840. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-694604>

Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J. L., Bataille, R., & Pellat-Deceunynck, C. (1999). Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*, 94(2), 701–712. https://doi.org/10.1182/blood.v94.2.701.414k16_701_712

Jourdan, M., Ferlin, M., Legouffe, E., Horvathova, M., Liautard, J., Rossi, J. F., Wijdenes, J., Brochier, J., & Klein, B. (1998). The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *British Journal of Haematology*, 100(4), 637–646. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00623.x>

June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S., & Milone, M. C. (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. In *Science* (Vol. 359, Issue 6382, pp. 1361–1365). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aar6711>

Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V. H. J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S.,

Ritgen, M., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonça, A., de Tute, R., Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M. B., Pérez, J. J., te Marvelde, J. G., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Szczepański, T., ... EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26(9), 1986–2010. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>

Keats, J. J., Chesi, M., Egan, J. B., Garbitt, V. M., Palmer, S. E., Braggio, E., Van Wier, S., Blackburn, P. R., Baker, A. S., Dispenzieri, A., Kumar, S., Rajkumar, S. V., Carpten, J. D., Barrett, M., Fonseca, R., Stewart, A. K., & Bergsagel, P. L. (2012). Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, 120(5), 1067–1076. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405985> [doi]

Korde, N., Kristinsson, S. Y., & Landgren, O. (2011). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): Novel biological insights and development of early treatment strategies. In *Blood* (Vol. 117, Issue 21, pp. 5573–5581). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-270140>

Korde, N., Roschewski, M., Zingone, A., Kwok, M., Manasanch, E. E., Bhutani, M., Tajeja, N., Kazandjian, D., Mailankody, S., Wu, P., Morrison, C., Costello, R., Zhang, Y., Burton, D., Mulquin, M., Zuchlinski, D., Lamping, L., Carpenter, A., Wall, Y., ... Landgren, O. (2015). Treatment With Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone With Lenalidomide Extension in Patients With Smoldering or Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *JAMA Oncology*, 1(6), 746. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2010>

Korthals, M., Sehnke, N., Kronenwett, R., Bruns, I., Mau, J., Zohren, F., Haas, R., Kobbe, G., & Fenk, R. (2012). The Level of Minimal Residual Disease in the Bone Marrow of Patients with Multiple Myeloma before High-Dose Therapy and Autologous Blood Stem Cell Transplantation Is an Independent Predictive Parameter. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 18(3), 423-431.e3. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.07.002>

Kristinsson, S. Y., Landgren, O., Dickman, P. W., Derolf, Å. R., & Björkholm, M. (2007). Patterns of Survival in Multiple Myeloma: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden From 1973 to 2003. *Journal of Clinical Oncology*, 25(15), 1993–1999. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0100>

Kuehl, W. M., & Bergsagel, P. L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 175–187. <https://doi.org/10.1038/nrc746>

Kumar, S., Fonseca, R., Ketterling, R. P., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Gertz, M. A., Hayman, S. R., Buadi, F. K., Dingli, D., Knudson, R. A., Greenberg, A., Russell, S. J., Zeldenrust, S. R., Lust, J. A., Kyle, R. A., Bergsagel, L., & Rajkumar, S. V. (2012). Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*, 119(9), 2100–2105. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390658>

Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K. C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., Munshi, N., Lonial, S., Blade, J., Mateos, M. V., Dimopoulos, M., Kastritis, E., Boccadoro, M., Orłowski, R., Goldschmidt, H., Spencer, A., Hou, J., Chng, W. J., Usmani, S. Z., ... Avet-Loiseau, H. (2016). International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 17(8), e328-46. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30206-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30206-6) [doi]

Kumar, S K, Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Gertz, M. A., Buadi, F. K., Pandey, S., Kapoor, P., Dingli, D., Hayman, S. R., Leung, N., Lust, J., McCurdy, A., Russell, S. J., Zeldenrust, S. R., Kyle, R. A., & Rajkumar, S. V. (2014). Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 28(5), 1122–1128. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.313>

Kumar, Shaji K. (2018). Management of Multiple Myeloma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 16(5S), 624–627. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0040>

Kumar, Shaji K., Mikhael, J. R., Buadi, F. K., Dingli, D., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Gertz, M. A., Greipp, P. R., Hayman, S. R., Kyle, R. A., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Reeder, C. B., Roy, V., Russell, S. J., Short, K. E. D., Stewart, A. K., Witzig, T. E., Zeldenrust, S. R., ... Bergsagel, P. L. (2009). Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines. *Mayo Clinic Proceedings*, 84(12), 1095–1110. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0603>

Kumar, Shaji K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Gay, F., & Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>

Kyle, R A, & Rajkumar, S. V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23(1), 3–9. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.291>

Kyle, Robert A., Remstein, E. D., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kurtin, P. J., Hodnefield, J. M., Larson, D. R., Plevak, M. F., Jelinek, D. F., Fonseca, R., Melton, L. J., & Rajkumar, S. V. (2007). Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 356(25), 2582–2590. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070389>

Ladetto, M., Bruggemann, M., Monitillo, L., Ferrero, S., Pepin, F., Drandi, D., Barbero, D., Palumbo, A., Passera, R., Boccadoro, M., Ritgen, M., Gokbuget, N., Zheng, J., Carlton, V., Trautmann, H., Faham, M., & Pott, C. (2014). Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*, 28(6), 1299–1307. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.375> [doi]

Ladetto, M., Pagliano, G., Ferrero, S., Cavallo, F., Drandi, D., Santo, L., Crippa, C., De Rosa, L., Pregno, P., Grasso, M., Liberati, A. M., Caravita, T., Pisani, F., Guglielmelli, T., Callea, V., Musto, P., Cangialosi, C., Passera, R., Boccadoro, M., & Palumbo, A. (2010). Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(12), 2077–2084. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7172> [doi]

Lahuerta, J.-J., Paiva, B., Vidriales, M.-B., Cerdón, L., Cedena, M.-T., Puig, N., Martínez-López, J., Rosiñol, L., Gutiérrez, N. C., Martín-Ramos, M.-L., Oriol, A., Teruel, A.-I., Echeveste, M.-A., de Paz, R., de Arriba, F., Hernández, M. T., Palomera, L., Martínez, R., Martín, A., ... GEM (Grupo Español de Mieloma)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Group. (2017). Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three PETHEMA/GEM Clinical Trials. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, JCO2016692517. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.2517>

Lahuerta, J. J., Mateos, M. V., Martínez-López, J., Rosiñol, L., Sureda, A., de la Rubia, J., García-Laraña, J., Martínez-Martínez, R., Hernández-García, M. T., Carrera, D., Besalduch, J., de Arriba, F., Ribera, J. M., Escoda, L., Hernández-Ruiz, B., García-Frade, J., Rivas-González, C., Alegre, A., Bladé, J., & San Miguel, J. F. (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. *Journal of Clinical Oncology*, 26(35), 5775–5782. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.9721>

Landgren, O., Gormley, N., Turley, D., Owen, R. G., Rawstron, A., Paiva, B., Barnett, D., Arroz, M., Wallace, P., Durie, B., Yuan, C., Dogan, A., Stetler-Stevenson, M., & Marti, G. E. (2014). Flow cytometry detection of minimal residual disease in multiple myeloma: Lessons learned at FDA-NCI roundtable symposium. In *American Journal of Hematology* (Vol. 89, Issue 12, pp. 1159–1160). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ajh.23831>

Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R. J., Baris, D., Hoover, R., & Rajkumar, S. V. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, *113*(22), 5412–5417. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194241>

Landgren, O., Lu, S. X., & Hultcrantz, M. (2018). MRD Testing in Multiple Myeloma: The Main Future Driver for Modern Tailored Treatment. In *Seminars in Hematology* (Vol. 55, Issue 1, pp. 44–50). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.03.001>

Laubach, J., Garderet, L., Mahindra, A., Gahrton, G., Caers, J., Sezer, O., Voorhees, P., Leleu, X., Johnsen, H. E., Streetly, M., Jurczyszyn, A., Ludwig, H., Mellqvist, U. H., Chng, W. J., Pilarski, L., Einsele, H., Hou, J., Turesson, I., Zamagni, E., ... Richardson, P. G. (2016). Management of relapsed multiple myeloma: Recommendations of the International Myeloma Working Group. In *Leukemia* (Vol. 30, Issue 5, pp. 1005–1017). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.356>

Lee, N., Moon, S. Y., Lee, J. H., Park, H. K., Kong, S. Y., Bang, S. M., Lee, J. H., Yoon, S. S., & Lee, D. S. (2017). Discrepancies between the percentage of plasma cells in bone marrow aspiration and BM biopsy: Impact on the revised IMWG diagnostic criteria of multiple myeloma. In *Blood Cancer Journal* (Vol. 7, Issue 2, p. e530). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.14>

Lin, Q., Zhao, J., Song, Y., & Liu, D. (2019). Recent updates on CAR T clinical trials for multiple myeloma. In *Molecular Cancer* (Vol. 18, Issue 1, pp. 1–11). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1092-1>

Liu, D., Lin, P., Hu, Y., Zhou, Y., Tang, G., Powers, L., Medeiros, L. J., Jorgensen, J. L., & Wang, S. A. (2012). Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: Comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *Journal of Clinical Pathology*, *65*(9), 823–829. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-200881>

Lohr, J. G., Stojanov, P., Carter, S. L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M. S., Auclair, D., Sougnez, C., Knoechel, B., Gould, J., Saksena, G., Cibulskis, K., McKenna, A., Chapman, M. A., Straussman, R., Levy, J., Perkins, L. M., Keats, J. J., Schumacher, S. E., Rosenberg, M., ... Golub, T. R. (2014). Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*, *25*(1), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.12.015> [doi]

Lokhorst, H. M., Plesner, T., Laubach, J. P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., Minnema, M. C., Lassen, U., Krejci, J., Palumbo, A., van de Donk, N. W., Ahmadi, T., Khan, I., Uhlar, C. M., Wang, J., Sasser, A. K., Losic, N., Lisby, S., Basse, L., ... Richardson, P. G. (2015). Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*, *373*(13), 1207–1219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506348> [doi]

Lonial, S., Dimopoulos, M., Palumbo, A., White, D., Grosicki, S., Spicka, I., Walter-Croneck, A., Moreau, P., Mateos, M. V., Magen, H., Belch, A., Reece, D., Beksac, M., Spencer, A., Oakervee, H., Orlowski, R. Z., Taniwaki, M., Rollig, C., Einsele, H., ... Investigators, E.-2. (2015). Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*, *373*(7), 621–631. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505654> [doi]

Lonial, Sagar, Jacobus, S., Fonseca, R., Weiss, M., Kumar, S., Orlowski, R. Z., Kaufman, J. L., Yacoub, A. M., Buadi, F. K., O'Brien, T., Matous, J. V., Anderson, D. M., Emmons, R. V., Mahindra, A., Wagner, L. I., Dhodapkar, M. V., & Rajkumar, S. V. (2019). Randomized Trial of Lenalidomide Versus Observation in Smoldering Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, *JCO.19.01740*. <https://doi.org/10.1200/jco.19.01740>

Mai, E. K., Bertsch, U., Dürig, J., Kunz, C., Haenel, M., Blau, I. W., Munder, M., Jauch, A.,

Schurich, B., Hielscher, T., Merz, M., Huegle-Doerr, B., Seckinger, A., Hose, D., Hillengass, J., Raab, M. S., Neben, K., Lindemann, H. W., Zeis, M., ... Goldschmidt, H. (2015). Phase III trial of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) versus bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) in newly diagnosed myeloma. *Leukemia*, 29(8), 1721–1729. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.80>

Mailankody, S., Korde, N., Lesokhin, A. M., Lendvai, N., Hassoun, H., Stetler-Stevenson, M., & Landgren, O. (2015). Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nature Reviews.Clinical Oncology*, 12(5), 286–295. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.239> [doi]

Majithia, N., Rajkumar, S. V., Lacy, M. Q., Buadi, F. K., Dispenzieri, A., Gertz, M. A., Hayman, S. R., Dingli, D., Kapoor, P., Hwa, L., Lust, J. A., Russell, S. J., Go, R. S., Kyle, R. A., & Kumar, S. K. (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>

Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T., & Aydin, S. (2008). Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. In *Physiological Reviews* (Vol. 88, Issue 3, pp. 841–886). <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2007>

Manier, S., Kawano, Y., Bianchi, G., Roccaro, A. M., & Ghobrial, I. M. (2016). Cell autonomous and microenvironmental regulation of tumor progression in precursor states of multiple myeloma. *Current Opinion in Hematology*, 23(4), 426–433. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000259>

Manzanera, G. M., Izquierdo, J. F. S. M., & de Matos, A. O. (2005). Immunophenotyping of Plasma Cells in Multiple Myeloma. In *Multiple Myeloma* (Vol. 113, pp. 5–24). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-916-8:5>

Martinelli, G., Terragna, C., Zamagni, E., Ronconi, S., Tosi, P., Lemoli, R. M., Bandini, G., Motta, M. R., Testoni, N., Amabile, M., Ottaviani, E., Vianelli, N., de Vivo, A., Gozzetti, A., Tura, S., & Cavo, M. (2000). Molecular Remission After Allogeneic or Autologous Transplantation of Hematopoietic Stem Cells for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 18(11), 2273–2281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.11.2273>

Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J. J., Pepin, F., Gonzalez, M., Barrio, S., Ayala, R., Puig, N., Montalban, M. A., Paiva, B., Weng, L., Jimenez, C., Sopena, M., Moorhead, M., Cedena, T., Rapado, I., Mateos, M. V., Rosinol, L., Oriol, A., Blanchard, M. J., ... Garcia-Sanz, R. (2014). Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*, 123(20), 3073–3079. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-550020> [doi]

Martinez-Lopez, Joaquin, Blade, J., Mateos, M. V., Grande, C., Alegre, A., García-Laraña, J., Sureda, A., De La Rubia, J., Conde, E., Martinez, R., De Arriba, F., Viguria, M. C., Besalduch, J., Cabrera, R., Gonzalez-San Miguel, J. D., Guzman-Zamudio, J. L., Gomez Del Castillo, M. C., Moraleta, J. M., García-Ruiz, J. C., ... Lahuerta, J. J. (2011). Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood*, 118(3), 529–534. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332320>

Martinez-Lopez, Joaquin, Fernández-Redondo, E., García-Sánz, R., Montalbán, M. A., Martínez-Sánchez, P., Pavia, B., Mateos, M. V., Rosiñol, L., Martín, M., Ayala, R., Martínez, R., Blanchard, M. J., Alegre, A., Besalduch, J., Bargay, J., Hernandez, M. T., Sarasquete, M. E., Sanchez-Godoy, P., Fernández, M., ... GEM (Grupo Español Multidisciplinar de Melanoma)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study group. (2013). Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study. *British Journal of Haematology*, 163(5), 581–589. <https://doi.org/10.1111/bjh.12576>

Martínez-Sánchez, P., Montejano, L., Sarasquete, M. E., García-Sanz, R., Fernández-Redondo, E., Ayala, R., Montalbán, M. A., Martínez, R., García Laraña, J., Alegre, A., Hernández, B., Lahuerta, J. J., & Martínez-López, J. (2008). Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-polymerase chain reaction: the prognostic impact of achieving molecular response. *British Journal of Haematology*, *142*(5), 766–774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07263.x>

Mateo, G., Castellanos, M., Rasillo, A., Gutierrez, N. C., Montalban, M. A., Martin, M. L., Hernandez, J. M., Lopez-Berges, M. C., Montejano, L., Blade, J., Mateos, M. V, Sureda, A., de la Rubia, J., Diaz-Mediavilla, J., Pandiella, A., Lahuerta, J. J., Orfao, A., & San Miguel, J. F. (2005). Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(10), 3661–3667. <https://doi.org/11/10/3661> [pii]

Mateo, G., Montalban, M. A., Vidriales, M. B., Lahuerta, J. J., Mateos, M. V, Gutierrez, N., Rosinol, L., Montejano, L., Blade, J., Martinez, R., de la Rubia, J., Diaz-Mediavilla, J., Sureda, A., Ribera, J. M., Ojanguren, J. M., de Arriba, F., Palomera, L., Terol, M. J., Orfao, A., ... Group, G. E. M. S. (2008). Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *26*(16), 2737–2744. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4120> [doi]

Mateos, M. V., Oriol, A., Martínez-López, J., Gutiérrez, N., Teruel, A. I., De La Guía, A. L., López, J., Bengoechea, E., Pérez, M., Polo, M., Palomera, L., De Arriba, F., González, Y., Hernández, J. M., Granell, M., Bello, J. L., Bargay, J., Peñalver, F. J., Ribera, J. M., ... San-Miguel, J. F. (2012). Maintenance therapy with bortezomib plus thalidomide or bortezomib plus prednisone in elderly multiple myeloma patients included in the GEM2005MAS65 trial. *Blood*, *120*(13), 2581–2588. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-427815>

Mateos, Maria-Victoria, Blacklock, H., Schjesvold, F., Rocafiguera, A. O., Simpson, D., George, A., Goldschmidt, H., Larocca, A., Sherbenou, D. W., Avivi, I., Iida, S., Matsumoto, M., Usmani, S. Z., Jagannath, S., Rodriguez-Otero, P., Kher, U., Farooqui, M. Z. H., Liao, J., Marinello, P., & Lonial, S. (2018). A phase 3 randomized study of pembrolizumab (Pembro) plus pomalidomide (Pom) and dexamethasone (Dex) for relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM): KEYNOTE-183. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(15_suppl), 8021–8021. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.8021

Mateos, María-Victoria, Hernández, M.-T., Giraldo, P., de la Rubia, J., de Arriba, F., Corral, L. L., Rosiñol, L., Paiva, B., Palomera, L., Bargay, J., Oriol, A., Prosper, F., López, J., Olavarría, E., Quintana, N., García, J.-L., Bladé, J., Lahuerta, J.-J., & San Miguel, J.-F. (2013). Lenalidomide plus Dexamethasone for High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, *369*(5), 438–447. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300439>

Mateos, Maria-Victoria, Sonneveld, P., Hungria, V., Nooka, A. K., Estell, J. A., Barreto, W., Corradini, P., Min, C.-K., Medvedova, E., Weisel, K., Chiu, C., Schechter, J. M., Amin, H., Qin, X., Ukropec, J., Kobos, R., & Spencer, A. (2019). Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone Versus Bortezomib and Dexamethasone in Patients With Previously Treated Multiple Myeloma: Three-year Follow-up of CASTOR. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.09.623>

Mateos, M. V., Dimopoulos, M. A., Cavo, M., Suzuki, K., Jakubowiak, A., Knop, S., Doyen, C., Lucio, P., Nagy, Z., Kaplan, P., Pour, L., Cook, M., Grosicki, S., Crepaldi, A., Liberati, A. M., Campbell, P., Shelekhova, T., Yoon, S. S., Iosava, G., ... San-Miguel, J. (2018). Daratumumab plus bortezomib, melphalan, and prednisone for untreated myeloma. *New England Journal of Medicine*, *378*(6), 518–528. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714678>

Mateos, M. V, Martinez-Lopez, J., Hernandez, M. T., Ocio, E. M., Rosinol, L., Martinez, R.,

Teruel, A. I., Gutierrez, N. C., Martin Ramos, M. L., Oriol, A., Bargay, J., Bengoechea, E., Gonzalez, Y., Perez de Oteyza, J., Gironella, M., Encinas, C., Martin, J., Cabrera, C., Paiva, B., ... San-Miguel, J. (2016). Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood*, *127*(4), 420–425. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-666537> [doi]

Mateos, M. V, Oriol, A., Martinez-Lopez, J., Gutierrez, N., Teruel, A. I., de Paz, R., Garcia-Larana, J., Bengoechea, E., Martin, A., Mediavilla, J. D., Palomera, L., de Arriba, F., Gonzalez, Y., Hernandez, J. M., Sureda, A., Bello, J. L., Bargay, J., Penalver, F. J., Ribera, J. M., ... Miguel, J. F. (2010). Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma. *The Lancet.Oncology*, *11*(10), 934–941. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70187-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70187-X) [doi]

Mateos, M. V, Oriol, A., Martinez-Lopez, J., Teruel, A. I., Lopez de la Guia, A., Lopez, J., Bengoechea, E., Perez, M., Martinez, R., Palomera, L., de Arriba, F., Gonzalez, Y., Hernandez, J. M., Granell, M., Bello, J. L., Bargay, J., Penalver, F. J., Martin-Mateos, M. L., Paiva, B., ... San-Miguel, J. F. (2014). GEM2005 trial update comparing VMP/VTP as induction in elderly multiple myeloma patients: do we still need alkylators? *Blood*, *124*(12), 1887–1893. <https://doi.org/blood-2014-05-573733> [pii]

Mathur, R., Zhang, Z., He, J., Galetto, R., Gouble, A., Chion-Sotinel, I., Filipe, S., Gariboldi, A., Veeramachaneni, T., Manasanch, E. E., Thomas, S. K., Lee, H. C., Patel, K. K., Weber, D. M., Davis, R. E., Orłowski, R. J., Smith, J., Yang, J., & Neelapu, S. S. (2017). Universal SLAMF7-Specific CAR T-Cells As Treatment for Multiple Myeloma. *Blood*, *130*(Supplement 1), 502–502. https://doi.org/10.1182/BLOOD.V130.SUPPL_1.502.502

Mazzotti, C., Buisson, L., Maheo, S., Perrot, A., Chretien, M. L., Leleu, X., Hulin, C., Manier, S., Hebraud, B., Roussel, M., Souto, L. Do, Attal, M., Avet-Loiseau, H., & Corre, J. (2018). Myeloma MRD by deep sequencing from circulating tumor DNA does not correlate with results obtained in the bone marrow. *Blood Advances*, *2*(21), 2811–2813. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018025197>

McCarthy, P. L., Holstein, S. A., Petrucci, M. T., Richardson, P. G., Hulin, C., Tosi, P., Brinthen, S., Musto, P., Anderson, K. C., Caillet, D., Gay, F., Moreau, P., Marit, G., Jung, S.-H., Yu, Z., Winograd, B., Knight, R. D., Palumbo, A., & Attal, M. (2017). Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(29), 3279–3289. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.6679>

McMillin, D. W., Delmore, J., Weisberg, E., Negri, J. M., Geer, D. C., Klippel, S., Mitsiades, N., Schlossman, R. L., Munshi, N. C., Kung, A. L., Griffin, J. D., Richardson, P. G., Anderson, K. C., & Mitsiades, C. S. (2010). Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nature Medicine*, *16*(4), 483–489. <https://doi.org/10.1038/nm.2112>

Mills, J. R., Barnidge, D. R., Dispenzieri, A., & Murray, D. L. (2017). High sensitivity blood-based M-protein detection in sCR patients with multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, *7*(8), e590. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.75>

Moreau, P, Robillard, N., Avet-Loiseau, H., Pineau, D., Morineau, N., Milpied, N., Harousseau, J. L., & Bataille, R. (2004). Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica*, *89*(5), 547–551.

Moreau, P, Robillard, N., Jego, G., Pellat, C., Le Gouill, S., Thoumi, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J. L., & Bataille, R. (2006). Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *British Journal of Haematology*, *132*(2), 168–170.

<https://doi.org/BJH5849> [pii]

Moreau, P., San Miguel, J., Sonneveld, P., Mateos, M. V., Zamagni, E., Avet-Loiseau, H., Hajek, R., Dimopoulos, M. A., Ludwig, H., Einsele, H., Zweegman, S., Facon, T., Cavo, M., Terpos, E., Goldschmidt, H., Attal, M., Buske, C., & ESMO Guidelines Committee. (2017). Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(suppl_4), iv52–iv61. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx096>

Moreau, Philippe. (2011). PET-CT in MM: A new definition of CR. In *Blood* (Vol. 118, Issue 23, pp. 5984–5985). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379818>

Moreau, Philippe. (2017). How I treat myeloma with new agents. In *Blood* (Vol. 130, Issue 13, pp. 1507–1513). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-743203>

Moreau, Philippe, Attal, M., Caillot, D., Macro, M., Karlin, L., Garderet, L., Facon, T., Benboubker, L., Escoffre-Barbe, M., Stoppa, A.-M., Laribi, K., Hulin, C., Perrot, A., Marit, G., Eveillard, J.-R., Caillon, F., Bodet-Milin, C., Pegourie, B., Dorvaux, V., ... Kraeber-Bodere, F. (2017). Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography at Diagnosis and Before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients With Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial: Results of the IMAJEM Study. *Journal of Clinical Oncology*, 35(25), 2911–2918. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.2975>

Moreau, Philippe, Attal, M., & Facon, T. (2015). Frontline therapy of multiple myeloma. In *Blood* (Vol. 125, Issue 20, pp. 3076–3084). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-568915>

Moreau, Philippe, Attal, M., Hulin, C., Arnulf, B., Belhadj, K., Benboubker, L., Béné, M. C., Broijl, A., Caillon, H., Caillot, D., Corre, J., Delforge, M., Dejoie, T., Doyen, C., Facon, T., Sonntag, C., Fontan, J., Garderet, L., Jie, K. S., ... Sonneveld, P. (2019). Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*, 394(10192), 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31240-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31240-1)

Moreau, Philippe, Facon, T., Attal, M., Hulin, C., Michallet, M., Maloisel, F., Sotto, J.-J., Guilhot, F., Marit, G., Doyen, C., Jaubert, J., Fuzibet, J.-G., François, S., Benboubker, L., Monconduit, M., Voillat, L., Macro, M., Berthou, C., Dorvaux, V., ... Intergroupe Francophone du Myélome. (2002). Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myélome 9502 randomized trial. *Blood*, 99(3), 731–735. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.731>

Moreau, Philippe, Hulin, C., Macro, M., Caillot, D., Chaleteix, C., Roussel, M., Garderet, L., Royer, B., Brechignac, S., Tiab, M., Puyade, M., Escoffre, M., Stoppa, A. M., Facon, T., Pegourie, B., Chaoui, D., Jaccard, A., Slama, B., Marit, G., ... Attal, M. (2016). VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: Results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood*, 127(21), 2569–2574. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-693580>

Moreau, Philippe, Masszi, T., Grzasko, N., Bahlis, N. J., Hansson, M., Pour, L., Sandhu, I., Ganly, P., Baker, B. W., Jackson, S. R., Stoppa, A.-M., Simpson, D. R., Gimsing, P., Palumbo, A., Garderet, L., Cavo, M., Kumar, S., Touzeau, C., Buadi, F. K., ... Richardson, P. G. (2016). Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 374(17), 1621–1634. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516282>

Morgan, G. J., Davies, F. E., Gregory, W. M., Russell, N. H., Bell, S. E., Szubert, A. J., Coy, N. N., Cook, G., Feyler, S., Byrne, J. L., Roddie, H., Rudin, C., Drayson, M. T., Owen, R. G., Ross, F. M., Jackson, G. H., & Child, J. A. (2011). Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone (CTD) as initial therapy for patients with multiple myeloma unsuitable for autologous transplantation. *Blood*, *118*(5), 1231–1238. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338665>

Morgan, G. J., Walker, B. A., & Davies, F. E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, *12*(5), 335–348. <https://doi.org/10.1038/nrc3257>

Munshi, N. C., Avet-Loiseau, H., Rawstron, A. C., Owen, R. G., Child, J. A., Thakurta, A., Sherrington, P., Samur, M. K., Georgieva, A., Anderson, K. C., & Gregory, W. M. (2017). Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: A meta-analysis. *JAMA Oncology*, *3*(1), 28–35. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3160>

Ocio, E. M., Richardson, P. G., Rajkumar, S. V., Palumbo, A., Mateos, M. V., Orłowski, R., Kumar, S., Usmani, S., Roodman, D., Niesvizky, R., Einsele, H., Anderson, K. C., Dimopoulos, M. A., Avet-Loiseau, H., Mellqvist, U. H., Turesson, I., Merlini, G., Schots, R., McCarthy, P., ... Miguel, J. F. S. (2014). New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: A report from the International Myeloma Working Group (IMWG). In *Leukemia* (Vol. 28, Issue 3, pp. 525–542). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.350>

Ocqueteau, M., Orfao, A., García-Sanz, R., Almeida, J., Gonzalez, M., & San Miguel, J. F. (1996). Expression of the CD117 antigen (C-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *British Journal of Haematology*, *95*(3), 489–493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1996.tb08993.x>

Ocqueteau, Mauricio, Orfao, A., Almeida, J., Bladé, J., González, M., García-Sanz, R., López-Berges, C., Moro, M. J., Hernández, J., Escribano, L., Caballero, D., Rozman, M., & San Miguel, J. F. (1998). Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients: Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *American Journal of Pathology*, *152*(6), 1655–1665.

Oliva, S., D'Agostino, M., Boccadoro, M., & Larocca, A. (2020). Clinical Applications and Future Directions of Minimal Residual Disease Testing in Multiple Myeloma. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00001>

Oliva, S., Gambella, M., Larocca, A., Spada, S., Marzanati, E., Mantoan, B., Grammatico, S., Conticello, C., Gamberi, B., Offidani, M., Liberati, A. M., Pautasso, C., Omedè, P., Palumbo, A., & Boccadoro, M. (2016). Prognostic Impact of Minimal Residual Disease By ASO-RQ-PCR in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of 2 Phase III Studies in Patients Treated with Lenalidomide after Front-Line Therapy. *Blood*, *128*(22), 4409–4409. <https://doi.org/10.1182/blood.v128.22.4409.4409>

Oliva, S., Hofste op Bruinink, D., Říhová, L., Spada, S., van der Holt, B., Troia, R., Gambella, M., Pantani, L., Grammatico, S., Gilestro, M., Offidani, M., Ribolla, R., Galli, M., Hajek, R., Palumbo, A., Cavo, M., Omedè, P., van der Velden, V., Boccadoro, M., & Sonneveld, P. (2017). Minimal residual disease (MRD) monitoring by multiparameter flow cytometry (MFC) in newly diagnosed transplant eligible multiple myeloma (MM) patients: Results from the EMN02/HO95 phase 3 trial. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(15_suppl), 8011–8011. https://doi.org/10.1200/jco.2017.35.15_suppl.8011

Paino, T., Paiva, B., Sayagues, J. M., Mota, I., Carvalheiro, T., Corchete, L. A., Aires-Mejia, I., Perez, J. J., Sanchez, M. L., Barcena, P., Ocio, E. M., San-Segundo, L., Sarasquete, M. E., Garcia-Sanz, R., Vidriales, M. B., Oriol, A., Hernandez, M. T., Echeveste, M. A., Paiva, A., ... San-Miguel, J. F. (2015). Phenotypic identification of subclones in multiple myeloma with different chemoresistant, cytogenetic and clonogenic

potential. *Leukemia*, 29(5), 1186–1194. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.321> [doi]

Paiva, B., Azpilikueta, A., Puig, N., Ocio, E. M., Sharma, R., Oyajobi, B. O., Labiano, S., San-Segundo, L., Rodriguez, A., Aires-Mejia, I., Rodriguez, I., Escalante, F., De Coca, A. G., Barez, A., San Miguel, J. F., & Melero, I. (2015). PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. In *Leukemia* (Vol. 29, Issue 10, pp. 2110–2113). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.79>

Paiva, B., Cedena, M. T., Puig, N., Arana, P., Vidriales, M. B., Cordon, L., Flores-Montero, J., Gutierrez, N. C., Martin-Ramos, M. L., Martinez-Lopez, J., Ocio, E. M., Hernandez, M. T., Teruel, A. I., Rosinol, L., Echeveste, M. A., Martinez, R., Gironella, M., Oriol, A., Cabrera, C., ... Groups, G. E. de M. para el E. de la T. en H. M. (GEM/PETHEMA) C. S. (2016). Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood*, 127(25), 3165–3174. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705319> [doi]

Paiva, B., Corchete, L. A., Vidriales, M. B., Puig, N., Maiso, P., Rodriguez, I., Alignani, D., Burgos, L., Sanchez, M. L., Barcena, P., Echeveste, M. A., Hernandez, M. T., Garcia-Sanz, R., Ocio, E. M., Oriol, A., Gironella, M., Palomera, L., De Arriba, F., Gonzalez, Y., ... Groups, S. M. G. / P. for the S. of M. B. D. T. (GEM / P. C. S. (2016). Phenotypic and genomic analysis of multiple myeloma minimal residual disease tumor cells: a new model to understand chemoresistance. *Blood*, 127(15), 1896–1906. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-665679> [doi]

Paiva, B., Gutierrez, N. C., Chen, X., Vidriales, M. B., Montalban, M. A., Rosinol, L., Oriol, A., Martinez-Lopez, J., Mateos, M. V, Lopez-Corral, L., Diaz-Rodriguez, E., Perez, J. J., Fernandez-Redondo, E., de Arriba, F., Palomera, L., Bengoechea, E., Terol, M. J., de Paz, R., Martin, A., ... cooperative, G. E. M. (Grupo E. de M. (Programa para el E. de la T. en H. M. (2012). Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia*, 26(8), 1862–1869. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.42> [doi]

Paiva, B., Martinez-Lopez, J., Vidriales, M. B., Mateos, M. V, Montalban, M. A., Fernandez-Redondo, E., Alonso, L., Oriol, A., Teruel, A. I., de Paz, R., Larana, J. G., Bengoechea, E., Martin, A., Mediavilla, J. D., Palomera, L., de Arriba, F., Blade, J., Orfao, A., Lahuerta, J. J., & San Miguel, J. F. (2011). Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(12), 1627–1633. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.1967> [doi]

Paiva, B., Paino, T., Sayagues, J. M., Garayoa, M., San-Segundo, L., Martin, M., Mota, I., Sanchez, M. L., Barcena, P., Aires-Mejia, I., Corchete, L., Jimenez, C., Garcia-Sanz, R., Gutierrez, N. C., Ocio, E. M., Mateos, M. V, Vidriales, M. B., Orfao, A., & San Miguel, J. F. (2013). Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*, 122(22), 3591–3598. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-510453> [doi]

Paiva, B., Puig, N., Cedena, M. T., de Jong, B. G., Ruiz, Y., Rapado, I., Martinez-Lopez, J., Cordon, L., Alignani, D., Delgado, J. A., van Zelm, M. C., Van Dongen, J. J., Pascual, M., Agirre, X., Prosper, F., Martin-Subero, J. I., Vidriales, M. B., Gutierrez, N. C., Hernandez, M. T., ... San-Miguel, J. F. (2017). Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia*, 31(2), 382–392. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.211> [doi]

Paiva, B., van Dongen, J. J., & Orfao, A. (2015). New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*, 125(20), 3059–3068. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-568907> [doi]

Paiva, B., Vidriales, M.-B., Rosiñol, L., Martínez-López, J., Mateos, M.-V., Ocio, E. M.,

Montalbán, M.-Á., Cordon, L., Gutiérrez, N. C., Corchete, L., Oriol, A., Terol, M.-J., Echeveste, M.-A., De Paz, R., De Arriba, F., Palomera, L., de la Rubia, J., Díaz-Mediavilla, J., Granell, M., ... Grupo Español de MM/Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas Cooperative Study Group. (2013). A multiparameter flow cytometry immunophenotypic algorithm for the identification of newly diagnosed symptomatic myeloma with an MGUS-like signature and long-term disease control. *Leukemia*, 27(10), 2056–2061. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.166>

Paiva, B., Vidriales, M. B., Cervero, J., Mateo, G., Perez, J. J., Montalban, M. A., Sureda, A., Montejano, L., Gutierrez, N. C., Garcia de Coca, A., de Las Heras, N., Mateos, M. V., Lopez-Berges, M. C., Garcia-Boyer, R., Galende, J., Hernandez, J., Palomera, L., Carrera, D., Martinez, R., ... Groups, G. E. M. (Grupo E. de M. (Programa para el E. de la T. en H. M. C. S. (2008). Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*, 112(10), 4017–4023. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-159624> [doi]

Paiva, Bruno, Almeida, J., Pérez-Andrés, M., Mateo, G., López, A., Rasillo, A., Vídriales, M.-B., López-Berges, M.-C., Miguel, J. F. S., & Orfao, A. (2010). Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78(4), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20512>

Paiva, Bruno, Gutiérrez, N. C., Rosiñol, L., Vídriales, M. B., Montalbán, M. Á., Martínez-López, J., Mateos, M. V., Cibeira, M. T., Cordon, L., Oriol, A., Terol, M. J., Echeveste, M. A., De Paz, R., De Arriba, F., Palomera, L., De La Rubia, J., Díaz-Mediavilla, J., Sureda, A., Gorosquieta, A., ... San Miguel, J. F. (2012). High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood*, 119(3), 687–691. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-370460>

Paiva, Bruno, Puig, N., Cedena, M.-T., Rosiñol, L., Cordon, L., Vidriales, M.-B., Burgos, L., Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Lopez-Anglada, L., Maldonado, R., de la Cruz, J., Gutierrez, N. C., Calasanz, M.-J., Martin-Ramos, M.-L., Garcia-Sanz, R., Martinez-Lopez, J., Oriol, A., Blanchard, M.-J., ... Lahuerta, J.-J. (2019). Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, JCO.19.01231. <https://doi.org/10.1200/jco.19.01231>

Paiva, Bruno, Puig, N., García-Sanz, R., & San Miguel, J. F. (2015). Is this the time to introduce minimal residual disease in multiple myeloma clinical practice? In *Clinical Cancer Research* (Vol. 21, Issue 9, pp. 2001–2008). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2841>

Palumbo, A., & Anderson, K. (2011). Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 364(11), 1046–1060. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011442>

Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J. J., Facon, T., Bringhen, S., Gay, F., Attal, M., Passera, R., Spencer, A., Offidani, M., Kumar, S., Musto, P., Lonial, S., ... Moreau, P. (2015). Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, 33(26), 2863–2869. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2267>

Palumbo, A., Bringhen, S., Rossi, D., Cavalli, M., Larocca, A., Ria, R., Offidani, M., Patriarca, F., Nozzoli, C., Guglielmelli, T., Benevolo, G., Callea, V., Baldini, L., Morabito, F., Grasso, M., Leonardi, G., Rizzo, M., Falcone, A. P., Gottardi, D., ... Boccadoro, M. (2010). Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: A randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 28(34), 5101–5109. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.8216>

Palumbo, A., Cavallo, F., Gay, F., Di Raimondo, F., Ben Yehuda, D., Petrucci, M. T., Pezzatti, S., Caravita, T., Cerrato, C., Ribakovskiy, E., Genuardi, M., Cafro, A., Marcatti, M., Catalano, L., Offidani, M., Carella, A. M., Zamagni, E., Patriarca, F., Musto, P., ... Cavo, M. (2014). Autologous Transplantation and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 371(10), 895–905. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402888>

Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A. K., Masszi, T., Beksac, M., Spicka, I., Hungria, V., Munder, M., Mateos, M. V., Mark, T. M., Qi, M., Schecter, J., Amin, H., Qin, X., Deraedt, W., Ahmadi, T., Spencer, A., & Sonneveld, P. (2016). Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 375(8), 754–766. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606038>

Palumbo, A., Gay, F., Cavallo, F., Raimondo, F. D., Larocca, A., Hardan, I., Nagler, A., Petrucci, M. T., Hajek, R., Pezzatti, S., Delforge, M., Patriarca, F., Donato, F., Cerrato, C., Nozzoli, C., Yu, Z., Boccadifuoco, L., Caravita, T., Benevolo, G., ... Boccadoro, M. (2015). Continuous therapy versus fixed duration of therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(30), 3459–3466. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.2466>

Palumbo, A., Hajek, R., Delforge, M., Kropff, M., Petrucci, M. T., Catalano, J., Gisslinger, H., Wiktor-Jędrzejczak, W., Zodelava, M., Weisel, K., Cascavilla, N., Iosava, G., Cavo, M., Kloczko, J., Bladé, J., Beksac, M., Spicka, I., Plesner, T., Radke, J., ... Dimopoulos, M. A. (2012). Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 366(19), 1759–1769. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112704>

Pan, Y., Wang, H., Tao, Q., Zhang, C., Yang, D., Qin, H., Xiong, S., Tao, L., Wu, F., Zhang, J., & Zhai, Z. (2016). Absence of both CD56 and CD117 expression on malignant plasma cells is related with a poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia Research*, 40, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.11.003> [doi]

Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R. F., Marti, G. E., Rawstron, A. C., Van Zelm, M. C., Van Dongen, J. J. M., Johnsen, H. E., Klein, B., & Orfao, A. (2010). Human peripheral blood B-Cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. In *Cytometry Part B - Clinical Cytometry* (Vol. 78, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20547>

Pérez-Andrés, M., Santiago, M., Almeida, J., Mateo, G., Porwit-MacDonald, A., Bjorklund, E., Valet, G., Kraan, J., Gratama, J. W., D'Hautcourt, J. L., Merle-Beral, H., Lima, M., Montalban, M. A., San Miguel, J. F., Orfao, I., European Working Group on Clinical Cell Analysis, & Spanish Network on Multiple Myeloma. (n.d.). Immunophenotypic approach to the identification and characterization of clonal plasma cells from patients with monoclonal gammopathies. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 18(3–4), 392–398. Retrieved January 22, 2020, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15786710>

Perez-Andres, Martin, Almeida, J., Martin-Ayuso, M., De Las Heras, N., Moro, M. J., Martin-Nuñez, G., Galende, J., Cuello, R., Abuín, I., Moreno, I., Domínguez, M., Hernandez, J., Mateo, G., San Miguel, J. F., & Orfao, A. (2009). Soluble and membrane levels of molecules involved in the interaction between clonal plasma cells and the immunological microenvironment in multiple myeloma and their association with the characteristics of the disease. *International Journal of Cancer*, 124(2), 367–375. <https://doi.org/10.1002/ijc.23941>

Perrot, A., Lauwers-Cances, V., Corre, J., Robillard, N., Hulin, C., Chretien, M. L., Dejoie, T., Maheo, S., Stoppa, A. M., Pegourie, B., Karlin, L., Garderet, L., Arnulf, B., Doyen, C., Meuleman, N., Royer, B., Eveillard, J. R., Benboubker, L., Dib, M., ... Munshi, N. (2018). Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*, 132(23), 2456–2464. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06->

858613

Pessoa de Magalhaes, R. J., Vidriales, M. B., Paiva, B., Fernandez-Gimenez, C., Garcia-Sanz, R., Mateos, M. V., Gutierrez, N. C., Lecrevisse, Q., Blanco, J. F., Hernandez, J., de las Heras, N., Martinez-Lopez, J., Roig, M., Costa, E. S., Ocio, E. M., Perez-Andres, M., Maiolino, A., Nucci, M., De La Rubia, J., ... Grupo Castellano-Leones de Gammopatias Monoclonales, cooperative study groups. (2013). Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*, *98*(1), 79–86. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.067272> [doi]

Pönisch, W., Mitrou, P. S., Merkle, K., Herold, M., Assmann, M., Wilhelm, G., Dachsel, K., Richter, P., Schirmer, V., Schulze, A., Šubert, R., Harksel, B., Grobe, N., Stelzer, E., Schulze, M., Bittrich, A., Freund, M., Pasold, R., Friedrich, T., ... Niederwieser, D. (2006). Treatment of Bendamustine and Prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with Melphalan and Prednisone - A randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *132*(4), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00432-005-0074-4>

Puig, N., Sarasquete, M. E., Balanzategui, A., Martinez, J., Paiva, B., Garcia, H., Fumero, S., Jimenez, C., Alcoceba, M., Chillon, M. C., Sebastian, E., Marin, L., Montalban, M. A., Mateos, M. V., Oriol, A., Palomera, L., de la Rubia, J., Vidriales, M. B., Blade, J., ... Garcia-Sanz, R. (2014). Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*, *28*(2), 391–397. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.217> [doi]

Putkonen, M., Kairisto, V., Juvonen, V., Pelliniemi, T. T., Rauhala, A., Itala-Remes, M., & Remes, K. (2010). Depth of response assessed by quantitative ASO-PCR predicts the outcome after stem cell transplantation in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, *85*(5), 416–423. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2010.01510.x> [doi]

Raja, K. R. M., Kovarova, L., & Hajek, R. (2010). Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *British Journal of Haematology*, *149*(3), 334–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08121.x>

Rajan, A. M., & Rajkumar, S. V. (2015). Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer Journal*, *5*(10), e365. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.92>

Raje, N., Berdeja, J., Lin, Y., Siegel, D., Jagannath, S., Madduri, D., Liedtke, M., Rosenblatt, J., Maus, M. V., Turka, A., Lam, L. P., Morgan, R. A., Friedman, K., Massaro, M., Wang, J., Russotti, G., Yang, Z., Campbell, T., Hege, K., ... Kochenderfer, J. N. (2019). Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, *380*(18), 1726–1737. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817226>

Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., ... Miguel, J. F. S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, *15*(12), e538–e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)

Rajkumar, S. V., Harousseau, J.-L., Durie, B., Anderson, K. C., Dimopoulos, M., Kyle, R., Blade, J., Richardson, P., Orłowski, R., Siegel, D., Jagannath, S., Facon, T., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Palumbo, A., Zonder, J., Ludwig, H., Vesole, D., Sezer, O., ... International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. (2011). Consensus recommendations for the

uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*, 117(18), 4691–4695. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-299487>

Rajkumar, S. V., Mesa, R. A., Fonseca, R., Schroeder, G., Plevak, M. F., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Witzig, T. E., Gertz, M. A., Kyle, R. A., Russell, S. J., & Greipp, P. R. (2002). Bone Marrow Angiogenesis in 400 Patients with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Multiple Myeloma, and Primary Amyloidosis. *Clinical Cancer Research*, 8(7).

Rajkumar, S. V., Hayman, S. R., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Geyer, S. M., Kabat, B., Zeldenrust, S. R., Kumar, S., Greipp, P. R., Fonseca, R., Lust, J. A., Russell, S. J., Kyle, R. A., Witzig, T. E., & Gertz, M. A. (2005). Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*, 106(13), 4050–4053. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2817>

Ramos, C. A., Savoldo, B., Torrano, V., Ballard, B., Zhang, H., Dakhova, O., Liu, E., Carrum, G., Kamble, R. T., Gee, A. P., Mei, Z., Wu, M. F., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Brenner, M. K., Heslop, H. E., & Dotti, G. (2016). Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated κ light chains. *Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2588–2596. <https://doi.org/10.1172/JCI86000>

Rawstron, A C, Gregory, W. M., de Tute, R. M., Davies, F. E., Bell, S. E., Drayson, M. T., Cook, G., Jackson, G. H., Morgan, G. J., Child, J. A., & Owen, R. G. (2015). Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood*, 125(12), 1932–1935. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-590166> [doi]

Rawstron, Andy C., Child, J. A., de Tute, R. M., Davies, F. E., Gregory, W. M., Bell, S. E., Szubert, A. J., Navarro-Coy, N., Drayson, M. T., Feyler, S., Ross, F. M., Cook, G., Jackson, G. H., Morgan, G. J., & Owen, R. G. (2013). Minimal Residual Disease Assessed by Multiparameter Flow Cytometry in Multiple Myeloma: Impact on Outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *Journal of Clinical Oncology*, 31(20), 2540–2547. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.2119>

Rawstron, Andy C., Davies, F. E., DasGupta, R., Ashcroft, A. J., Patmore, R., Drayson, M. T., Owen, R. G., Jack, A. S., Child, J. A., & Morgan, G. J. (2002). Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*, 100(9), 3095–3100. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0297>

Rawstron, Andy C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdickova, L., Brooimans, R. A., Bumbea, H., Dalva, K., Fuhler, G., Gratama, J., Hose, D., Kovarova, L., Lioznov, M., Mateo, G., Morilla, R., Mylin, A. K., Omedé, P., Pellat-Deceunynck, C., Andres, M. P., Petrucci, M., ... Johnsen, H. E. (2008). Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. In *Haematologica* (Vol. 93, Issue 3, pp. 431–438). Haematologica Journal Office. <https://doi.org/10.3324/haematol.11080>

Richardson, P. G., Attal, M., Campana, F., Le-Guennec, S., Hui, A.-M., Risse, M.-L., Corzo, K., & Anderson, K. C. (2018). Isatuximab plus pomalidomide/dexamethasone versus pomalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: ICARIA Phase III study design. *Future Oncology*, 14(11), 1035–1047. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0616>

Richardson, P. G., Blood, E., Mitsiades, C. S., Jagannath, S., Zeldenrust, S. R., Alsina, M., Schlossman, R. L., Rajkumar, S. V., Desikan, K. R., Hideshima, T., Munshi, N. C., Kelly-Colson, K., Doss, D., McKenney, M. L., Gorelik, S., Warren, D., Freeman, A., Rich, R., Wu, A., ... Anderson, K. C. (2006). A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 108(10), 3458–3464. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015909>

Richardson, P. G., Sonneveld, P., Schuster, M. W., Irwin, D., Stadtmauer, E. A., Facon, T., Harousseau, J.-L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J. F., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W. S., Boral, A. L., Esseltine, D. L., Porter, J. B., ... Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. (2005). Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 352(24), 2487–2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043445>

Rio-Machin, A., Ferreira, B. I., Henry, T., Gómez-López, G., Agirre, X., Alvarez, S., Rodríguez-Perales, S., Prosper, F., Calasanz, M. J., Martínez, J., Fonseca, R., & Cigudosa, J. C. (2013). Downregulation of specific miRNAs in hyperdiploid multiple myeloma mimics the oncogenic effect of IgH translocations occurring in the non-hyperdiploid subtype. *Leukemia*, 27(4), 925–931. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.302>

Robillard, N., Wuillème, S., Moreau, P., & Béné, M. C. (2014). Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. *Frontiers in Immunology*, 5(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00137>

Roccaro, A. M., Sacco, A., Thompson, B., Leleu, X., Azab, A. K., Azab, F., Runnels, J., Jia, X., Ngo, H. T., Melhem, M. R., Lin, C. P., Ribatti, D., Rollins, B. J., Witzig, T. E., Anderson, K. C., & Ghobrial, I. M. (2009). MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*, 113(26), 6669–6680. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-198408>

Roodman, G. D. (1997). Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer*, 80(8 Suppl), 1557–1563. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19971015\)80:8+<1557::aid-cnrcr5>3.3.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19971015)80:8+<1557::aid-cnrcr5>3.3.co;2-k)

Roshal, M., Flores-Montero, J. A., Gao, Q., Koeber, M., Wardrope, J., Durie, B. G. M., Dogan, A., Orfao, A., & Landgren, O. (2017). MRD detection in multiple myeloma: Comparison between MSKCC 10-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube methods. *Blood Advances*, 1(12), 728–732. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016003715>

Rosiñol, L., Oriol, A., Rios, R., Sureda, A., Blanchard, M. J., Hernández, M. T., Martínez-Martínez, R., Moraleta, J. M., Jarque, I., Bargay, J., Gironella, M., De Arriba, F., Palomera, L., González-Montes, Y., Martí, J. M., Krsnik, I., Arguiñano, J. M., González, M. E., González, A. P., ... Bladé, J. (2019). Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone as induction therapy prior to autologous transplant in multiple myeloma. *Blood*, 134(16), 1337–1345. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000241>

Rosiñol, L., Oriol, A., Teruel, A. I., Hernández, D., López-Jiménez, J., de la Rubia, J., Granel, M., Besalduch, J., Palomera, L., González, Y., Etxebeste, M. A., Díaz-Mediavilla, J., Hernández, M. T., de Arriba, F., Gutiérrez, N. C., Martín-Ramos, M. L., Cibeira, M. T., Mateos, M. V., Martínez, J., ... Programa para el Estudio y la Terapéutica de las Hemopatías Malignas/Grupo Español de Mieloma (PETHEMA/GEM) group. (2012). Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood*, 120(8), 1589–1596. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-408922>

Roussel, M., Lauwers-Cances, V., Robillard, N., Hulin, C., Leleu, X., Benboubker, L., Marit, G., Moreau, P., Pegourie, B., Caillot, D., Fruchart, C., Stoppa, A. M., Gentil, C., Wuilleme, S., Huynh, A., Hebraud, B., Corre, J., Chretien, M. L., Facon, T., ... Attal, M. (2014). Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the Intergroupe Francophone du Myelo. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(25), 2712–2717. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.8164> [doi]

Royston, D. J., Gao, Q., Nguyen, N., Maslak, P., Dogan, A., & Roshal, M. (2016). Single-

Tube 10-Fluorochrome Analysis for Efficient Flow Cytometric Evaluation of Minimal Residual Disease in Plasma Cell Myeloma. *American Journal of Clinical Pathology*, 146(1), 41–49. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw052>

San-Miguel, J. F., Hungria, V. T., Yoon, S. S., Beksac, M., Dimopoulos, M. A., Elghandour, A., Jedrzejczak, W. W., Gunther, A., Nakorn, T. N., Siritanaratkul, N., Corradini, P., Chuncharunee, S., Lee, J. J., Schlossman, R. L., Shelekhova, T., Yong, K., Tan, D., Numbenjapon, T., Cavenagh, J. D., ... Richardson, P. G. (2014). Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *The Lancet.Oncology*, 15(11), 1195–1206. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70440-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70440-1) [doi]

San Miguel, J. F., Caballero, M. D., Gonzalez, M., Zola, H., & Borrasca, A. L. (1986). Immunological phenotype of neoplasms involving the B cell in the last step of differentiation. *British Journal of Haematology*, 62(1), 75–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1986.tb02902.x>

San Miguel, J., Weisel, K., Moreau, P., Lacy, M., Song, K., Delforge, M., Karlin, L., Goldschmidt, H., Banos, A., Oriol, A., Alegre, A., Chen, C., Cavo, M., Garderet, L., Ivanova, V., Martinez-Lopez, J., Belch, A., Palumbo, A., Schey, S., ... Dimopoulos, M. (2013). Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet.Oncology*, 14(11), 1055–1066. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70380-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70380-2) [doi]

San Miguel, J. F., Almeida, J., Mateo, G., Bladé, J., López-Berges, C., Caballero, D., Hernández, J., Moro, M. J., Fernández-Calvo, J., Díaz-Mediavilla, J., Palomera, L., & A., O. (2002). Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*, 99, 1853–1856.

San Miguel, Jesús F., Schlag, R., Khuageva, N. K., Dimopoulos, M. A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M. T., Palumbo, A., Samoilova, O. S., Dmoszynska, A., Abdulkadyrov, K. M., Schots, R., Jiang, B., Mateos, M.-V., Anderson, K. C., Esseltine, D. L., Liu, K., Cakana, A., ... VISTA Trial Investigators. (2008). Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for Initial Treatment of Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 359(9), 906–917. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0801479>

Sanoja-Flores, L., Flores-Montero, J., Puig, N., Contreras-Sanfeliciano, T., Pontes, R., Corral-Mateos, A., García-Sánchez, O., Díez-Campelo, M., de Magalhães, R. J. P., García-Martín, L., Alonso-Alonso, J. M., García-Mateo, A., Aguilar-Franco, C., Labrador, J., Barez-García, A., Maiolino, A., Paiva, B., Miguel, J. S., da Costa, E. S., ... Orfao, A. (2019). Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy. In *Blood* (Vol. 134, Issue 24, pp. 2218–2222). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002610>

Sarasquete, M. E., García-Sanz, M., González, D., J., M., Mateo, G., Martínez, P., Ribera, J. M., Hernández, J. M., Lahuerta, J. J., Orfao, A., González, M., & San Miguel, J. F. (2005). Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Hematologica*, 90(10), 1365–1372.

Schmidt-Hieber, M., Perez-Andres, M., Paiva, B., Flores-Montero, J., Perez, J. J., Gutierrez, N. C., Vidriales, M. B., Matarraz, S., San Miguel, J. F., & Orfao, A. (2011). CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica*, 96(2), 328–332. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031872> [doi]

Schmidt-Hieber, Martin, Paiva, B., Perez-Andres, M., Gutierrez, M. L., Dybkaer, K.,

- Rasillo, A., Tabernero, M. D., Lopez, A., Kryukov, F., Carrasco, P., Sanchez, M. L., Rosiñol, L., Lopez, J. M., Consultant, Oriol, A., de Arriba, F., Palomera, L., Bengoechea, E., Lahuerta, J. J., ... Orfao, A. (2013). CD56+ Clonal Plasma Cells In Multiple Myeloma Are Associated With Unique Disease Characteristics and Have a Counterpart Of CD56+ Normal Plasma Cells With Increased Maturity. *Blood*, *122*(21), 751–751. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V122.21.751.751>
- Shah, J. J., Kaufman, J. L., Zonder, J. A., Cohen, A. D., Bensinger, W. I., Hilder, B. W., Rush, S. A., Walker, D. H., Tunquist, B. J., Litwiler, K. S., Ptaszynski, M., Orlowski, R. Z., & Lonial, S. (2017). A Phase 1 and 2 study of Filanesib alone and in combination with low-dose dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Cancer*, *123*(23), 4617–4630. <https://doi.org/10.1002/cncr.30892>
- Sheth, N., Yeung, J., & Chang, H. (2009). p53 nuclear accumulation is associated with extramedullary progression of multiple myeloma. *Leukemia Research*, *33*(10), 1357–1360. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.01.010>
- Short, K. D., Rajkumar, S. V., Larson, D., Buadi, F., Hayman, S., Dispenzieri, A., Gertz, M., Kumar, S., Mikhael, J., Roy, V., Kyle, R. A., & Lacy, M. Q. (2011). Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma. *Leukemia*, *25*(6), 906–908. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.29>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *66*(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>
- Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., Zeldis, J., Siegel, D., Crowley, J., & Barlogie, B. (1999). Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, *341*(21), 1565–1571. <https://doi.org/10.1056/NEJM199911183412102>
- Sonneveld, P., Schmidt-Wolf, I. G. H., van der Holt, B., el Jarari, L., Bertsch, U., Salwender, H., Zweegman, S., Vellenga, E., Broyl, A., Blau, I. W., Weisel, K. C., Wittebol, S., Bos, G. M. J., Stevens-Kroef, M., Scheid, C., Pfreundschuh, M., Hose, D., Jauch, A., van der Velde, H., ... Goldschmidt, H. M. (2012). Bortezomib Induction and Maintenance Treatment in Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Results of the Randomized Phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 Trial. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(24), 2946–2955. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.6820>
- Spencer, A., Lentzsch, S., Weisel, K., Avet-Loiseau, H., Mark, T. M., Spicka, I., Masszi, T., Lauri, B., Levin, M. D., Bosi, A., Hungria, V., Cavo, M., Lee, J. J., Nooka, A. K., Quach, H., Lee, C., Barreto, W., Corradini, P., Min, C. K., ... Mateos, M. V. (2018). Daratumumab plus bortezomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: Updated analysis of CASTOR. *Haematologica*, *103*(12), 2079–2087. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.194118>
- Stadtmauer, E. A., Pasquini, M. C., Blackwell, B., Hari, P., Bashey, A., Devine, S., Efebera, Y., Ganguly, S., Gasparetto, C., Geller, N., Horowitz, M. M., Koreth, J., Knust, K., Landau, H., Brunstein, C., McCarthy, P., Nelson, C., Qazilbash, M. H., Shah, N., ... Krishnan, A. (2019). Autologous transplantation, consolidation, and maintenance therapy in multiple myeloma: Results of the BMT CTN 0702 trial. *Journal of Clinical Oncology*, *37*(7), 589–597. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00685>
- Stetler-Stevenson, M., Paiva, B., Stoolman, L., Lin, P., Jorgensen, J. L., Orfao, A., Van Dongen, J., & Rawstron, A. C. (2016). Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *90*(1), 26–30. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21249>
- Stewart, A. K., Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Masszi, T., Špička, I., Oriol, A., Hájek, R., Rosiñol, L., Siegel, D. S., Mihaylov, G. G., Goranova-Marinova, V., Rajnics, P.,

Suvorov, A., Niesvizky, R., Jakubowiak, A. J., San-Miguel, J. F., Ludwig, H., Wang, M., Maisnar, V., ... Palumbo, A. (2015). Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 372(2), 142–152. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411321>

Takamatsu, H., Takezako, N., Zheng, J., Moorhead, M., Carlton, V. E. H., Kong, K. A., Murata, R., Ito, S., Miyamoto, T., Yokoyama, K., Matsue, K., Sato, T., Kurokawa, T., Yagi, H., Terasaki, Y., Ohata, K., Matsumoto, M., Yoshida, T., Faham, M., & Nakao, S. (2017). Prognostic value of sequencing-based minimal residual disease detection in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem-cell transplantation. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(10), 2503–2510. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx340>

Terpos, E., Kostopoulos, I. V., Kastritis, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Migkou, M., Rousakis, P., Argyriou, A. T., Kanellias, N., Fotiou, D., Eleutherakis-Papaiakovou, E., Gavriatopoulou, M., Ziogas, D. C., Papanota, A.-M., Spyropoulou-Vlachou, M., Trougkos, I. P., Tsitsilonis, O. E., Paiva, B., & Dimopoulos, M. A. (2019). Impact of Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma Patients with Sustained Complete Remission after Frontline Therapy. *HemaSphere*, 3(6), e300. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000300>

Terstappen, L. W., Johnsen, S., Segers-Nolten, I. M., & Loken, M. R. (1990). Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood*, 76(9), 1739–1747. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2224123>

Thoren, K. L. (2018). Mass spectrometry methods for detecting monoclonal immunoglobulins in multiple myeloma minimal residual disease. In *Seminars in Hematology* (Vol. 55, Issue 1, pp. 41–43). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.02.008>

Topp, M. S., Duell, J., Zugmaier, G., Attal, M., Moreau, P., Langer, C., Kroenke, J., Facon, T., Salnikow, A., Lesley, R., Beutner, K., Kalabus, J., Rasmussen, E., Riemann, K., Minella, A. C., Munzert, G. M., & Einsele, H. (2019). Evaluation of AMG 420, an anti-BCMA bispecific T-cell engager (BiTE) immunotherapy, in R/R multiple myeloma (MM) patients: Updated results of a first-in-human (FIH) phase I dose escalation study. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15_suppl), 8007–8007. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.8007

Usmani, S. Z., Heuck, C., Mitchell, A., Szymonifka, J., Nair, B., Hoering, A., Alsayed, Y., Waheed, S., Haider, S., Restrepo, A., Van Rhee, F., Crowley, J., & Barlogie, B. (2012). Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica*, 97(11), 1761–1767. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.065698>

Usmani, S. Z., Weiss, B. M., Plesner, T., Bahlis, N. J., Belch, A., Lonial, S., Lokhorst, H. M., Voorhees, P. M., Richardson, P. G., Chari, A., Sasser, A. K., Axel, A., Feng, H., Uhlar, C. M., Wang, J., Khan, I., Ahmadi, T., & Nahi, H. (2016). Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*, 128(1), 34–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705210>

van Dongen, J. J. M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H. J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., de Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A. W., Mendonça, A., ... EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908–1975. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>

Varettoni, M., Corso, A., Pica, G., Mangiacavalli, S., Pascutto, C., & Lazzarino, M. (2010). Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple

myeloma: a longitudinal study on 1003 consecutive patients. *Annals of Oncology*, 21(2), 325–330. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp329>

Vincent Rajkumar, S. (2014). Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 89(10), 999–1009. <https://doi.org/10.1002/ajh.23810>

Walker, B. A., Boyle, E. M., Wardell, C. P., Murison, A., Begum, D. B., Dahir, N. M., Proszek, P. Z., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Melchor, L., Aronson, L. I., Scales, M., Pawlyn, C., Mirabella, F., Jones, J. R., Brioli, A., Mikulasova, A., Cairns, D. A., Gregory, W. M., ... Morgan, G. J. (2015). Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(33), 3911–3920. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1503>

Walker, B. A., Mavrommatis, K., Wardell, C. P., Ashby, T. C., Bauer, M., Davies, F., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., Samur, M., Towfic, F., Ortiz, M., Flynt, E., Yu, Z., Yang, Z., Rozelle, D., Obenauer, J., Trotter, M., ... Morgan, G. (2019). A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia*, 33(1), 159–170. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0196-8>

Wang, Z., Wu, Z., Liu, Y., & Han, W. (2017). New development in CAR-T cell therapy. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 10, Issue 1, p. 53). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0423-1>

Wijdenes, J., Vooijs, W. C., Clément, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R. X., Klein, B., & Dore, J. M. (1996). A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *British Journal of Haematology*, 94(2), 318–323. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1811.x>

Xu, J., Chen, L. J., Yang, S. S., Sun, Y., Wu, W., Liu, Y. F., Xu, J., Zhuang, Y., Zhang, W., Weng, X. Q., Wu, J., Wang, Y., Wang, J., Yan, H., Xu, W. Bin, Jiang, H., Du, J., Ding, X. Y., Li, B., ... Chen, S. J. (2019). Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9543–9551. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819745116>

Yang, Y., Børset, M., Langford, J. K., & Sanderson, R. D. (2003). Heparan sulfate regulates targeting of syndecan-1 to a functional domain on the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12888–12893. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209440200>

Zamagni, E., & Cavo, M. (2012). The role of imaging techniques in the management of multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 159(5), 499–513. <https://doi.org/10.1111/bjh.12007> [doi]

Zamagni, Elena, Patriarca, F., Nanni, C., Zannetti, B., Englaro, E., Pezzi, A., Tacchetti, P., Buttignol, S., Perrone, G., Brioli, A., Pantani, L., Terragna, C., Carobolante, F., Baccarani, M., Fanin, R., Fanti, S., & Cavo, M. (2011). Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood*, 118(23), 5989–5995. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-361386>

Zeijlemaker, W., Gratama, J. W., & Schuurhuis, G. J. (2013). Tumor heterogeneity makes AML a “moving target” for detection of residual disease. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/cytob.21134>

Zhang, E., & Xu, H. (2017). A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–11). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0379-6>

Zhao, W.-H., Liu, J., Wang, B.-Y., Chen, Y.-X., Cao, X.-M., Yang, Y., Zhang, Y.-L., Wang, F.-X., Zhang, P.-Y., Lei, B., Gu, L.-F., Wang, J.-L., Yang, N., Zhang, R., Zhang, H., Shen, Y., Bai, J., Xu, Y., Wang, X.-G., ... Zhang, W.-G. (2018). Updated Analysis of a Phase 1, Open-Label Study of LCAR-B38M, a Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Directed Against B-Cell Maturation Antigen, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*, 132(Supplement 1), 955–955. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110548>

Zweegman, S., Van Der Holt, B., Mellqvist, U. H., Salomo, M., Bos, G. M. J., Levin, M. D., Visser-Wisselaar, H., Hansson, M., Van Der Velden, A. W. G., Deenik, W., Gruber, A., Coenen, J. L. L. M., Plesner, T., Klein, S. K., Tanis, B. C., Szatkowski, D. L., Brouwer, R. E., Westerman, M., Leys, M. R. B. L., ... Waage, A. (2016). Melphalan, prednisone, and lenalidomide versus melphalan, prednisone, and thalidomide in untreated multiple myeloma. *Blood*, 127(9), 1109–1116. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679415>

ANEXO

A continuación se adjuntan los artículos publicados derivados de esta tesis doctoral:

Paiva, B, Cedena MT, Puig N, Arana P, Vidriales MB, Cordon L, Flores-Montero J, Gutierrez NC, Martín-Ramos ML, Martínez-Lopez J, Ocio EM, Hernandez MT, Teruel AI, Rosiñol L, Echeveste MA, Martínez R, Gironella M, Oriol A, Cabrera C, Martín J, Bargay J, Encinas C, Gonzalez Y, Van Dongen JJ, Orfao A, Bladé J, Mateos MV, Lahuerta JJ, San Miguel JF. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood*, 2016, 127(25), 3165–3174. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705319> [doi]

Arana P, Paiva B, Cedena MT, Puig N, Cordon L, Vidriales MB, Gutierrez NC, Chiodi F, Burgos L, Anglada LL, Martínez-Lopez J, Hernandez MT, Teruel AI, Gironella M, Echeveste MA, Rosiñol L, Martínez R, Oriol A, De la Rubia J, Orfao A, Blade J, Lahuerta JJ, Mateos MV, San Miguel JF. Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: a PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials. *Leukemia*, 2018, 32(4):971-978. <https://doi: 10.1038/leu.2017.320>.

