

Artículo original

Evaluación de desbalances genómicos en desórdenes de células plasmáticas

Evaluation of genomic imbalances in plasma cell disorders

Leticia Giselle Guasch^{1,2}, Silvia Zurita^{1,3}, Lucas Lannutti¹, Francisco Pantuso¹, Irma Slavutsky², Flavia Stella^{1,3}

¹Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Morón.

²Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina.

³Área de Genética, Servicio de Anatomía patológica, Hospital Posadas.

Manuscrito recibido: 05 de agosto de 2020; aceptado para publicación: 18 de noviembre de 2020

Autor de Contacto: Dra. Flavia Stella. Servicio de Genética. Hospital Posadas. Buenos Aires, Argentina.

E-mail: fla_stella@yahoo.com.ar

Resumen

Los desórdenes de células plasmáticas son neoplasias de células B, ampliamente heterogéneas. Los estudios genéticos han permitido identificar genes involucrados en la iniciación y progresión de estos desórdenes. Entre ellos, encontramos los rearrreglos del gen *MYC* y la delección de *CD27*. El objetivo del presente estudio fue evaluar ambos genes a nivel citogenético y citomolecular en pacientes con desórdenes de células plasmáticas. Se estudiaron un total de 100 casos, 82 con mieloma múltiple y 18 con gammapatía monoclonal de significado incierto. Los resultados se compararon con un grupo control de 55 pacientes con mieloma múltiple sin alteraciones genéticas. Todos los pacientes con gammapatía monoclonal mostraron cariotipo normal sin anomalías por FISH, en tanto que 87,1% de los casos con mieloma múltiple presentaron alteraciones. Adicionalmente, detectamos rearrreglos del gen *MYC* y delección de *CD27* en el 22,9% y el 28,1% de los pacientes, respectivamente. Los casos con *MYC* alterado mostraron valores elevados de calcemia y creatinina respecto de los casos sin anomalías de *MYC* y del grupo control. En tanto que los pacientes con delección de *CD27* presentaron valores elevados de lactato de hidrogenasa respecto de aquellos sin esta anomalía y del grupo control. Cabe destacar que ningún paciente con gammapatía monoclonal mostró alteraciones en los genes *MYC* y *CD27*, reforzando su rol en la transformación a mieloma múltiple. Nuestros resultados sugieren la importancia de poder incluir el análisis de ambos genes en el panel de estudios genéticos de mieloma múltiple al momento del diagnóstico tendiente a una mejor delineación clínico-biológica de esta entidad, contribuyendo a la caracterización genética de la misma.

Palabras clave: mieloma múltiple; gammapatía monoclonal; *MYC*; *CD27*

Abstract

Plasma cell disorders are widely heterogeneous B-cell neoplasms. The study of genetic alterations has allowed the definition of specific subgroups, and provided the basis for the identification of genes involved in the initiation and

DOI: <http://doi.org/10.34073/225>

progression of these entities. Among them, are the rearrangements of the MYC gene and the deletion of CD27. The objective of the present study was to evaluate MYC and CD27 alterations in patients with plasma cell disorders. The results were correlated with the prognostic factors and the clinical evolution of patients. A total of 100 patients, 82 with multiple myeloma and 18 with monoclonal gammopathy of uncertain significance were studied. Results were compared with a control group of 55 patients with multiple myeloma without genetic alterations. Among multiple myeloma cases, 87.1% showed chromosomal and/or cytomolecular alterations. Additionally, we detected rearrangements of MYC and deletion of CD27 gene in 22.9% and 28.1% of patients, respectively. Cases with MYC rearrangements showed increased levels of calcemia and creatinine with respect to patients without MYC abnormalities and the control group. Patients with CD27 deletion had increased lactate dehydrogenase values compared to those without this abnormality and the control group. It should be noted that both MYC rearrangements and CD27 deletion were not found in patients with monoclonal gammopathy, reinforcing their role in the transformation process to multiple myeloma. Our results suggest the importance to include the analysis of MYC and CD27 genes in the panel of genetic studies of multiple myeloma at diagnosis, in order to a better clinical-biological delineation of this entity, contributing to its genetic characterization.

Keywords: multiple myeloma; monoclonal gammopathy; MYC; CD27

Introducción

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B maduras caracterizada por una infiltración atípica de células plasmáticas (CP) en la médula ósea (MO) y la secreción de una proteína monoclonal, el componente M, en suero y/u orina, asociada a alta heterogeneidad clínica. Se origina a partir de un proceso de transformación de múltiples pasos con acumulación progresiva de eventos genéticos que favorecen la proliferación y expansión del clon maligno (Fonseca *et al.*, 2009; Rajkumar, 2020). El MM se encuentra generalmente precedido por una entidad precursora, la gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS), presente en más del 3% de la población general mayor de 50 años y con un riesgo medio de progresión a MM del 1% anual (Kyle *et al.*, 2010; Korde *et al.*, 2011). El estudio de las alteraciones genéticas ha permitido la definición de subgrupos específicos, y provisto las bases para la identificación de genes involucrados en la iniciación y progresión de estas entidades (González-Calle & Fonseca, 2017).

Diferentes estudios han demostrado que el análisis citogenético convencional en MM permite detectar alteraciones cromosómicas en el 30-40% de los casos, valores que alcanzan el 80% cuando se emplea la técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) (Fonseca *et al.*, 2009). En este contexto, a nivel cromosómico podemos distinguir anomalías primarias específicas, asociadas al desarrollo de la patología, presentes inclusive en estadios asintomáticos, y anomalías secundarias relacionadas a la progresión de la enfermedad (Fonseca *et al.*,

2009; Rajkumar, 2020). Las anomalías primarias permiten dividir a los pacientes en dos grandes grupos: hiperdiploides (42-45% de los casos) con ganancia de cromosomas, considerados de buen pronóstico, y no hiperdiploides (35-40%), con número modal variable, desde hipodiploide hasta pseudotetraploides, asociados a peor evolución clínica. Estos datos sustentan la existencia de dos caminos diferentes en la patogénesis del MM, habiéndose detectado asimismo, alta heterogeneidad en cada grupo de riesgo. Dentro del primer grupo, la ganancia de cromosomas no es al azar, siendo más frecuentes las trisomías de los pares 3, 5, 9, 11, 15, 19 y 21, con baja incidencia de alteraciones estructurales. En contraposición, los MM no hiperdiploides están asociados a translocaciones recurrentes que involucran el locus *IGH* (*Immunoglobulin Heavy Locus*) a nivel de 14q32 y cinco diferentes oncogenes: *FGFR3/MMSET* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 3/Multiple myeloma SET Domain*)(4p16), *CCND3* (*Cyclin D3*) (6p21), *CCND1* (*Cyclin D1*) (11q13), *MAF* (*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene*) (16q23) y *MAFB* (20q12) (Rajan & Rajkumar, 2015; Rajkumar 2016). Asimismo, existe un subgrupo de pacientes con cariotipos combinados (hiperploide con translocaciones 14q32) (10-15%), cuyo comportamiento a nivel clínico es heterogéneo. En cuanto a las anomalías secundarias, las mismas se encuentran en baja frecuencia en las entidades indolentes y están relacionadas con progresión de la enfermedad (Fonseca *et al.*, 2009; Rajkumar, 2020). Entre ellas encontramos la delección/monosomía del cromosoma 13 (45% de los

pacientes), la delección del brazo corto del cromosoma 17 a nivel de 17p13, lugar donde se ubica el gen *TP53* (*Tumor Protein P53*) (8-10%), las alteraciones del cromosoma 1: ganancia/amplificación del brazo largo involucrando fundamentalmente a la banda 1q21 (45-60%) y pérdida de parte del brazo corto particularmente a nivel de 1p32 (30-40%) (Chng et al, 2011; Stella et al, 2014; Rajkumar, 2016), y más recientemente la desregulación del oncogén *MYC* (*Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*)(8q24) (15%) (Chiecchio et al, 2009; Billecke et al. 2013; Walker et al, 2014) y las delecciones a nivel de 12p13.31, lugar donde mapea el gen *CD27* (*CD27 Molecule*)(Xie et al, 2008). Diferentes estudios han mostrado la participación del oncogén *MYC* en el desarrollo neoplásico. En la célula normal este gen participa activamente en diferentes procesos, entre ellos: supervivencia y proliferación celular, replicación del ADN (ácido desoxirribonucleico), síntesis proteica, metabolismo energético (Dang, 2012). En MM se pensó inicialmente que la activación de este gen era un evento tardío, no obstante, estudios posteriores observaron un aumento de su actividad asociada a la transición de MGUS a MM (Chiecchio et al., 2009; Chng et al, 2011). Su desregulación se observa en aproximadamente el 15% de los casos con MM al diagnóstico, llegando al 45% en los estadios avanzados, y se origina debido a translocaciones secundarias entre *MYC* y el locus *IGH* (50% de los casos) o rearrreglos que implican otros genes (Dib et al, 2008). Estudios recientes en líneas celulares de MM mostraron la presencia de rearrreglos complejos que ubicaban a *MYC* en la proximidad de *super-enhancers* que determinan su sobreexpresión (Affer et al., 2014; Walker et al., 2014). La correlación con la evolución clínica muestra que los pacientes con activación de *MYC* presentan enfermedad más agresiva y corta sobrevida (SV) (Chiecchio et al, 2009; Chng et al, 2011), siendo esta asociación más evidente en los pacientes con cariotipos hiperdiploides (Weinhold et al, 2016). En cuanto a las alteraciones a nivel de 12p13.31 lugar donde mapea el gen *CD27*, las primeras evidencias de alteraciones en este cromosoma surgen a partir del empleo de la técnica de *microarrays* que permitió evidenciar desbalances genómicos (ganancias y pérdidas de material cromosómico) en el 98% de los pacientes (Avet-Loiseau et al., 2009). Dicho gen pertenece a la superfamilia de receptores de necrosis tumoral y como otros miembros de esta familia, activa a la quinasa *JUN* (*Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit*) y a NF-

kB (*nuclear factor kappa B*) (Xie et al., 2008). *CD27* se expresa en un subgrupo de células B y puede mediar la apoptosis de células hematopoyéticas (Guikema et al., 2003). En MM, los niveles de *CD27* son heterogéneos, pudiendo detectarse una disminución de su expresión génica como consecuencia de la desregulación de la transcripción a nivel del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de *CD27* o debido a la delección de 12p (Morgan et al. 2006). Escasos estudios evaluaron el valor pronóstico del estatus de *CD27* en pacientes con MM, y sus resultados son contradictorios: mientras que diferentes autores lo asociaron a un pronóstico adverso y una corta sobrevida (Zhan et al, 2002; Guikema et al., 2003; Morgan et al, 2006; Alaterre et al., 2017), Jiang et al. (2012) sostienen que *CD27* podría no ser un marcador pronóstico por sí solo sino un indicador de inestabilidad cromosómica en MM.

En este contexto, en el presente trabajo se evaluaron a nivel citogenético y citomolecular los desbalances de 8q24, donde se ubica el gen *MYC*, y las delecciones del brazo corto del cromosoma 12, en pacientes con desórdenes de células plasmáticas, tanto indolentes como sintomáticos. Cabe destacar que no existen estudios aún en nuestro medio focalizados en el análisis específico de estos genes y sus alteraciones. Los resultados fueron correlacionados con los factores pronóstico y la evolución clínica de los pacientes, tendiente a delinear sus características específicas y lograr una mayor comprensión de los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de estas entidades.

Materiales y Métodos

1. Población estudiada

En el presente estudio se evaluaron 100 pacientes, 82 con MM y 18 con MGUS. Las muestras de MO fueron obtenidas por el médico hematólogo previa conformidad y consentimiento informado de los pacientes. Los estudios efectuados en este trabajo fueron evaluados y aprobados por el Comité de Docencia del Instituto de Medicina Experimental CONICET-Academia Nacional de Medicina (Resolución N° 20190322 CDB1), y por los Comités de Bioseguridad y Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina (Resolución: TI N°13000/19/x). Para los estadios clínicos se tuvo en cuenta la clasificación de Durie & Salmon (1975) y los criterios establecidos por el ISS (*International Staging System*) (Greipp et al., 2005).

2. Estudios citogenéticos y citomoleculares

Cultivo de médula ósea y análisis cromosómico: Se efectuó cultivo directo de MO y de 72 hs. sin estimular, en medio F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino y antibióticos. En todos los casos, luego de la incubación se adicionó Colchicina 0,1mg/ml durante 30-45 minutos (min), se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de solución hipotónica ClK 0,075 M durante 30 min a 37°C. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se procedió a los lavados con fijador alcohol metílico: ácido acético (3:1). El material fijado se extendió sobre portaobjetos, efectuándose el análisis con microscopio de luz directa.

Técnica de bandedo G: Los extendidos citogenéticos se incubaron a 37°C en una solución de tripsina al 1% en buffer fosfato durante un tiempo relacionado al envejecimiento del preparado, se colorearon con Wright y se procedió al análisis al microscopio. La interpretación del cariotipo se efectuó acorde a lo establecido en el *International System of Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2016). Se analizaron al menos 20 metafases por paciente.

Hibridación in situ por fluorescencia (FISH): Se realizó según los protocolos estipulados por los fabricantes. Luego de la hibridación se efectúan diferentes lavados acordes a la sonda utilizada y se contracolora con 10 µl de DAPI(4',6-diamidino 2-fenylindol). Se coloca cubreobjeto, se sella y se observa al microscopio de fluorescencia con filtros apropiados. Se utilizó el siguiente panel de sondas: locus específica OLE 13q14 RB1, OLE 17p13.1 TP53 e IGH 14q32 (LiVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina). Para la detección de rearrreglos del gen *MYC* se empleó la sonda Break apart OBA8q24 *MYC* (LiVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina), en tanto que para las deleciones del brazo corto del cromosoma 12 se empleó la sonda OLE12p13 CD27 (LiVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina). Para las sondas de secuencia específica se evaluaron al menos 200 núcleos interfásicos. El punto de corte de las mismas se estableció mediante el análisis de 10 controles que correspondieron a pacientes con diagnóstico de MGUS. Los puntos de corte obtenidos fueron: 3% para RB1, 5% para TP53, 2% para IGH, 3,8% para *CD27* y 3,9% para *MYC*. Las alteraciones estructurales de difícil interpretación se analizaron empleando sondas de todo el cromosoma, solas o combinadas (LiVE-LEXEL, Buenos Aires, Argentina), analizándose al menos 10 metafases con buena dispersión cromosómica.

3. Estudios moleculares

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de MO

anticoaguladas con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) utilizando el siguiente protocolo: Las muestras se lavaron con RCLB (*red cell lysis buffer*) hasta obtener un pellet de glóbulos blancos. Luego se agregaron entre 200 y 500 µl de buffer PK (*Proteinasa K*) y enzima PK (10 a 25 µl), seguido de centrifugación a 12000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10-20 min. Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de fenol: IAC (cloroformo e isopropanol en proporción 24:1), mezclando durante 5 min. La muestra se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se volvió a mezclar con IAC en proporción 1:1 y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Al sobrenadante se le añadió CINa 3 M (1:10) en solución de alcohol etílico y 1 y ½ volumen de alcohol etílico absoluto frío. La muestra se refrigeró a -20°C durante un período de 30 min a 24 hs. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó 1,5 volumen de alcohol etílico al 70%, se resuspendió y se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se descartó y la muestra de ADN se secó durante 30-35 min para evaporar el etanol. Por último, las muestras se resuspendieron en buffer TE (Tris-EDTA) o agua destilada estéril. Se evaluó la calidad y la concentración de todas las muestras de ADN extraídas mediante la utilización de un nanodrop.

Con el objetivo de evaluar la secuencia nucleotídica del gen *CD27*, se diseñaron *primers* que amplifiquen el promotor de dicho gen y los exones 1, 2 y 3. Para ello se obtuvo acceso a la secuencia de ADN (NC_000012.12) y ARNm (NM_001242.4) del repositorio NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/939>). Se empleó el programa Primer3 para la búsqueda de *primers* (<https://primer3plus.com/>). La temperatura de *melting* óptima se fijó en un rango de entre 53-62°C y se estableció una longitud del producto de PCR deseado entre 200-500pb. La secuencia de los *primers* fue la siguiente:

Forward 5´-TAATACTCTCCCAGCACACGGA-3´; Reverse
5´-CTTTCTGTGCCAGTTGCTGATG-3´

Se trabajó con el siguiente programa de PCR (*polymerase chain reaction*): 3 min a 95 °C (desnaturalización) seguida por un *hotstart* y un *touchdown* (para favorecer un pegado selectivo de *primers* de -1 °C por ciclo desde 60 a 53 °C; 28 ciclos de 45 segundos a 63 °C (hibridación de los primers), 1 min a 72 °C (extensión) y una extensión final de 5 min a 72 °C. La mix de reacción fue la siguiente: Buffer 5x: 5µl, dNTPS 10

mM: 0,5 μ l, Taq polimerasa 5 U/ μ l: 0,16 μ l, primer forward y reverse 10 μ M: 1,5 μ l, H₂O: 14,3 μ l, ADN 50 ng/ μ l: 2 μ l. Luego de efectuar la PCR, los productos se corrieron en gel de agarosa al 1%.

4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron correlacionados con las características clínicas de la patología tendiente a establecer su valor pronóstico. El análisis estadístico se efectuó utilizando el programa GraphPadPrism versión 6.0. El estudio comparativo de la distribución de las variables clínicas y los parámetros de laboratorio se efectuó mediante el test de Matt-Whitney y el test de t para las variables cuantitativas, y el test χ^2 o exacto

de Fisher para las variables categóricas. Se consideró como estadísticamente significativo un $p < 0,05$.

Resultados

Análisis citogenético y citomolecular

El análisis citogenético fue efectuado en un total de 18 pacientes con MGUS, mostrando todos ellos un cariotipo y FISH normal. De los 47 pacientes con MM estudiados mediante citogenética, 33 casos (70,2%) presentaron cariotipo normal (CN) en tanto que los 14 restantes (29,8%) mostraron anomalías cromosómicas, 8 de ellos con un cariotipo patológico simple (CS) (1 o 2 anomalías cromosómicas), en tanto que el resto presentaron cariotipo complejo (CC) (≥ 3 alteraciones cromosómicas) (**Tabla I**).

Tabla I: Características citogenéticas y citomoleculares de los pacientes con cariotipo simple (CS) y complejo (CC)

Nº de Caso	Edad/ Sexo	Cariotipo	FISH (%)		
			IGH	TP53	RB1
<i>Cariotipos simples</i>					
32	67/F	46,XX,del(6)(q21q23)[7]/46,XX[13]	0,3	-	1,2
33	62/F	46,XX,del(17)(p1?2)[2]/46,XX[25]	2,0	9,3	4,4
34	56/M	46,XY,del(6)(q23q25)[4]/46XY[16]	0,5	3,1	3,6
35	57/M	46,XY,del(6)(q15q21),del(20)(p13)[cp4]/46,XY[13]	3,3	2,9	4,3
36	80/M	46,XY,del(20)(q11)[8]/46,XY[12]	6,0	-	1,4
37	84/M	46,XY[16]/ tetraploidía [5]	3,9	3,7	4,2
38	85/M	44-45,X,-Y,-21[cp17]/46,XY[5]	-	6,3	12,6
39	80/F	46,XX,del(6)(q23q25)[3]/46,XX [17]	-	6,7	-
<i>Cariotipos complejos</i>					
40	72/F	47-52,X,der(X)t(X;1)(q28;q25),der(1)t(1;21)(q44;q11), + del(1)(p13), +3, +5, +7, +11, +15, der(16)t(16;17)(q24;q21), +19, -20 [cp 5]/46,XX [38]	1,2	4,3	-
41	82/M	85-86,XXYY,+X,+Y,del(1)(q32),del(1)(p11)x2,-2,+dic(3;1)(q27;p22),-5,-6,-7,-8,-13,-14,-15,-17,-18,-19,-20,-21,+marx2[cp7]/46,XY[14]	16,7	5,6	1,8
42	59/F	39-41,X,-X,der(5)t(5;?)(p11;?),del(6)(q21),der(8;12)(q10;q10),der(10)t(10;?)(q26;?)-13,-14,-16,-17,+19,-20[cp6]/46,XX[12]	3,1	17,4	-
43	49/F	28-30,X,+1,+2,+4,+7,+8,+10,+14,+15,+16,+19,+21,+22[cp4]/45,XX,-13[3]/46,XX[7]	-	3,6	25,3
44	58/F	46-47,XX,der(5)t(1;5)(q21;q35),del(17)(p11),+add(20)(q13)[cp13]/46,XX[13]	4,2	9,3	-
45	73/F	54-56,XX,+del(1)(p13),+5,+7,+del(8)(p11),+10,+18,+21,+mar[cp8]/46,XX[17]	-	9,1	-

El análisis citogenético de los pacientes con CS permitió observar como anomalía más frecuente las deleciones en el brazo largo del cromosoma 6(6q) con diferentes puntos de ruptura. Dentro de los casos con CC encontramos dos pacientes con cariotipo hiperdiploide (casos 40 y 45), uno

hipodiploide (caso 42), uno pseudodiploide (caso 44), uno hipotetraploide (caso 41) y un paciente con cariotipo hiperhaploide (24-34 cromosomas)(caso 43). En la **Fig. 1** se muestra el cariotipo hiperdiploide complejo con bandeado G de nuestra serie con anomalías estructurales y numéricas.

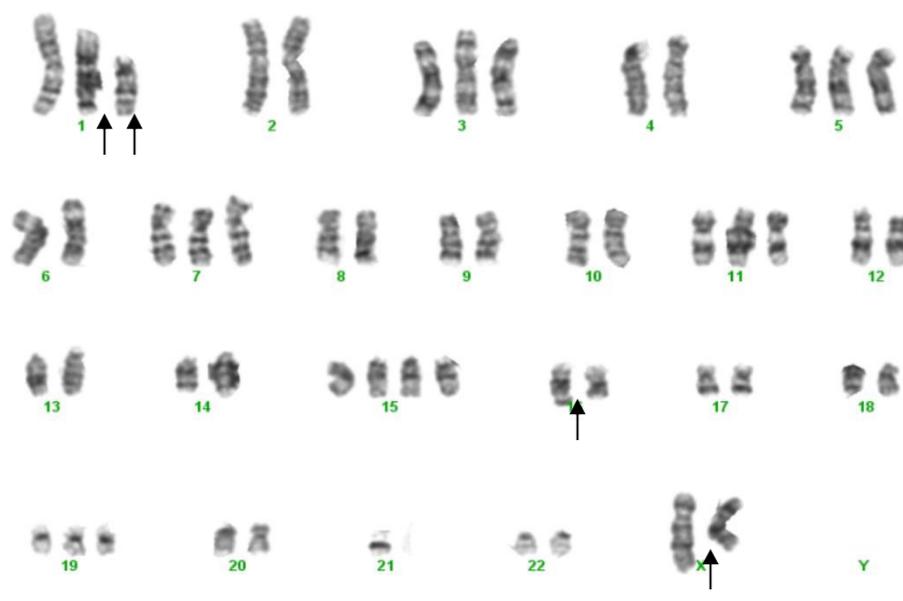


Figura 1. Cariotipo con bandeado G del caso 40 mostrando los marcadores: $der(X)t(X;1)(q28;q25)$, $der(1)t(1;21)(q44;q11)$, $+del(1)(p13)$, $der(16)t(16;17)(q24;q21)$, y múltiples trisomías involucrando a los cromosomas 3,5,7,11,15 y 19.

Además del estudio citogenético, se efectuó en las muestras de los pacientes con MM, el análisis citomolecular mediante FISH utilizando el panel de sondas previamente mencionado. De los casos con CN, se analizaron por FISH 31 pacientes: 4 de ellos (12,9%) no presentaron alteraciones en tanto que los restantes (27/31; 87,1%) mostraron alguna anomalía con las sondas utilizadas: 10/18 casos (55,5%) presentaron rearrreglo de *IGH* (14q32), 18/30 pacientes (60%) mostraron deleción de *TP53* (17p13), en tanto que 6/21 casos (28,6%) tuvieron deleción de *RBI* (13q14).

Rearreglos del gen *MYC*

El análisis citomolecular de los rearrreglos del gen *MYC* se efectuó en 61 pacientes con MM de los cuales 14 (22,9%) resultaron patológicos (**Fig. 2a**); es importante destacar que ningún paciente con MGUS mostró rearrreglos en el locus *MYC*. En la **Fig.2b** se muestra la distribución general de las alteraciones encontradas: 77% de los casos presentaron patrón normal de señales, 7 (11,5%) Split, 3 (4,9%) ganancia

del número de copias de *MYC*, 3 (4,9%) amplificación (amp) (1 caso con ambas alteraciones: ganancia y amp) y 1 (1,6%) dos señales de fusión más una señal extra verde.

El 46% de los casos con anomalías de *MYC* mostraron alteraciones cromosómicas, en tanto que sólo se observaron en el 23% de los pacientes con *MYC* normal (**Fig. 3a**). Asimismo, detectamos una mayor proporción de pacientes con cariotipo complejo en aquellos que mostraban anomalías del gen *MYC* (46%) (**Fig.3b**).

Análisis citomolecular y molecular de *CD27* (12p13)

Simultáneamente se analizaron las deleciones del brazo corto del cromosoma 12, empleando la sonda locus específica *CD27* (12p13). Este estudio se efectuó en 32 casos de los cuales 9 (28,1%) mostraron deleción y un paciente presentó ganancia/amplificación del número de copias de dicho gen (3,1%). Es importante destacar que sólo detectamos deleción en dicho locus en los pacientes con MM, no encontrando dicha anomalía en pacientes con MGUS.

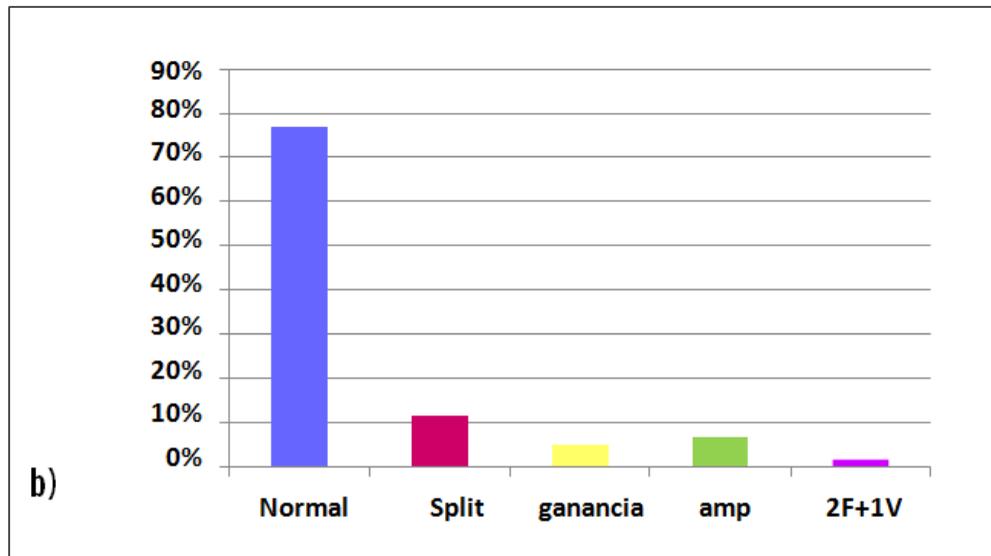
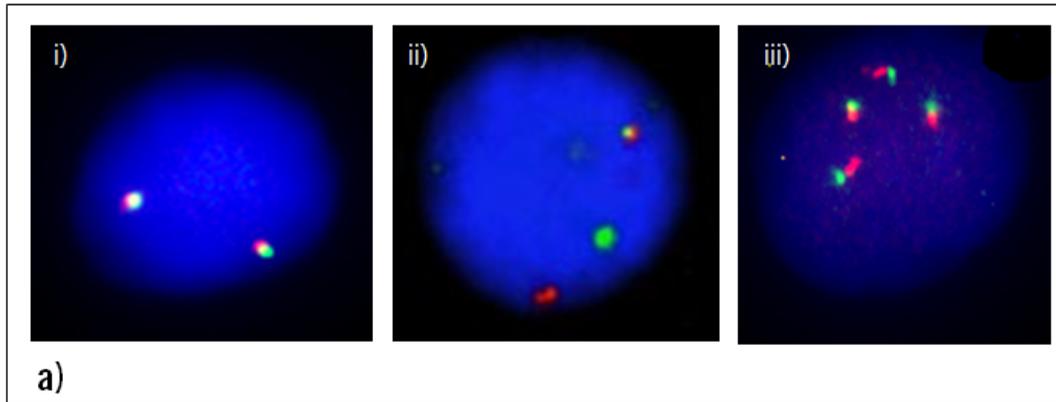


Figura 2. Evaluación de los pacientes con la sonda MYC. a) Núcleos interfásicos de pacientes con MM mostrando: i) patrón de hibridación normal; ii) Señal de break apart; iii) múltiples señales de fusión; b) Distribución de los pacientes analizados, con sonda del gen MYC, según la presencia de split, ganancia, amplificación (amp) y 2 señales de fusión más una señal verde extra (2F+1V).

Simultáneamente, se efectuó el análisis molecular del promotor de *CD27* en 30 pacientes: 26 MM y 4 MGUS. En todos los casos se observó identidad con la secuencia de referencia del gen y ninguna presentó cambios nucleotídicos.

Comparación con los parámetros clínicos

Además, se realizó la comparación de los hallazgos citomoleculares con los parámetros clínicos de los pacientes estudiados. Para hacer este análisis se consideró también un grupo de 55 pacientes sin alteraciones considerado como el grupo control (GC) y 18 casos con MGUS del archivo del

Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, IMEX-CONICET-Academia Nacional de Medicina y del Servicio de Genética del Hospital Posadas. En las **Tablas II y III** se detallan edad, sexo, isotipo, características clínicas y de laboratorio de los pacientes estudiados.

Se observaron valores elevados de calcemia y creatinina en los pacientes con alteraciones de *MYC* ($10,1 \pm 0,5$ g/dL; $2,4 \pm 1,3$ g/dL respectivamente), respecto de aquellos sin alteraciones en dicho locus ($9,5 \pm 0,5$ g/dL; $1,8 \pm 0,4$ g/dL, respectivamente) y del GC ($9,2 \pm 0,2$ g/dL; $1,9 \pm 0,3$ g/dL, respectivamente), pero sin diferencias significativas

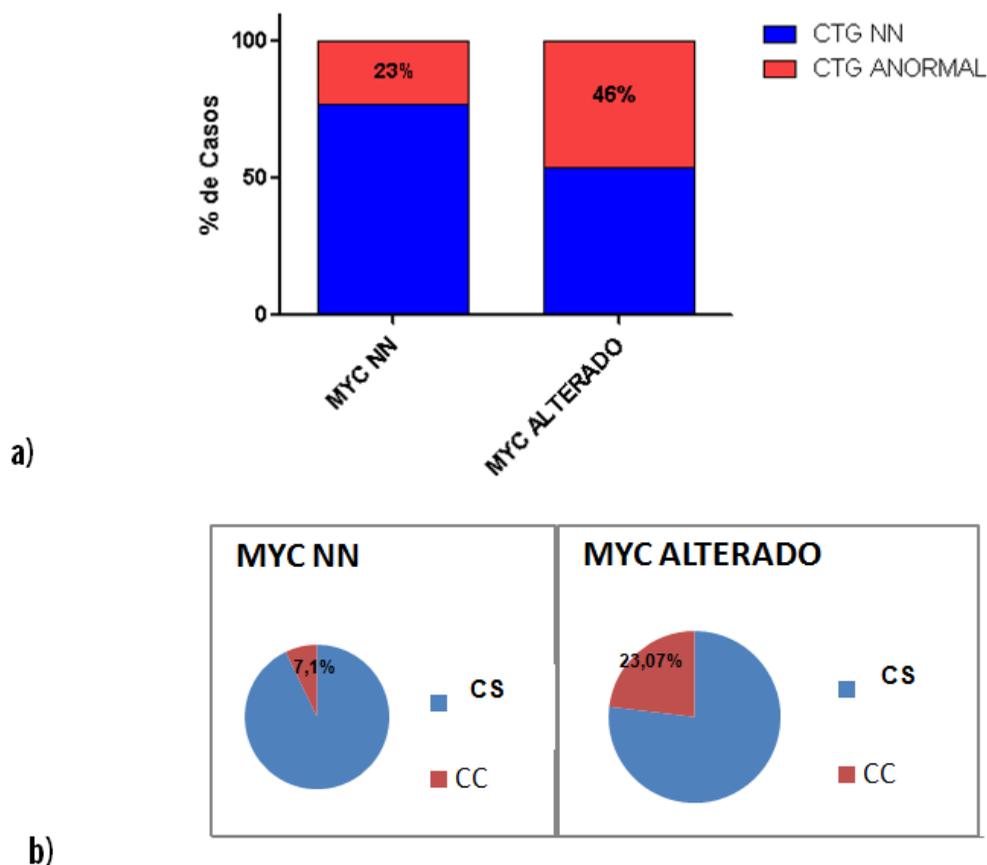


Figura 3. Distribución de casos con cariotipo. a) Distribución de casos con cariotipo normal y anormal en los pacientes con y sin alteraciones del gen MYC; b) Distribución de casos con cariotipo complejo (CC) y simple (CS) acorde a la presencia o ausencia de anomalías de MYC. NN: Normal

(Tabla II). Asimismo, los pacientes con alteración de MYC mostraron mayor frecuencia de falla renal que aquellos con cariotipo y FISH normal ($p=0,0001$), con un riesgo relativo de 3,9 para los primeros (Fig.4).

La evaluación de los parámetros clínicos mostró que los pacientes con delección de 12p13 resultaron en promedio más jóvenes (51,9 años), respecto de aquellos sin delección (66,2 años) y el GC (62,4 años), mostraron valores aumentados de beta2 microglobulina ($11,86 \pm 8,94$ ug/ul), respecto de ambos grupos ($3,88 \pm 0,65$ ug/ul y $4,04 \pm 0,56$ ug/ul, respectivamente) y de creatinina ($4,55 \pm 2,2$ mg/dl) respecto de los otros dos grupos ($1,33 \pm 0,3$ mg/dl y $1,8 \pm 0,4$, respectivamente). Se observó un aumento significativo de lactato dehidrogenasa (LDH) en los casos

con delección de CD27 ($338,5 \pm 48,19$ U/l) respecto del grupo control ($326 \pm 44,4$ U/l) ($p=0,04$) (Tabla III).

Discusión y Conclusiones

Los estudios citogenéticos en las neoplasias linfoides han demostrado ser una herramienta de relevancia en la caracterización biológica de estas entidades, permitiendo identificar alteraciones cromosómicas que son consideradas importantes marcadores pronóstico. En este trabajo analizamos marcadores genéticos asociados a pacientes con MM y MGUS efectuando la caracterización citogenética y citomolecular, con particular atención en los rearrreglos del gen MYC y la presencia de delecciones y variantes nucleotídicas en el brazo corto del cromosoma 12, anomalías poco estudiadas en esta patología. Los resultados obtenidos

Tabla II: Características clínicas de los pacientes evaluados con y sin alteración de MYC, MGUS y GC.

Grupos estudiados				
Características clínicas	MYC normal	MYC anormal	MGUS	Pacientes GC
N ° de casos	47	14	18	55
Sexo (F/M)	27/20	6/8	10/8	33/22
Rango de edad media(años)	64,3 (40-86)	66,1 (46-84)	59,8 (37-80)	62,4 (24-86)
Isotipo (%)				
IgG	75,7	77,8	60	58,2
IgA	12,1	11,1	20	18,2
Cadena liviana	9,1	-	-	16,3
Otro (IgD-IgM)	3,0	11,1	20	7,8
Cadena liviana (%)				
K	66,7	50	40	68
L	33,3	50	60	32
Estadio DS (%)				
I	14,3	40	-	18,2
II	33,3	20	-	15,9
III	52,4	40	-	65,9
ISS (%)				
I	36	42,8	-	28,9
II	12	14,3	-	35,5
III	52	42,8	-	35,5
β2M (μg/mL)	4,6(1 -10,5)	4,2 (1,5- 10,5)	2,7 (1,7-5,5)	4,6(1,06-19,5)
LDH (UI/L)	336 (108-1265)	293,1(140-509)	448(367-507)	236 (101-810)
Albumina (g/dL)	3,6 (1,8-4,8)	3,6 (2,8-4,4)	4,4 (4-5,1)	3,4 (2-4,7)
Creatinina (g/dL)	1,8 (0,4-13,5)	2,4 (0,7-12,9)	1,0 (0,6-1,8)	1,9 (0,4-11,8)
Calcemia (g/dL)	9,5 (4-13,9)	10,1 (8,8-13,3)	9,3 (6,4-10,2)	9,2 (1,2-13,8)
Proteína M (g)	6 (2,1 – 37,2)	5,9 (2,3-14,22)	0,84 (0,3-1,4)	4,7 (2,3 -9,4)
Hb (g/dL)	11,4 (7,6-16,1)	11,2 (7,7-14,6)	12,6 (9- 15,8)	11,3 (6,6-15,3)
%IMO	58,9 (12-100)	46,7 (12-100)	8,6 (8-9)	47,9 (12 -90)
Sin falla renal/Con falla renal (%)	30,7/ 69,2	12,5/ 87,5*	0/ 100	76/ 24
<i>b2M: b2-microglobulina;LDH: lactato deshidrogenasa; Hb: hemoglobina; *p=0,0001</i>				

Tabla III: Características clínicas del grupo control y de los pacientes evaluados con y sin delección de CD27

Parámetros clínicos	Control	CD27 normal	del CD27
Edad (años)	62,4±2,01	66,2±3,5	51,9±3,4
β2 microglobulina (mg/ml)	4,07±0,56	3,88±0,65	11,86±8,9
LDH (U/l)	326±44,4*	301±30,8	338,5± 48,19*
Albúmina mg/dl	3,6±0,08	3,8±0,15	3,8±0,23
Creatinina mg/dl	1,8±0,42	1,33±0,3	4,55±2,2
Calcemia g/dl	9,48±0,3	10,6±0,5	9,54±0,51
Proteína M g	3,11±0,39	3,5±0,64	2,97±1,12
Hemoglobina g/dl	11,14±0,4	11,19±0,58	10,26±1,49
% IMO	51±5,77	37,03±8,66	47,8±20,95

(Media ± ES) * p=0,04

fueron correlacionados con las características clínicas de los pacientes.

El análisis citogenético permitió observar que todos los pacientes con MGUS no presentaron anomalías cromosómicas ni citomoleculares, en tanto que en los

casos con MM detectamos un 29,8% de pacientes con anomalías cromosómicas. La incorporación de técnicas más sensibles, como FISH, hizo factible realizar un estudio más específico, pudiendo detectar alteraciones crípticas o regiones cromosómicas no observadas mediante el análisis

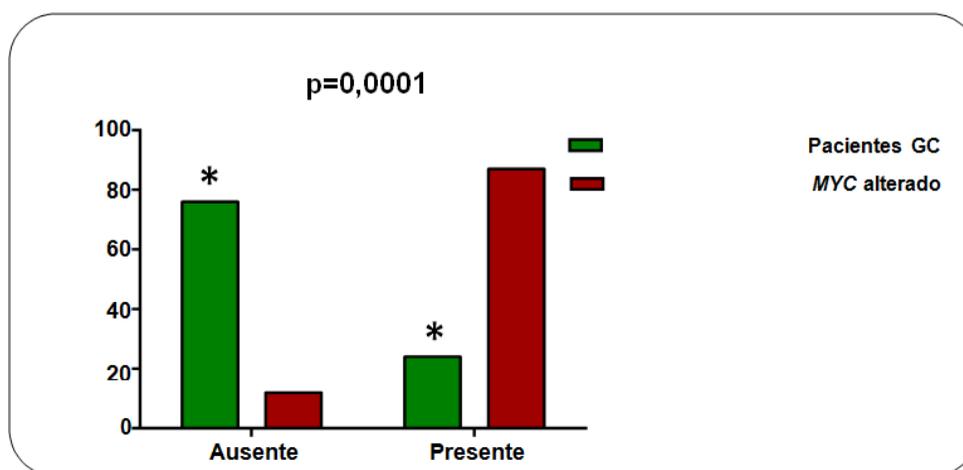


Figura 4. Diferencias significativas en pacientes con MYC patológico y el grupo control (GC) en función de la presencia/ausencia de falla renal.

citogenético convencional, lo cual hizo factible aumentar el número de casos patológicos al 87,1%. Estos resultados concuerdan con datos previos de la literatura, sustentando la importancia de las técnicas citomoleculares en el estudio, clasificación y estimación de riesgo del MM (Klein *et al.*, 2011; Boyd *et al.*, 2011; Palumbo *et al.*, 2015; Rajkumar, 2018).

El análisis citogenético de nuestros pacientes con MM permitió identificar a las delecciones en 6q con diferentes

puntos de ruptura como la anomalía más frecuente (8,5%), en su mayoría en el marco de un cariotipo simple, siendo 6q23/6q25 los puntos de ruptura más frecuentemente observados. Estudios de CNA (*copy number aberrations*) muestran esta alteración en una frecuencia del 26%-33% de los casos, siendo los puntos de ruptura 6q23 y 6q25.3 los más involucrados (Walker *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015). Esta región contiene múltiples genes; el análisis de expresión de los mismos detectó menores niveles de transcripto de *IGF2R*

(*Insulin Like Growth Factor 2 Receptor*), *TFB1M* (*Transcription Factor B1, Mitochondrial*) y *WTAP* (*WT1 Associated Protein*) (Walker *et al.*, 2010), siendo necesario profundizar estos estudios a fin de definir su rol en esta patología. Asimismo, un estudio reciente de nuestro Laboratorio, Stella y colaboradores (2019), muestra mayor inestabilidad genómica, medida por asincronía de replicación, en los pacientes con del6q respecto de aquellos sin alteraciones por FISH, así como asociación con factores de pronóstico adverso, sustentando la importancia de evaluar esta región en pacientes con MM.

El análisis citogenético y citomolecular de los rearrreglos del gen *MYC* y las deleciones en el brazo corto del cromosoma 12 no forman parte actualmente de las prácticas de rutina en pacientes al diagnóstico y en el seguimiento de los mismos, siendo considerados muy recientemente entre las anomalías secundarias asociadas al MM. Nuestro estudio mostró una frecuencia de rearrreglos de *MYC* (específicamente translocaciones) del 11,5%, valor similar al 15% descrito en la bibliografía en pacientes con MM al diagnóstico (Chng *et al.*, 2011; Avet-Loiseau *et al.*, 2012; Holien & Sundan, 2012). Además de la translocación de dicho locus evidenciamos otros patrones anómalos de hibridación y señales de fusión múltiples. Diferentes estudios encuentran rearrreglos inter-cromosoma en las translocaciones que involucran al gen *MYC*, con alteraciones en el número de copias y secuencias duplicadas en ambos puntos de ruptura (Walker *et al.*, 2014; Demchenko *et al.*, 2016; Mikulasova *et al.*, 2020), que podrían explicar estos hallazgos. En concordancia con datos de la literatura, no hallamos rearrreglos de *MYC* en nuestros pacientes con MGUS, sustentando que la activación de este gen puede ser un evento importante en la transformación de MGUS a MM (Chng *et al.*, 2011). En cuanto a la correlación con los parámetros clínicos, se compararon los datos de nuestra serie con un GC de pacientes sin alteraciones y casos con MGUS. Dicho análisis mostró valores elevados de calcemia y creatinina en los pacientes con alteraciones de *MYC*, respecto de aquellos sin alteraciones en dicho locus y del GC. Asimismo, detectamos que los casos con *MYC* patológico presentaban un aumento significativo de falla renal (87,5%) respecto de los pacientes sin anomalías en dicho locus (69,2%) y del GC (24%). Simultáneamente evidenciamos una mayor proporción de alteraciones

cromosómicas y CC, asociados a pronóstico adverso, en los casos con anomalías de *MYC*. Chng *et al.* (2011) asociaron la activación de dicho gen con un curso más agresivo de la enfermedad y una supervivencia más corta. Así como también, trabajos descriptos por Moller *et al.* (2018) indican que la sobreexpresión de *MYC* es una característica de progresión de la enfermedad y mal pronóstico, demostrando su activación en etapas avanzadas, correspondiéndose con un evento secundario en MM.

Simultáneamente, el estudio de nuestros pacientes se complementó con la evaluación de las deleciones del brazo corto del cromosoma 12, que involucran al gen *CD27*, encontrándose deleción en el 28,1% de los casos. Estudios previos muestran una amplia heterogeneidad en la expresión de *CD27* en pacientes al diagnóstico (Guikema *et al.*, 2003). Se ha descrito que la disminución de su expresión puede deberse a la desregulación de la transcripción a nivel del ARNm debido a la deleción de 12p (Morgan *et al.*, 2006). Asimismo, estos autores sostienen que la baja expresión de *CD27* mediante inmunohistoquímica se correlaciona con un alto riesgo de progresión de la enfermedad. Resultados similares fueron observados por otros autores utilizando *microarrays* y citometría de flujo (Guikema *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2006). Estudios más recientes de perfiles de expresión génica asociaron la baja expresión de este gen con recaída de la enfermedad (Krzeminski *et al.*, 2016), en tanto que Alaterre *et al.* (2017) detectaron que la alta expresión de cuatro genes: *CD24*, *CD27*, *CD36* y *CD302*, se encontraba asociada a más larga SV, pudiendo establecer un *score* de riesgo de genes CD, que podría representar una herramienta útil en la predicción de la evolución clínica de los pacientes con MM.

La evaluación de los parámetros clínicos respecto del estatus de *CD27* mostró que los pacientes con deleción presentaron valores significativamente elevados de LDH respecto del GC. En pacientes con MM, los niveles aumentados de LDH no confieren un impacto en el pronóstico en forma independiente, sin embargo, su cuantificación fue incorporada en el R-ISS (revised-ISS), en el cual los pacientes con LDH elevado constituyen un grupo de alto riesgo (R-ISS III) (Palumbo A *et al.*, 2015). Asimismo, cabe señalar que ninguno de nuestros casos con MGUS presentó deleción de *CD27*, sustentando el carácter secundario de

estas alteraciones y su asociación con enfermedad activa/sintomática. Un estudio reciente empleando citometría de flujo evidenció que los casos con MM con baja expresión de *CD27* se asociaban con un mayor porcentaje de infiltración de CP en la MO, niveles elevados de B2microglobulina y calcio, estadios avanzados de la enfermedad, cariotipos complejos y una menor respuesta a la terapia que aquellos casos con niveles altos de expresión de *CD27*, proponiéndolo como un marcador de mal pronóstico en MM (Chu *et al.*, 2020).

En el presente trabajo se realizaron también estudios moleculares de pacientes sintomáticos y asintomáticos, efectuándose el diseño de los *primers* específicos para *CD27*. Particularmente se logró amplificar la región promotora del gen *CD27* y secuenciar los fragmentos obtenidos en un total de 30 pacientes, no evidenciándose variantes nucleotídicas con el gen de referencia. Diferentes autores asociaron la presencia de variantes de nucleótido simple en *CD27* a cuadros clínicos tales como la inmunodeficiencia congénita combinada severa (van Montfrans *et al.*, 2012) y síndromes linfoproliferativos (Alkiary *et al.*, 2015), entre otros. Si bien ninguna de las 91 variantes con probable impacto clínico publicadas se focaliza en el estudio de pacientes con MM (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation>), sin duda, resulta de importancia aumentar el número de casos analizados a fin de corroborar nuestros resultados.

Concluyendo, el presente estudio constituye, a nuestro conocimiento, la primera evaluación del status citogenético, molecular y citomolecular de los genes *CD27* y *MYC* en nuestro medio. Dicho análisis permite confirmar el carácter secundario de los arreglos de *MYC* y de la del12p, ausentes en estadios asintomáticos, y reafirma la importancia de su estudio en pacientes con MM al diagnóstico. Su inclusión en el panel de estudios genéticos de pacientes con MM permitirá lograr una mejor delineación clínico-biológica de esta entidad, así como también delimitar subgrupos de respuesta al tratamiento en estadios iniciales de la enfermedad, permitiendo una mayor certeza en la evaluación pronóstica así como en la toma de decisiones terapéuticas. Sin duda, la continuidad de estos estudios ampliando el número de pacientes podrá en un futuro próximo definir en forma más específica la importancia en estas alteraciones.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el marco del Subsidio P13 2018-2020(código 80020170200010UM) otorgado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Morón y parte de los resultados fueron presentados en el trabajo final de la Licenciatura en Genética de Giselle Guasch. Agradecemos a los Médicos Hematólogos Dres. Sergio Lopresti y Juan Lanari por las muestras de pacientes y datos clínicos aportados.

Referencias Bibliográficas

- Affer M, Chesi M, Chen WD, *et al.* (2014) Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia*; 28:1725–35.
- Alaterre E, Raimbault S, Goldschmidt H, *et al.* (2017). *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* gene expression for outcome prediction in patients with multiple myeloma. *Oncotarget* 8:98931-44.
- Alkhairy OK, Perez-Becker R, Driessen GJ, *et al.* Novel Mutations in TNFRSF7/CD27: Clinical, Immunologic, and Genetic Characterization of Human CD27 Deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:703-12.
- Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, *et al.* (2009) Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*; 27:4585-90.
- Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, *et al.* (2012). Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia* 27:711-7
- Billecke L, Penas EM, May AM, *et al.* (2013) Cytogenetics of extramedullary manifestations in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 161, 87-94.
- Boyd KD, Ross FM, Walker BA, *et al.* (2011). Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies *FAM46C* at 1p12 and *CDKN2* Cat 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res* 17:7776-84.
- Chiecchio L, Protheroe RK, Ibrahim AH, *et al.* (2009) Frequent upregulation of MYC in plasma cell leukemia. *Genes, Chrom Cancer* 48:624-36.
- Chng WJ, Huang GF, Chung TH, *et al.* (2011). Clinical and

- biological implications of *MYC* activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 25:1026-35.
- Chu B, Bao L, Wang Y, *et al.* CD27 antigen negative expression indicates poor prognosis in newly diagnosed multiple myeloma. *Clin Immunol.* 2020; 213:108363.
 - Dang CV.(2012) *MYC* on the path to cancer. *Cell*; 149: 22-35.
 - Demchenko Y, Roschke A, Chen WD. (2016). Frequent occurrence of large duplications at reciprocal genomic rearrangement breakpoints in multiple myeloma and other tumors. *Nucleic Acids Res*; 44:8189-98.
 - Dib A, Gabrea A, Glebov OK, *et al.* (2008) Characterization of *MYC* translocations in multiple myeloma cell lines. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 39: 25-31.
 - Durie BGM, Salmon SE. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36:842-54.
 - Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, *et al.* (2009) International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*; 23: 2210-21.
 - Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG, *et al.* (2005). International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 23:3412-20.
 - González-Calle V, Fonseca R. (2017). Precision Medicine in Myeloma: Challenges in Defining an Actionable Approach *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.*; 17:621-30.
 - Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, *et al.* (2003). *CD27* is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low *CD27* expression in patients with high-risk disease. *Br J Haematol* 121:36-43.
 - Holien T, Sundan A. (2012). Oncogene addiction to *c-MYC* in myeloma cells. *Oncotarget* 3:739-40.
 - ISCN. (2016). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Lisa G Shaffer, Jean McGowan-Jordan, Michael Schmid (eds), Karger, Basel.
 - Jiang N, Qi C, Yu L, *et al.* (2012) Analysis of chromosome 12p deletion in plasma cell dyscrasias. *Leukemia*; 36: 32-6.
 - Kim M, Lee SH, Kim J, *et al.* (2015). Copy number variations could predict the outcome of bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *Genes Chrom Cancer*; 54:20-7.
 - Klein U, Jauch A, Hielscher T, *et al.* (2011). Chromosomal aberrations +1q21 and del (17p13) predict survival in patients with recurrent multiple myeloma treated with Lenalidomide and Dexamethasone. *Cancer* 117:2136-44.
 - Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. (2011) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood*.26;117: 5573-81.
 - Krzeminski P, Corchete LA, García JL, *et al.* (2016). Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse. *Oncotarget*7:80664-79.
 - Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, *et al.* (2010) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*; 24: 1121-7.
 - Mikulasova A, Ashby C, Tytarenko RG, *et al.* (2020). Microhomology-mediated end joining drives complex rearrangements and over expression of *MYC* and *PVT1* in multiple myeloma. *Haematologica*105:1055-66.
 - Møller HEH, Preiss BS, Pedersen P, *et al.* (2018). *Myc* protein overexpression is a feature of progression and adverse prognosis in multiple myeloma. *Eur J Haematol*; 1-18.
 - Moreau P, Robillard N, Jégo G, *et al.* (2006). Lack of *CD27* in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol* 132:168-70.
 - Morgan TK, Zhao S, Chang KL, *et al.* (2006). Low *CD27* expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: An immunohistochemical analysis. *Am J ClinPathol* 126:545-51.
 - Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, *et al.* (2015). Revised international staging system for multiple myeloma: a report from international myeloma working group. *J ClinOncol* 33: 2863-9.
 - Rajan AM, Rajkumar SV. (2015) Interpretation of

cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J*; 5: e365.

- Rajkumar SV. (2016) Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*; 91: 719-34.
- Rajkumar SV. (2018). Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 93:1091-110.
- Rajkumar SV. (2020) Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 95: 548-67.
- Stella F, Pedrazzini E, Baialardo E, *et al.* (2014) Quantitative analysis of CKS1B mRNA expression and copy number gain in patients with plasma cell disorders. *Blood Cells Mol Dis*; 53:110-7.
- Stella F, Pedrazzini E, Slavutsky I. (2019). Análisis citogenético y asincronía de replicación en pacientes con delección 6q en mieloma múltiple. *J Basic Appl Genet XXX (Suppl)*: 98.
- van Montfrans JM, Hoepelman AIM, Otto S, *et al.* (2012) CD27 Deficiency Is Associated With Combined Immunodeficiency and Persistent Symptomatic EBV Viremia. *J Allergy Clin Immunol* 129:787-93.
- Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, *et al.* (2010). A compendium of myeloma- associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 116:e56-e65.
- Walker BA, Wardell CP, Brioli A, *et al.* (2014). Translocations at 8q24 juxtapose *MYC* with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J*: e191-7.
- Weinhold N, Ashby C, Rasche L, *et al.* (2016) Concomitant gain of 1q21 and *MYC* translocation define a poor prognostic subgroup of hyperdiploid multiple myeloma *Haematologica*; 101: e118.
- Xie P, Kraus ZJ, Stunz LL, *et al.* (2008): Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:199-207.
- Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, *et al.* (2002) Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*; 99:1745-57.