

Universidad de Salamanca
Departamento de Medicina
Hematología



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

Tesis doctoral

“Análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo de las células plasmáticas de la médula ósea en pacientes con gammopatía monoclonal de significado incierto y mieloma quiescente: valor pronóstico e implicaciones clínicas”

Ernesto Pérez Persona

2010

Universidad de Salamanca
Departamento de Medicina
Hematología



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

Tesis doctoral

“Análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo de las células plasmáticas de la médula ósea en pacientes con gammopatía monoclonal de significado incierto y mieloma quiescente: valor pronóstico e implicaciones clínicas”

Ernesto Pérez Persona

2010

A Paloma, sin ti nada sería igual.

A mis padres y hermanos.

Agradecimientos

Al profesor Jesus San Miguel, por haberme inculcado el interés por la Hematología en general y el mieloma en particular.

Al profesor Alberto Orfao, sin cuyos conocimientos no se podría haber llevado a cabo este trabajo.

A la doctora Belén Vidriales, por aguantar los cientos de correos enviados.

A mis “Co-Rs”, por los ratos pasados y su ánimo durante la residencia.

A la doctora Consuelo López Berges y a Jose, un buen compañero, por haberme acompañado en mis primeros pasos por la citometría.

Al numeroso personal del Servicio de Hematología, por haber contribuído con su trabajo al desarrollo del mío.

A los compañeros de los distintos hospitales de Castilla y León y Extremadura, que contribuyeron con su esfuerzo a recopilar todos los datos.

Glosario de abreviaturas

APC: Aloficocianina

ASO-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa alelo-específica.

CM: Componente monoclonal

CMF: Citometría de flujo

CP: Células plasmáticas

CPN: Células plasmáticas con fenotipo normal

CPP: Células plasmáticas con fenotipo patológico

EMR: Enfermedad mínima residual

FITC: Isocianato de fluoresceína

FLC: Free light chain (cadenas ligeras libres)

GM: Gammapatía monoclonal

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto

HR: Razón de riesgo

IF: Inmunofluorescencia

Ig: Inmunoglobulinas

IL-6R: Receptor de interleucina-6

IMF: International Myeloma Foundation

IMWG: International Myeloma Working Group

INE: Instituto Nacional de Estadística

LL: Linfoma linfoplasmocítico

MM: Mieloma múltiple

MQ: Mieloma quiescente

MW: Macroglobulinemia de Waldeström

PE: Ficoeritrina

PerCP-Cy5.5: Tándem constituido por los fluorocromos PerCP (Peridinin-chlorophyll-protein complex) y Cianina 5.5

RC: Remisión completa

RMN: Resonancia magnética nuclear

sIg: Inmunoglobulina de superficie

Índice

INTRODUCCIÓN	11
ASPECTOS CLÍNICOS	13
CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE GMSI Y MQ	13
EPIDEMIOLOGÍA DE GMSI y MQ.....	15
ETIOPATOGENIA DE LAS GMSI	16
Factores genéticos.....	16
Factores ambientales.....	18
Mecanismos de progresión	19
EVOLUCIÓN NATURAL DE LA GMSI Y MQ.....	20
Otros problemas de salud relacionados con las GM.....	21
PREDICTORES DE PROGRESIÓN EN GMSI Y MQ	22
Factores de riesgo de progresión en GMSI	22
Factores de riesgo de progresión en MQ.....	24
MANEJO DE LA GMSI Y MQ	25
Determinaciones necesarias ante una gammapatía monoclonal.....	26
Tratamiento.....	29
INMUNOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS	32
Moléculas que intervienen en la diferenciación y maduración de la CP.....	32
Receptores de citocinas	33
Moléculas de adhesión.....	33
Otras moléculas de interés.....	34
Diferencias fenotípicas entre la CP normal y CP mielomatosa.....	35
CONTENIDO DE ADN EN LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES	37
Ciclo Celular en el Mieloma Múltiple.....	38
Ploidía de ADN en el Mieloma Múltiple	39

UTILIDAD CLÍNICA DE LA CMF	39
Diagnóstico diferencial de gammopatías.....	40
Identificación de factores pronósticos.....	41
Enfermedad mínima residual.....	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIAL MÉTODOS Y RESULTADOS	48
Artículo 1.....	50
Artículo 2.....	61
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	72

Introducción

Las gammopatías monoclonales (GM) constituyen un grupo de entidades caracterizadas por la existencia de un clon de células plasmáticas (CP) productoras de una inmunoglobulina (Ig) de carácter monoclonal detectable en sangre y/u orina (Tabla 1). El paradigma de GM en la práctica clínica es el mieloma múltiple (MM), sin embargo, la entidad más frecuente es la gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI), que representa hasta un 62% de las gammopatías monoclonales detectadas en el laboratorio^{1,2}. El mieloma quiescente (MQ) es una entidad menos frecuente, que supone en torno a un 6% de las gammopatías monoclonales². La distribución por diagnósticos entre 1684 personas con un CM en la clínica Mayo (Rochester, USA)² fue de GMSI en el 51% de los casos, MM en el 18%, MQ un 6% y un 1% plasmocitomas. El 24% restante fueron diagnosticados de amiloidosis (11%), síndromes linfoproliferativos (4%), macroglobulinemias de Waldeström (3%) y otras entidades (6%)².

La GMSI representa una entidad de alta prevalencia. Kyle comunicó en el año 2006 que el 3,2% de la población mayor de 50 años del condado de Olmsted (Minnesota) presentaba una GMSI³. En España no existen datos demográficos sobre prevalencia de GMSI, un estudio retrospectivo en la Comunidad de Aragón del año 1998, registró 52,87/100000hab/año gammopatías en individuos mayores de 60 años, aunque existía un importante sesgo en la población seleccionada, ya que pertenecía al ámbito hospitalario⁴. Respecto al mieloma múltiple el instituto nacional de estadística (INE, www.ine.es) ha publicado en el año 2007 un total de 1584 defunciones debidas a MM, y en el ámbito Europeo, según la Red Europea de Registros de Cáncer (European Network of Cancer Registries; <http://www.encr.com.fr/>) se diagnostican en Europa unos

21.500 casos nuevos de mieloma múltiple al año, con unas 15.000 muertes anuales relacionadas con esta enfermedad.

Tabla 1. Clasificación de las gammopatías monoclonales

-
- Gammopatías monoclonales benignas.
 - Gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI)
 - Gammopatía monoclonal secundaria.
 - Gammopatías monoclonales malignas
 - Mieloma múltiple
 - Mieloma múltiple sintomático
 - Mieloma quiescente
 - Leucemia de células plasmáticas
 - Mieloma no secretor
 - Mieloma IgD
 - Mieloma IgM
 - POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, cambios en la piel, componente monoclonal)
 - Plasmocitoma
 - Plasmocitoma óseo solitario
 - Plasmocitoma extraóseo
 - Asociados a síndromes linfoproliferativos
 - Macroglobulinemia de Walsenström
 - Amiloidosis
 - Enfermedad de las cadenas pesadas

Dado que las GMSI y MQ son entidades asintomáticas que preceden al MM⁵, sería de gran utilidad conocer aquellos factores capaces de predecir el riesgo de progresión en estas entidades.

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS

1.1.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE GMSI y MQ

La detección de un componente monoclonal en sangre u orina permite establecer el diagnóstico de una gammopatía monoclonal (Tabla 1). El estudio de extensión nos permitirá establecer el diagnóstico preciso de la gammopatía. Hasta el momento se han utilizado diversos criterios diagnósticos para la definición de MM, MQ y GMSI: Medical Research Council, Nordic Myeloma Study Group, PETHEMA, Eastern Cooperative Oncology Group, etc.⁶ En un intento de homogeneizar estos criterios, se han publicado dos guías de consenso por parte del “International Myeloma Working

Group” (IMWG) y la “International Myeloma Foundation”(IMF)^{6,7}. En ambas, el criterio que define el mieloma múltiple sintomático es la afectación de los órganos diana atribuible a la enfermedad, que se manifiesta fundamentalmente por: hipercalcemia (C), insuficiencia renal (R) anemia (A), y lesiones óseas (B: “bone”), “CRAB” en sus siglas en inglés, sin establecer un límite en la infiltración de médula ósea por CP mielomatosas o la cantidad de componente monoclonal (CM).

La diferenciación entre GMSI y MQ, sin embargo, no es tan clara. Se acepta de manera unánime que para considerar el diagnóstico de una GMSI, la infiltración máxima de la MO por células plasmáticas no debe superar el 10%^{6,7}. Por lo tanto, ante una gammopatía monoclonal con infiltración medular superior al 10% y en ausencia de sintomatología es por definición un MQ. Respecto al CM, establecer una cuantía límite para diferenciar ambas entidades es más controvertido. Aunque se considera que un componente IgA de 2 a 2,5 g/dl, podría ser equivalente a 3 g/dl de IgG⁶, la IMWG recomienda la utilización del punto de corte en 3 g/dl para ambas cadenas (IgA e IgG) como límite para el diagnóstico diferencial entre GMSI y MQ, atendiendo únicamente a su simplicidad⁶, mientras que la IMF propone diferenciar las gammopatías IgA (corte en 2 g/dl) de las IgG (corte en 3 g/dl). La misma problemática existe en cuanto a la cuantía de proteinuria de Bence-Jones, la IMWG no considera un dintel específico mientras que la IMF establece un máximo de 1g/24 horas para discriminar entre una GMSI y un MQ.

Por tanto, el diagnóstico de GMSI requiere la existencia de un CM de pequeña cuantía (< 3g/dl para ambas cadenas, según la IMWG o <3g/dl para IgG y <2g/dl para IgA según la IMF) y una infiltración de CP <10%. El MQ, se sitúa en un punto intermedio entre las GMSI y el MM sintomático, precisa para su diagnóstico la presencia de un componente monoclonal superior al de la GMSI, y/o una infiltración de

CP mayor de 10%. En ambos casos la ausencia de sintomatología “CRAB” es requisito indispensable. (tablas 2 y 3).

Tabla 2. Criterios diagnósticos de GMSI

-
1. Presencia de componente monoclonal en sangre y/u orina en baja cuantía^a
 2. Infiltración medular de células plasmáticas <10%
 3. Creatinina, hemoglobina y calcio sérico en rango normal.
Ausencia radiológica de lesiones óseas.
Sin evidencia clínica o analítica de amiloidosis y enfermedad por depósito de cadenas ligeras.
-

^aDefinido por: Componente sérico <3,0 g/dl, cadenas ligeras en orina <1,0 g/24 h

Tabla3. Criterios diagnósticos de mieloma quiescente

-
1. Presencia de componente monoclonal en sangre y/u orina ≥ 3 g/dl
Y/O
 2. Infiltración medular de células plasmáticas >10%
 3. Creatinina, hemoglobina y calcio sérico en rango normal.
Ausencia radiológica de lesiones óseas.
Sin evidencia clínica o analítica de amiloidosis y enfermedad por depósito de cadenas ligeras.
-

*Incluyen el mieloma estadio IA de la clasificación de Durie/Salmon

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE GMSI y MQ

La GMSI es una de las alteraciones premalignas más frecuentes en los países desarrollados, con una incidencia de 1-3% de los adultos mayores de 50 años en Europa, Estados Unidos (EEUU)^{8,9} y Japón¹⁰. La incidencia aumenta con la edad^{3,8}, es dos veces superior en africanos y afroamericanos que en raza caucásica^{11,12} y menos frecuente en asiáticos¹³. En un reciente estudio poblacional dirigido a conocer la prevalencia de la GMSI, Kyle y cols.³ estudiaron el 77% de la población mayor de 50 años de Minnesota (EEUU), identificando una GMSI en el 3,2% de los individuos estudiados, con una incidencia discretamente mayor en el sexo masculino. En dicho estudio se observó un aumento de la prevalencia en relación con la edad, alcanzando el

5,3% en mayores de 70 años y superando el 7% en mayores de 85 años. La frecuencia en afroamericanos fue 3 veces superior a la de los individuos de raza caucásica.

Por otra parte, el MM es el segundo cáncer hematológico más frecuente tras los linfomas, representando aproximadamente el 10% de las neoplasias sanguíneas y el 1% de todas las neoplasias¹⁴. La incidencia estimada es de 4-6 casos por 100000 habitantes/año, con 19920 nuevos casos y 10690 defunciones por MM registradas en EEUU en el año 2008¹⁵⁻¹⁷. En España, el INE ha estimado que en el año 2007 se produjeron 1584 defunciones por MM (794 en hombres y 790 en mujeres). La mediana de edad de presentación del MM es de 70 años y aproximadamente un 15% de los pacientes son menores de 60 años¹⁶. Respecto al MQ, la falta de homogeneidad en los criterios diagnósticos impide una estimación fiable sobre su incidencia, aunque se considera que hasta un 15% de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico son, en realidad, asintomáticos^{18,19}.

1.1.3. ETIOPATOGENIA DE LAS GMSI

1.1.3.1 Factores genéticos

La etiología de las gammopatías monoclonales es desconocida^{2,20}. Sin embargo, algunos estudios poblacionales parecen mostrar cierta predisposición genética para la GMSI y el MM. Se observa una clara diferencia racial, con una mayor incidencia en raza negra (3 veces superior) que en raza blanca para desarrollar GMSI y MM¹², aunque en riesgo acumulado de progresión de una GMSI a un MM es similar en ambos grupos. Asimismo, la incidencia de GMSI en una amplia población japonesa de supervivientes a la bomba atómica fue de 2,4%¹³, inferior al 3,2% observado por Kyle³ en la población

de Minnesota. Por el momento, se desconoce si estas diferencias son realmente de causa genética o hay factores medioambientales adicionales implicados.

Parece observarse cierta asociación familiar en el desarrollo de GM. Lynch²¹ ha publicado la existencia de 5 casos de MM y 3 de GMSI en una familia de afroamericanos a lo largo de tres generaciones. Se han realizado algunos estudios poblacionales en los se observa un riesgo incrementado de desarrollar GMSI entre familiares de primer grado de individuos afectados de MM²² o de linfoma linfoplasmocítico/Macroglobulinemia de Waldeström (LL/MW)²³. En un estudio sobre una amplia población sueca (73000 individuos), Landgren halló en familiares de primer grado de individuos diagnosticados de GMSI un riesgo 3 veces superior de desarrollar GMSI, 4 veces superior de LL/MW y 2 veces superior de LLC²⁴. Estos datos parecen indicar que existe una susceptibilidad genética común, unas influencias medioambientales compartidas o una interacción entre ambas que favorecen el desarrollo, no solo de GMSI, sino también de determinados síndromes linfoproliferativos.

Algunos autores han comunicado la existencia de asociación entre el MM y tumores de otras localizaciones anatómicas, tales como cáncer de próstata o melanoma^{25,26}. Además, recientemente se ha sugerido, en un estudio sobre veteranos de EEUU, que determinadas entidades de tipo inmunológica, tales como infecciones (hepatitis, meningitis, etc...), procesos inflamatorios (glomerulonefritis, síndrome nefrótico, osteoartritis), o enfermedades autoinmunes (polimiositis/dermatomiositis, esclerosis múltiple, espondilitis anquilopoyética, etc...), pueden actuar como desencadenantes para el desarrollo de GMSI o MM²⁷.

1.1.3.2 Factores ambientales

La radiación es un factor leucemógeno bien conocido, si bien la relación entre la exposición a radiaciones ionizantes y el desarrollo de gammapatías monoclonales no está clara. En algunos estudios epidemiológicos ocupacionales en trabajadores de centrales nucleares²⁸⁻³¹ parece observarse cierta asociación entre la dosis de radiación recibida y el riesgo de desarrollar MM. En uno de estos estudios, sobre población francesa, el incremento fue más evidente cuanto mayor fue la edad a la que los individuos se expusieron a la radiación²⁹. Sin embargo, en la serie de Iwanaga³² realizada sobre supervivientes de la bomba atómica de Nagasaki (>50.000 individuos), la incidencia de gammapatías fue mayor si la exposición se producía antes de los 20 años. En ese mismo sentido, un estudio realizado sobre individuos que recibieron radioterapia para el tratamiento de neoplasias de cabeza y cuello, pudo constatar un riesgo incrementado de desarrollar MM si el tratamiento se había realizado previo a los 44 años³³. Estas discrepancias pueden deberse al diferente tipo de radiación recibida: acumulación de dosis bajas y de manera crónica, como la de los trabajadores de la industria nuclear, frente a exposición a altas dosis y de forma puntual en supervivientes de una catástrofe nuclear o aquellos sometidos a tratamientos oncológicos.

La utilización de determinados pesticidas en agricultura podría tener asociación con el desarrollo de gammapatías. Landgren³⁴ ha observado una incidencia de 6% de GMSI entre individuos que manejan de manera habitual estos productos, superior al 3,2% comunicado por Kyle³.

Más recientemente, se ha observado que mujeres con obesidad presentan un riesgo casi dos veces superior de desarrollar GMSI, frente a las de peso normal, lo que podría sugerir un papel de la obesidad en la etiopatogenia del MM³⁵.

1.1.3.3 Mecanismos de progresión

El mecanismo de transformación de GMSI a MM es desconocido^{2,36}. Sin embargo, se conoce que en este proceso no solo está implicada la célula plasmática mielomatososa, sino también existen alteraciones en el micromedioambiente medular, incluyendo modificaciones en la angiogénesis, supresión de inmunidad celular, y desarrollo de señalización paracrina (alterando citocinas como la interleucina-6 y el VEGF -factor de crecimiento del endotelio vascular)^{37,38}.

Se ha sugerido la existencia de uno o más eventos oncogénicos capaces de provocar inestabilidad cromosómica provocando, como resultado, el desarrollo de una GMSI^{39,40}. De hecho, mediante FISH de interfase, se ha observado que aproximadamente la mitad de los pacientes con GMSI poseen un cariotipo aneuploide (hiperdiploide mayoritariamente)^{41,42}. Casi todas las alteraciones genéticas observadas en el MM son reproducibles en individuos con GMSI^{41,43}. En la mitad de los pacientes con GMSI, se han detectado traslocaciones que afectan al locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14q32, características del MM, y en menor frecuencia alteraciones como: t(11;14) (ciclina D1), t(4;14) (FGFR-3 y MMSET), t(6;14) (ciclina D6), t(14;16) (cmaf) y la t(14;20) (mafB)^{44,45}. Por otro lado, el micromedioambiente medular juega un papel en el desarrollo de las gammopatías monoclonales³⁸, habiéndose observado que el grado de angiogénesis aumenta en cada uno de los diferentes estadios de las gammopatías (GMSI, MQ y MM)^{38,46}. El conocimiento del micromedioambiente celular ha contribuido al desarrollo y utilización de fármacos como el bortezomib, talidomida o lenalidomida⁴⁵.

1.1.4 EVOLUCIÓN NATURAL DE LA GMSI y MQ

Se ha comprobado que la causa de muerte en la mayoría de los individuos diagnosticados de GMSI no es atribuible a su GM^{9,47-52}. El fallecimiento ocurre, al igual que en la población general, por patología de origen cerebrovascular, cardiopatía isquémica o neoplasia de origen no hematológico^{2,47}, probablemente en relación con la naturaleza indolente de la GM y la avanzada edad de los individuos afectados. Sin embargo, parece observarse que la incidencia de estas patologías es superior en pacientes diagnosticados de GMSI⁴⁷, siendo la tasa de mortalidad en las GMSI casi el doble de la esperada para la población general de la misma edad, aunque la progresión a MM únicamente permite explicar una quinta parte de ese incremento. Conviene ser cautos en la interpretación de estos resultados puesto que la mayor parte de los estudios se han realizado en ámbito hospitalario, por lo que existe un importante sesgo de selección.

En general, se estima que el riesgo de transformación de las GMSI a una patología maligna (MM, amiloidosis, linfoma, MW o síndrome linfoproliferativo) se sitúa en torno a un 1% anual^{3,48,48}. La mayor parte de los pacientes que progresan lo hacen a MM (70%), en menor medida MW o amiloidosis (11 y 12%, respectivamente) y una minoría acaba desarrollando un síndrome linfoproliferativo⁴⁹. Es necesario tener en cuenta que el riesgo no disminuye con el tiempo y que la probabilidad de transformación se mantiene hasta de 25 años después del diagnóstico⁴⁹, lo que hace necesario un seguimiento de por vida.

A diferencia de la GMSI, el riesgo de progresión del MQ a MM no es constante a lo largo del tiempo. El riesgo estimado de progresión en los primeros 5 años se sitúa en torno a un 10% anual^{19,53} y disminuye progresivamente hasta situarse en un 1% a los diez años del diagnóstico⁵³. En general la mediana del tiempo hasta la progresión se

sitúa entre 2 y 3 años^{19,53,54}. En los pacientes que no progresan a MM, la causa de muerte, al igual que en las GMSI, es de origen cardiovascular y neoplasias no hematológicas⁵³.

Otros problemas de salud relacionados con las GM.

Aunque de baja frecuencia, existen otros problemas de salud asociados a las gammopatías monoclonales que pueden afectar a la calidad de vida del individuo, por lo que conviene tenerlos en cuenta en el seguimiento del paciente:

- **Afectación ósea:** Las GMSI se han asociado con osteoporosis y problemas óseos, especialmente aplastamientos vertebrales⁵⁵⁻⁵⁷. Recientemente, Kristinsson⁵⁸ en un estudio sobre 5326 pacientes con GMSI ha comprobado que existe un riesgo desarrollar fracturas a 5 años 1,7 veces superior a la población sana. El riesgo es mayor en esqueleto axial (cráneo, esternón, vertebral y pelvis) que en huesos distales (humeros y fémures) y no asociado a un tipo concreto de Ig. Además, se ha comprobado en biopsias óseas de pacientes con GMSI, que presentan alteración en la degradación ósea⁵⁹, con incremento de marcadores de reabsorción^{60,61}.
- **Neuropatía periférica (NP):** aproximadamente un 10% de los individuos con NP tienen asociada una GM⁶². En un estudio poblacional comunicado por Bida et al.⁵⁶, no se observaron diferencias en la incidencia de neuropatía periférica entre población sana e individuos con GMSI, por lo que los autores consideran que entre los pacientes con GMSI, la NP no tiene relación con la misma⁵⁶.
- **Riesgo tromboembólico:** Parece asociarse un incremento del riesgo de desarrollo de trombosis tanto venosas (trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar)^{63,64} como arteriales (enfermedad coronaria y accidente

cerebrovascular)⁶⁵ en individuos con GM. Kristinsson⁶⁵ ha comunicado que el riesgo de desarrollar trombosis venosas a 1, 5 y 10 años fue 3,4; 2,1 y 2,1 veces superior en individuos con GMSI, mientras que el riesgo de trombosis arterial fue de 1,7; 1,3 y 1,3, para los mismos años respectivamente, lo que se asoció a una supervivencia inferior no relacionada con la progresión a MM. Sin embargo, la anticoagulación de rutina no está indicada⁶⁶, aunque es importante tener presente el incremento del riesgo tromboembólico en pacientes con GMSI.

1.1.5 PREDICTORES DE PROGRESIÓN EN GMSI Y MQ

En el momento del diagnóstico de una GMSI o un MQ no es posible identificar con seguridad aquellos pacientes que van a progresar o los que se mantendrán estables durante años. Por tanto, es necesario identificar los factores de riesgo que permitan discriminar pacientes con diferentes riesgos de progresión.

1.1.5.1 Factores de riesgo de progresión en GMSI

Los factores asociados con un riesgo aumentado de progresión en las GMSI son:

➤ *Componente monoclonal:* En una amplia serie de 1384 pacientes con GMSI, la cuantía de componente monoclonal fue el parámetro más importante para predecir la progresión a MM⁴⁸, con un riesgo dos y cuatro veces mayor para un CM >1,5 g/dl y >2,5 g/dl, respectivamente, respecto a los casos con CM <0.5g/dl. Así, el riesgo de progresión a los 20 años fue de 14% si el CM inicial era de <0,5 mg/dl, 25% si el CM inicial era entre 0,5-1,5 g/dl y de 49% en los casos con un CM inicial >2,5 g/dl. Otros factores adversos relacionados con el CM son el tipo IgA^{48,50,67} y la existencia de un descenso de las inmunoglobulinas no clonales, lo que se ha denominado inmunoparesis⁵².

➤ *Infiltración medular:* Varios autores han comunicado que el grado de infiltración de la médula ósea por CP evaluado mediante morfología convencional es un factor de riesgo independiente de progresión a enfermedad sintomática^{52,68}. Una infiltración <5% de CP identifica pacientes con bajo riesgo de progresión frente a aquellos con una infiltración superior^{52,68,69}.

➤ *Relación anormal de cadenas ligeras libres en suero:* Recientemente, Rajkumar ha comunicado que una relación anormal de las cadenas libres (“free light chain” en sus siglas en inglés -FLC-) en suero implica un aumento del riesgo de progresión a MM⁶⁷. La determinación de FLC se realiza mediante una técnica altamente sensible para la detección de cadenas ligeras en suero, de reciente incorporación a la rutina asistencial⁷⁰. La técnica permite cuantificar las cadenas libres kappa y lambda en suero secretadas por las CP. Tomando como referencia normal una relación κ/λ entre 0,26-1,65 existirá clonalidad κ si la relación es superior al rango normal o λ si la relación es inferior. En este trabajo⁶⁷, el riesgo de progresión a MM se sitúa en un 17% a los 10 años en aquellos pacientes con relación anormal de FLC, frente a un 5% si la relación κ/λ es normal. Rajkumar propone un sistema de estratificación del riesgo de progresión basándose en 3 parámetros: la relación FLC, el tipo de cadena pesada y la cantidad de CM, que permite identificar claramente individuos con diferente riesgo de progresión. Los pacientes con una relación anormal de FLC, GMSI de cadena IgA y un componente superior a 1,5g/dl, presentaron un riesgo de progresión a los 20 años del 58% frente a solamente un 5% en aquellos pacientes con ausencia dichos parámetros⁶⁷.

➤ *Identificación de CP en sangre periférica:* Kumar y cols.⁷¹ han comunicado que la detección de CP clonales circulantes en sangre periférica, mediante técnicas de microscopía de inmunofluorescencia permite identificar a individuos con un mayor riesgo de progresión a MM, sin embargo, estos datos no han sido confirmados

por otro autores⁷². Además, la metodología empleada en este trabajo (marcaje de κ y λ mediante inmunofluorescencia directa sobre capa mononuclear de sangre periférica en preparaciones de citocentrífuga) no permite una clara discriminación entre CP y linfocitos, por lo que la utilidad de estos resultados deben tomarse con cautela.

1.1.5.2 Factores de riesgo de progresión en MQ

En el caso del MQ el riesgo de progresión MM es considerablemente superior al de las GMSI y los factores que condicionan un mayor riesgo de progresión son similares.

➤ *Componente monoclonal:* en una revisión sobre 276 pacientes que cumplieran los criterios diagnósticos de MQ, Kyle⁵³ observó un incremento del riesgo de progresión si el CM era superior a 4 mg/dl ($p < 0,001$), este dato ha sido corroborado por otros autores^{73,74}. Además, la presencia de un CM de tipo IgA y la detección de proteinuria de Bence-Jones se han asociado con un pronóstico adverso^{68,73,75-77}. Recientemente, Bladé⁷⁵ ha comunicado, la existencia de dos tipos de MQ en función de la evolución del CM. Los MQ “evolving” serían aquellos casos que muestran un incremento progresivo y constante en el tiempo del CM, frente a los “no-evolving” que mantienen un CM estable, con un tiempo hasta progresión de 1,3 y 3,9 años, en cada grupo, respectivamente ($p = 0,007$).

➤ *Infiltración medular:* ha sido uno de los parámetros más variables para el diagnóstico del MQ. En general, todas las publicaciones parecen indicar que el riesgo de progresión se incrementa proporcionalmente con el porcentaje de infiltración. Así, tanto para Kyle⁵³ como para Cesana⁶⁸, aquellos individuos con $>10\%$ de CP presentan un riesgo incrementado de progresión. Kyle⁵³ ha identificado 3 grupos pronósticos en función del CM y la infiltración medular, con un riesgo de progresión a los 5 años de un

69%, 42% y 15% para pacientes con infiltración $\geq 10\%$ de CP y ≥ 3 g/dl de CM, ≥ 10 y < 3 g/dl de CM y $< 10\%$ y ≥ 3 g/dl, respectivamente.

➤ *Relación anormal de cadenas ligeras libres en suero:* Al igual que en pacientes con GMSI, Dispenzieri⁵⁴ ha observado como la relación anormal de FLC se asocia a un mayor riesgo de progresión, y propone un sistema de estratificación en función de la presencia de la infiltración medular ($\geq 10\%$), el CM (≥ 3 g/dl) y la relación de FLC (< 0.125 para MQ lambda o > 8 para MQ kappa), con una probabilidad acumulada de progresión a los 10 años de 50%, 65% y 84% para los pacientes con uno, dos o tres factores adversos ($p=0,001$).

➤ *Presencia de lesiones líticas en resonancia magnética nuclear (RMN):* Uno de los criterios definitorios de la enfermedad mielomatosa es la aparición de destrucción ósea detectada mediante radiología convencional, por lo tanto, los individuos diagnosticados de MQ deben presentar un patrón radiológico normal. Sin embargo, se ha observado que en estos pacientes, la RMN permite la identificación de lesiones líticas ocultas, no visibles por radiología convencional, y este hallazgo se asocia con un incremento del riesgo de desarrollar un MM, con una mediana de tiempo hasta progresión de 21 meses para individuos con lesiones líticas detectadas mediante RMN frente a 57 meses para aquellos con un patrón normal de RMN⁷³, ($p<0,01$).

1.1.6 MANEJO DE LA GMSI Y EL MQ

Parece claro que dada la posibilidad de desarrollar un trastorno linfoproliferativo en los individuos diagnosticados de GM, se hace necesario un seguimiento de por vida. Sin embargo, no hay consenso en cuanto a si se debería realizar programas de detección precoz o el modo de proceder una vez diagnosticada la población⁶⁶. Recientemente se

han publicado diferentes guías de diagnóstico y manejo de las GMSI^{66,78,79}. En ellas se hace hincapié en dos puntos básico: las determinaciones necesarias ante un CM y la actitud a seguir con los pacientes.

➤ *Determinaciones necesarias ante una gammapatía monoclonal.*

1.1. Al diagnóstico

El objetivo fundamental al diagnóstico es descartar la existencia de enfermedad mielomatososa activa o de síndrome linfoproliferativo. Las determinaciones necesarias en el momento inicial constarían de:

- a) Electroforesis sérica y urinaria, con inmunofijación.
- b) Niveles de inmunoglobulinas séricas (para determinar la existencia de inmunoparesis).
- c) Determinación de cadenas ligeras en suero, que contribuirá a establecer el riesgo de progresión⁶⁷.
- d) Medulograma al diagnóstico: En la actualidad no existe consenso en la necesidad de su realización⁶⁶. La tendencia actual y la recomendación de las guías recientemente publicadas (IMWG⁷⁸, UK Myeloma Forum y Nordic Myeloma Study Group⁷⁹) es a la realización de un medulograma en individuos con alto riesgo de progresión (CM >1,5g/dl y relación FLC anormal)^{48,67}, o en aquellos individuos en los que exista sintomatología que haga sospechar enfermedad activa u otro SLP. Su indicación en el MQ está, sin embargo, plenamente establecida.
- e) Serie ósea metastásica: Permitirá identificar lesiones que indiquen enfermedad sintomática⁶⁶, la UKMF y la NMWG⁷⁹ no consideran necesaria su realización salvo en individuos con dolor óseo o en áreas óseas sintomáticas. Al igual que el medulograma, en el caso de los MQ, la serie ósea metastásica es requisito indispensable para completar el estudio inicial^{78,80,81}.

f) Pruebas complementarias de imagen: aunque se ha observado que la RMN de columna axial permite la determinación de lesiones óseas precoces⁸² con carácter pronóstico^{80,83}, su uso estaría únicamente indicado ante la existencia de dolor específico o situaciones muy particulares⁶⁶. En el caso de los MQ, la IMWG recomienda su realización a todos los pacientes, dada la capacidad para predecir el riesgo de progresión al detectar lesiones ocultas⁷⁸.

1.2. Estrategia de seguimiento

El propósito del seguimiento es tratar de identificar precozmente la transformación a enfermedad sintomática, cuando la enfermedad ósea, el fallo renal o las limitaciones del paciente son potencialmente reversibles⁷⁹. Se debe tener en consideración que el riesgo de progresión a MM o SLP se mantiene a lo largo de la vida del paciente aunque el CM se mantenga estable⁴⁸.

Además, el patrón de progresión es variable. La clínica Mayo identificó 4 posibilidades: CM estable hasta que se produce un incremento y se desarrolla el MM, incremento progresivo del CM desde el diagnóstico hasta el desarrollo de síntomas, incremento brusco junto con la aparición de síntomas “CRAB” o incremento de la infiltración en MO con CM estable⁴⁹. Por lo tanto, el seguimiento de los pacientes no debe ser únicamente analítico sino también clínico.

En cuanto a las GMSI, no existe un acuerdo en cuanto a la frecuencia de las revisiones, la tendencia actual es la estratificación del riesgo, en base al cual, se planificará el seguimiento del paciente. Así en aquellos con alto riesgo serían recomendables controles cada 3-4 meses, en caso de mantenerse estables se pueden espaciar las visitas anualmente^{19,66,78,79}. En aquellos con bajo riesgo, pueden ser suficientes controles cada 6 meses inicialmente y posteriormente de manera bianual^{19,19}. Para Bird⁷⁹, el manejo puede ser realizado por parte de los médicos de atención

primaria, e incluso recomienda controles esporádicos para aquellos con una esperanza de vida corta. Rajkumar⁸⁴, plantea estratificar el riesgo de los pacientes con GMSI en función de la cantidad de CM, el tipo de cadena pesada y la relación de FLC y realizar un seguimiento individualizado, semestral durante el primer año, y posteriormente controles anuales para los individuos con alto riesgo de progresión y bianuales para aquellos con bajo riesgo, en ambos casos de manera indefinida.

A pesar de estas recomendaciones, en una reciente revisión sobre el control evolutivo de los pacientes con GMSI realizada por Bianchi⁸⁵, el seguimiento permitió identificar únicamente el 16% de las progresiones durante el seguimiento clínico, mientras que el 45% de los diagnósticos se realizó en el contexto de las complicaciones relacionadas con la progresión de la enfermedad, a pesar de un correcto control. Por lo tanto, Binachi, considera que el seguimiento en pacientes con GMSI de bajo riesgo podría no ser necesario⁸⁵.

El alto riesgo de progresión del MQ implica la necesidad de seguimiento más estrecho, Rajkumar recomienda controles cada 3-4 meses^{19,86} hasta progresión. Mientras que la IMWG propone estratificar a los pacientes de manera similar a las GMSI, con revisiones cada 3-4 meses inicialmente y espaciar las visitas cada 4-6 meses durante el primer año, si el riesgo de progresión es bajo, y posteriormente controles anuales⁷⁸.

En cada visita es necesario historiar al paciente, un examen físico y realizar de determinaciones analíticas similares a las del diagnóstico (cuantificación del CM, inmunoglobulinas, etc...) ^{19,66,79}.

La repetición del medulograma sólo estaría indicada en el caso de aparición de signos o síntomas que sugieran progresión de la enfermedad⁶⁶. La reevaluación ósea en las GMSI estaría únicamente indicada si existe sospecha de progresión ósea (dolor,

fractura, pérdida de movilidad, etc....)⁶⁶. Por el contrario, en el caso de los MQ, sería recomendable control radiológico al menos una vez al año¹⁹.

➤ *Tratamiento*

Las áreas en las que se podría incidir en las GM serían: prevención de problemas óseos, fenómenos tromboembólicos y finalmente el tratamiento precoz.

a) *Manejo de los problemas óseos.*

Los individuos con GMSI presentan un riesgo de desarrollo de fracturas óseas y de pérdida de densidad ósea mayor que población control de su misma edad y sexo^{55,56,58}. Por ello, Berenson et al.⁶⁶ recomiendan tratamiento suplementario con calcio en individuos con osteopenia u osteoporosis y de suplementos con 25-hydroxivitamina D en individuos con déficit de vitamina D.

La utilización de terapia antirreabsortiva es más controvertida. Se ha comprobado como la utilización de bifosfonatos permite mejorar la densidad ósea en individuos con GMSI^{55,87}, sin embargo, ninguno de los estudios ha sido diseñado para hallar diferencias en la aparición de fracturas. En la actualidad, las guías internacionales no recomiendan la utilización de bifosfonatos en pacientes con gammapatías asintomáticas⁸⁸, a pesar de ello, Berenson⁶⁶ propone profilaxis con bifosfonatos durante al menos 5 años.

En cuanto al MQ, no existen recomendaciones formales en cuanto a la utilización de bifosfonatos. Un estudio italiano ha comprobado como el uso de pamidronato reduce significativamente el número de lesiones óseas⁸⁹, aunque no modifica el tiempo hasta progresión ni la supervivencia global. Posteriormente, el mismo grupo ha comunicado que el uso de ácido zoledrónico reduce significativamente las lesiones óseas en el momento de la progresión, aunque igualmente no modifica la

supervivencia global⁹⁰. Por lo tanto, la utilización de bifosfonatos puede suponer un beneficio potencial en pacientes con MQ, sin embargo, es preciso manejarlos con precaución para evitar efectos secundarios tales como la osteonecrosis de mandíbula o la hipocalcemia⁸⁰.

b) Riesgo tromboembólico

Diferentes estudios han comprobado como los individuos con GMSI presentan un riesgo incrementado de desarrollar trombosis venosa profunda^{65,91}, sin embargo, la anticoagulación de manera rutinaria no está recomendada⁶⁶.

c) Tratamiento precoz

El tratamiento precoz en individuos con GMSI no está indicado, salvo en el contexto de un ensayo clínico^{78,79,92}.

Respecto a los MQ, dado que la mediana de tiempo hasta progresión a MM es aproximadamente de 2 años¹⁹, diversos autores han valorado el efecto del tratamiento precoz en la evolución de la historia natural del MQ.

En la década de los 90 se publicaron 3 estudios comparando el tratamiento precoz frente a observación en individuos con MQ. Hjorth et al⁹³ valoraron el tratamiento precoz con melfalán-prednisona frente a observación en 50 pacientes con MQ. La respuesta al tratamiento en los pacientes tratados al diagnóstico fue similar a aquellos tratados en el momento de la progresión (52 vs. 55%), sin encontrar diferencias en la duración de la respuesta ni en supervivencia global. Otros dos estudios realizados posteriormente, de Grignani et al.⁹⁴ y Riccardi et al.⁹⁵, obtuvieron resultados similares con tratamiento precoz con melfalán y prednisona frente a abstención terapéutica.

El desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces en el MM ha abierto nuevas expectativas de uso en los MQ. Se han comunicado dos estudios fase II de tratamiento

con talidomida, de la Clínica Mayo⁹⁶ (29 pacientes) y el MD Anderson Cancer Centre⁹⁷ (28 pacientes), alcanzando una tasa de respuestas parciales de 34% y 36% respectivamente, sin embargo, en ambos casos con una considerable toxicidad relacionada con la medicación. Recientemente, Barlogie et al⁹⁸, ha publicado un estudio fase II en el que se incluyeron 76 pacientes con MQ tratados con talidomida 200 mg/día. Con un seguimiento de 4 años la tasa de respuestas parciales o superior fue de 42% (5% de remisiones completas) con una mediana de tiempo hasta mejor respuesta de 1 a 2 años. Nuevamente, la toxicidad relacionada con talidomida obligó a suspender el tratamiento al 50% de los pacientes y a reducirlo en otro 36%. Por lo tanto, y aunque el uso de talidomida parece retrasar el tiempo hasta progresión del MQ, su indicación es todavía prematura y no se puede recomendar su utilización hasta que demuestre beneficio en estudios aleatorizados^{80,96-98}.

Un reciente estudio de PETHEMA ha valorado el papel de la lenalidomida, análogo más potente de la talidomida, en la prevención del riesgo de progresión en MQ de alto riesgo (CM >3 gr/dl y >10 % de células plasmáticas o cualquiera de los anteriores más \geq 95% de células plasmáticas con fenotipo patológico en MO e inmunoparesis)⁹⁹. Con un seguimiento medio de 16 meses, se han observado 8 progresiones en el grupo control frente a ninguna en la rama de lenalidomida, con un perfil de seguridad adecuado.

Otros productos en fase de investigación para tratamiento precoz de MQ son Omega-3, Celecoxib o Anakinra (inhibidor de interleucina). Por el momento, ninguno de ellos ha demostrado beneficio con el tratamiento precoz en los pacientes afectos de MQ.

1.2 INMUNOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS

La CP representa el último estadio madurativo de la diferenciación linfoide B. Se caracteriza por la pérdida de expresión de algunos marcadores asociados a línea B, como inmunoglobulinas de superficie (sIg), receptor de complemento, antígenos HLA clase II y receptores Fc. Esta característica, sumada a su escasa representatividad medular (0,25%), ha condicionado algunas dificultades para la caracterización de la CP.

A continuación se exponen los antígenos más importantes en el estudio de la CP, que se pueden clasificar atendiendo a su función en: 1) moléculas que intervienen en la diferenciación y maduración de la CP; 2) receptores de citocinas; 3) moléculas de adhesión y de interacción célula-célula y 4) otras moléculas de interés.

1. Moléculas que intervienen en la diferenciación y maduración de la CP:

- a. *CD38*: Es una glicoproteína de membrana con actividad enzimática, que se encuentra ampliamente distribuido en todas las líneas hematopoyéticas¹⁰⁰. Sin embargo, las CP expresan CD38 con una intensidad muy superior al de otras poblaciones celulares, lo que permite su fácil identificación¹⁰¹⁻¹⁰⁶. En la mayoría de los casos la CP mielomatosa expresa CD38 de forma más débil que la CP normal¹⁰⁷.
- b. *CD19*: marcador pan-B, implicado en la diferenciación y activación de las células B y que está presente en la CP normal. Es negativo en la CP mielomatosa en el 98% de los casos¹⁰⁸⁻¹¹⁰.
- c. *CD20*: antígeno específico de línea B que se expresa en estadios intermedios de la maduración de célula B y se encuentra infra expresado en las CP normales. La CP mielomatosa lo expresa total o

parcialmente en un 20% de los casos de MM y en hasta un 50% en el caso de leucemias de CP^{108,111}.

- d. *CD45*: antígeno leucocitario común. Es una proteína tirosín-fosfatasa, necesaria para la activación y desarrollo de los linfocitos. Con la diferenciación de la CP disminuye de intensidad, siendo las CP mielomatosas mayoritariamente negativas¹¹². Sin embargo, algunos autores han correlacionado la expresión fuerte de CD45 con una alta capacidad proliferativa y alto grado de inmadurez de las CP^{107,113}.

2. *Receptores de citocinas: proteínas solubles producidas y secretadas por diferentes células hematopoyéticas incluidas las CP.*

- a. *Receptor de interleucina-6 (IL-6R)*: implicada en la diferenciación de los linfocitos B a células secretoras de Igs y en la proliferación de las CP¹¹⁴. La presencia de niveles elevados de IL-6 soluble se asocia con enfermedad activa y con un peor pronóstico^{115,116}.
- b. *CD117*: ligando c-kit o stem cell factor. Es un receptor tirosín-quinasa que se expresa en precursores mieloides, y con especial intensidad en mastocitos. En las CP mielomatosas se expresa en un 30% de los casos¹¹⁷.

3. *Moléculas de adhesión: favorecen la interacción del micromedioambiente medular con la célula, permitiendo una alta especialización del tejido y facilitando la transferencia de información*¹¹⁸⁻¹²³.

- a. *$\beta 1$ integrinas*: ligando de VLA-4 (CD29-CD49D), incrementa la secreción de IL-6 por las células estromales de la MO, induce proliferación y bloquea la apoptosis de las CP mielomatosas,

promueve la osteolisis al disminuir la osteoprotegerina. VLA-5 (CD49e) identifica CP maduras y su ausencia se correlaciona con inmadurez de las CP, alto grado de proliferación y resistencia a la quimioterapia.

b. *β 2 integrinas*: LFA-1 (CD11a-CD18) interacciona con ICAM-1 en las células estromales de la MO. Su expresión en CP mielomatosas se ha asociado con un alto crecimiento tumoral. LF-3 (CD58) estimula la secreción de citocinas por los linfocitos T, necesarias para el crecimiento de las CP mielomatosas. CD58 no se expresa en las CP normales.

c. *CD56*: molécula de adhesión (NCAM) perteneciente a la superfamilia de las Ig. Se expresa débilmente en las CP normales y es fuertemente positivo en las CP mielomatosas en la mayoría de los casos(>60% de los MM)^{102,124,125}. Es típicamente negativo en la leucemia de CP, por lo que se ha postulado que CD56 es un factor en la progresión de la enfermedad^{120,120,126}.

d. *CD138*: proteoglicano de superficie. Promueve la adhesión de las CP al colágeno tipo I y fibronectina. En la MO se expresa únicamente por las CP, tanto normales como patológicas¹²⁷. Se ha utilizado fundamentalmente para la identificación y purificación de las CP.

4. Otras moléculas de interés:

a. *CD28*: interviene en la activación de los linfocitos T y su interacción con los linfocitos B^{128,129}. Aproximadamente el 40% de las CP mielomatosas expresan CD40, siendo negativo en las CP normales¹³⁰⁻

- ¹³². Su función en el MM no es del todo conocida. Su sobreexpresión en las CP mielomatosas se ha relacionado con progresión de la enfermedad y mayor riesgo de recaída^{133,134}.
- b. *CD40*: presente en CP normales y en un 60% de las patológicas¹³⁰. Inhibe la apoptosis vía NFK β . Estudios recientes han planteado su utilidad como diana terapéutica mediante inhibidores de CD40¹³⁵.
- c. *CD86*: Se expresa en las células presentadoras de antígeno inmaduras no estimuladas. La sobreexpresión de CD86 en las CP mielomatosas se ha relacionado con un pronóstico adverso¹⁰⁷.
- d. *Marcadores de línea mieloide: CD13 y CD33*. Ambos antígenos se expresan de manera variable tanto en CP normales como patológicas^{110,136,137}. Su función en las CP es desconocida. Son marcadores útiles para el seguimiento de enfermedad mínima residual en un 15-30% de los pacientes con MM.

Diferencias fenotípicas entre la CP normal y la CP mielomatosa.

El fenotipo de las CP, tanto normal como mielomatosa, es variable estando condicionado en parte por el grado de diferenciación celular^{106,138}, sin embargo, existen rasgos fenotípicos característicos que nos permiten distinguirlas.

Comparada con las CP normales, las CP mielomatosas muestran una expresión disminuida de CD38, expresión intensa de CD56 y son negativas para CD19 y CD45^{108,139-141}. Otros antígenos también negativos (como CD117 y CD20) o que se expresan débilmente (CD28 y CD33) en las CP normales pueden tener una expresión fuerte hasta en un 25 % de las CP mielomatosas. (Figura 1)

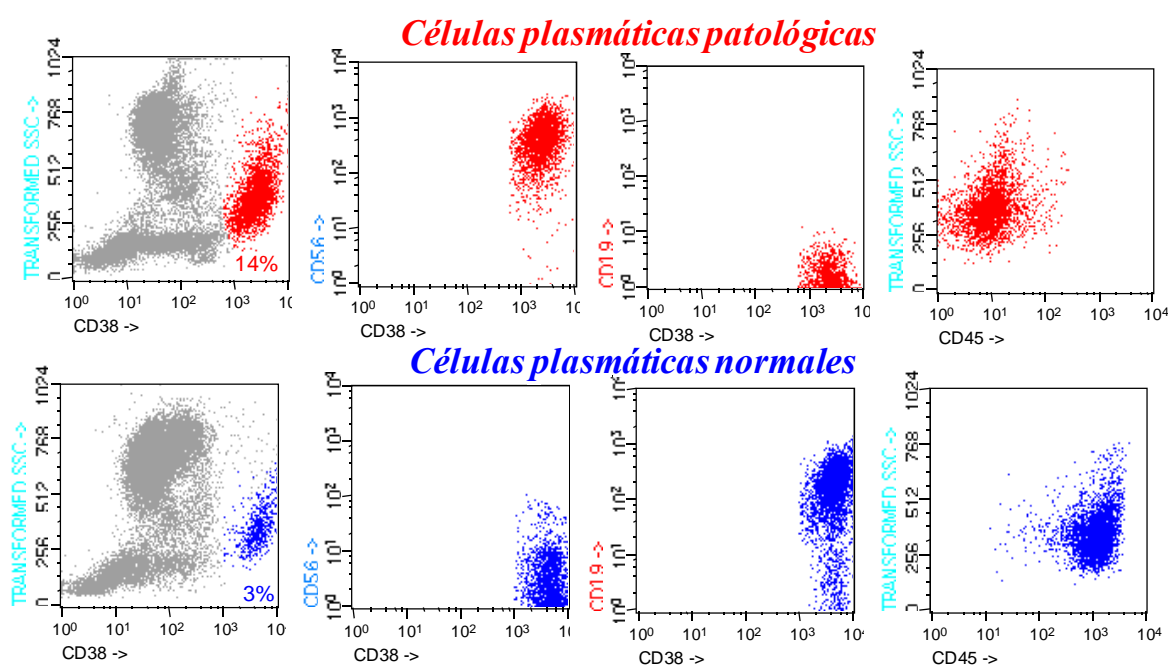


Figura 1: Características fenotípicas de las células plasmáticas en función de la expresión de CD38, CD56, CD19 y CD45. "Gate" de CD38: las imágenes superiores muestran el fenotipo de células plasmáticas con fenotipo patológico (rojo) con fuerte expresión de CD56 y negativas para CD19 y CD45. En las imágenes inferiores las células plasmáticas con fenotipo normal (azul) muestran las características fenotípicas opuestas; negativas para CD56 y positivas para CD19 y CD45.

Se ha comprobado como en el MM sintomático la mayoría de las CP de la MO se corresponden con CP clonales/mielomatosas¹⁰⁴, mientras que en las GMSI es frecuente observar la coexistencia entre CP normales y CP clonales, aunque la mayoría de ellas se corresponden con CP de fenotipo normal¹⁰⁸. Característicamente en las leucemias de CP y los plasmocitomas la expresión de CD56 se pierde mientras que se mantiene la expresión de CD45¹¹¹. (Figura 2)

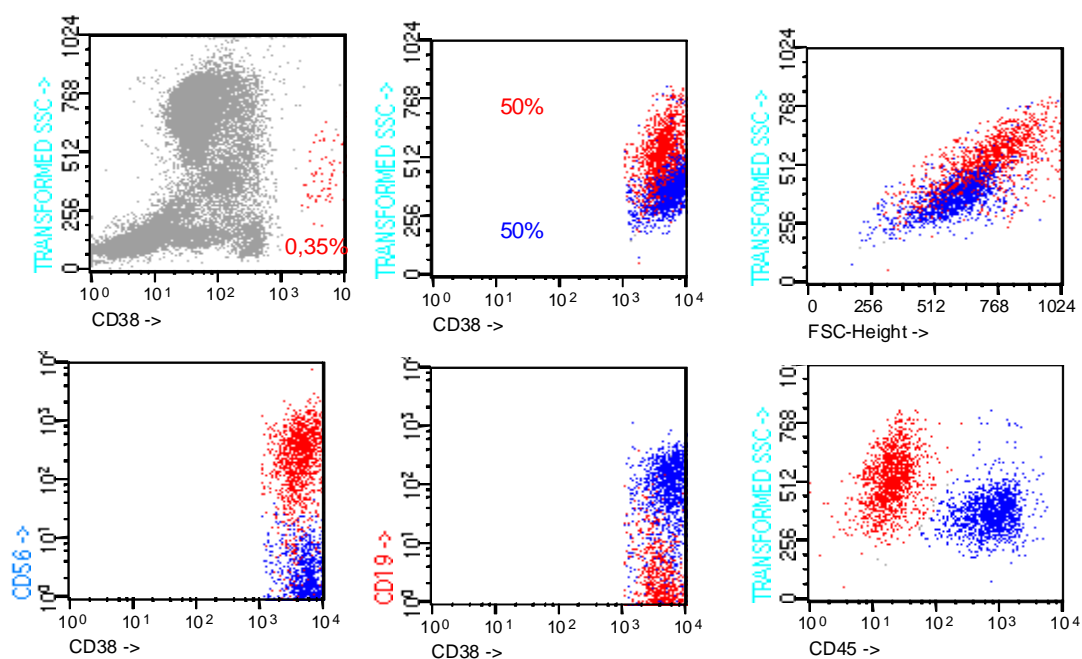


Figura 2: Identificación de las CP en un paciente con GMSI, con una infiltración por citometría de flujo de 0,35%. El "gate" por CD38 permite identificar las células plasmáticas con fenotipo patológico (CPP)(en rojo) de las normales (CPN)(en azul). Las CPP presentan mayor tamaño y complejidad (FSC y SCC) y tienen características fenotípicas opuestas., CD56⁺;CD19⁻; CD45⁻ para las CPP y CD56⁻;CD19⁺; CD45⁺ para las CPN.

1.3 CONTENIDO DE ADN EN LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Una de las primeras aplicaciones de la citometría de flujo (CMF) en las neoplasias hematológicas ha sido el estudio del contenido de ADN. La técnica se está basada en la capacidad que tienen algunos fluorocromos (naranja de acridina, 7-aminoactinomicina, yoduro de propidio, etc.) de unirse de forma estequiometría a los ácidos nucleídos, de manera que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ácido nucleído de la célula¹⁴².

La mayor parte de los estudios de ADN en gammapatías monoclonales se han realizado en MM sintomático, siendo más escasas las comunicaciones sobre GMSI, aunque datos preliminares no muestran diferencias significativas entre GMSI y MM^{143,144}.

La CMF permite el estudio de las fases del ciclo celular. Las células en fase G_0G_1 tienen una dotación de ADN $2n$, las células en fase G_2M $4n$, y las células en fase S tienen una dotación intermedia como resultado de la síntesis de ADN. Las fases G_2 y M poseen contenido tetraploide de ADN por lo que no pueden distinguirse mediante CMF. Se han desarrollado modelos matemáticos para determinar el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular¹⁴⁵⁻¹⁵⁰, con la ventaja respecto a la citogenética en que la CMF no precisa obtención de células en metafase para el estudio de ADN.

Además de ello, es posible la detección de anomalías clonales cuantitativas (aneuploidía de ADN). La ploidía estudiada por CMF expresa como índice de ADN, que se calcula mediante la razón entre la moda del canal de fluorescencia G_0/G_1 de la población de CP y el canal G_0/G_1 de las células normales residuales¹⁵¹. Si el índice de ADN es igual a 1, se considera que las células tumorales son diploides, mientras que si es diferente de 1, el ADN celular se considera aneuploide (hiperdiploide si el índice $ADN > 1$ o hipodiploide si en índice de $ADN < 1$).

1.3.1 Ploidía de ADN en el Mieloma Múltiple

Aproximadamente un 60% de los pacientes con mieloma de nuevo diagnóstico presentan contenido aneuploide de ADN¹⁵², siendo la mayoría de tipo hiperdiploide (83%)^{108,153,154}. Los casos de hipodiploidía¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ y biclonales (presencia de dos poblaciones celulares con diferente contenido de ADN)^{154,156} tienen una incidencia significativamente más baja.

La determinación de la ploidía tiene significado pronóstico en el MM, ya que los casos no-hiperdiploides se asocian con enfermedad más agresiva, especialmente los hipodiploides, con una respuesta pobre al tratamiento y una supervivencia más corta^{143,157-160}. En este sentido cabe descartar la alta incidencia de hipodiploidía en la leucemia de células plasmáticas¹⁶¹, entidad de muy mal pronóstico¹⁵³.

1.3.2 Ciclo Celular en el Mieloma Múltiple

Como ya se ha comentado, la CMF permite de manera sencilla conocer la distribución de las células en distintas fase del ciclo celular. En el caso del MM, y teniendo en cuenta que las CP son porcentualmente minoritarias en la MO, es preciso realizar un marcaje doble con yoduro de propidio y antígenos propios de membrana de CP (CD38 y CD138) para poder realizar el análisis del ciclo celular exclusivamente sobre las CP. Se ha comprobado que los mielomas con alta actividad proliferativa (fase S elevada) se asocian con estadios avanzados¹⁶² y son considerados de alto riesgo¹⁶³, siendo un factor pronóstico importante en pacientes de edad avanzada. Incluso en la era de los nuevo fármacos como el bortezomib¹⁶⁴ la presencia de una fase S elevada se asocia con un tiempo hasta progresión significativamente más corto¹⁶⁵.

Otras de las técnicas utilizadas para la determinación de la actividad proliferativa de las CP es la técnica conocida como “*labelling index*”. Esta técnica utiliza marcaje radioactivo (timidina tritiada) que se incorpora al ADN durante la fase de síntesis, proporcionando una información más dinámica del ciclo celular. Aunque ha demostrado utilidad como factor pronóstico en el MM, su uso está muy limitado debido su laboriosidad y el empleo de sustancias radioactivas¹⁶⁶.

1.4 UTILIDAD CLÍNICA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

En los últimos años, la CMF se ha incorporado progresivamente al estudio de las gammapatías monoclonales. La estrategia se basa principalmente en la identificación de CP y análisis posterior del compartimento específico de CP de la MO, diferenciando CP normales y patológicas gracias a la detección de fenotipos aberrantes de las CP

mielomatosas que están presentes en más del 90% de los MM y que permiten discriminarlas de las CP normales^{137,166}.

Las aplicaciones fundamentales de la CMF en el estudio de las gammopatías monoclonales se han desarrollado en tres campos principales: diagnóstico diferencial entre gammopatías monoclonales, identificación de factores pronóstico en el momento del diagnóstico y la monitorización de enfermedad mínima residual.

1.5.1 Diagnóstico diferencial de gammopatías monoclonales

El diagnóstico diferencial entre una GMSI y MM generalmente es sencillo. La realización de un hemograma, función renal, calcio, proteinograma y serie ósea metastásica permiten identificar la mayoría de los casos con MM sintomático. Sin embargo, la existencia de comorbilidades como insuficiencia renal, osteoporosis o anemia de origen multifactorial, habituales en pacientes de edad avanzada pueden dificultar el diagnóstico diferencial entre una gammopatía asintomática y un mieloma múltiple.

En este sentido, Ocqueteau et al.¹⁰⁸ han comunicado que la proporción entre CP con fenotipo patológico (CPP) y CP de fenotipo normal (CPN) dentro del compartimento de CP de la MO es el mejor parámetro individual para distinguir entre GMSI y MM. En la gran mayoría de los MM las CP policlonales (normales) están prácticamente ausentes, mientras que en las GMSI persiste un porcentaje elevado de CP fenotípicamente normales.

Aunque en el momento actual la CMF no forma parte de los criterios diagnósticos de las GM, algunas guías clínicas recomiendan su uso en determinadas circunstancias, como en casos de difícil diagnóstico con una infiltración de CP menor de 10%¹⁶.

1.5.2 Identificación de factores pronósticos

La cuantificación de las CP en MO mediante morfología convencional es una prueba básica para el diagnóstico del MM⁶. Sin embargo, el patrón de infiltración de la MO por las CP mielomatosas es heterogéneo, lo que condiciona una considerable variabilidad cuando a su determinación¹⁶⁷. Paiva et al.¹⁶⁸ han comparado la infiltración de CP en MO mediante morfología convencional y CMF en pacientes con MM sintomático, observando una correlación entre ambas técnicas. Aunque la infiltración detectada mediante morfología convencional fue porcentualmente superior, el porcentaje de infiltración detectado mediante CMF tenía mayor impacto pronóstico.

Además, la detección mediante CMF de $\geq 5\%$ de CP con fenotipo normal en pacientes con MM sintomático de nuevo diagnóstico permite identificar un subgrupo de pacientes con mejor pronóstico, caracterizado por menor frecuencia de inmunoparesis, de anomalías genéticas de pronóstico adverso y una supervivencia libre de progresión más alta¹⁶⁹.

Todos estos datos apoyan la utilización de la CMF en la rutina clínica para el diagnóstico del MM.

1.5.3 Enfermedad mínima residual

En la mayoría de las neoplasias hematológicas, la respuesta al tratamiento inicial es un factor pronóstico, con mayor supervivencia para aquellos pacientes que alcanzan una respuesta óptima. El ejemplo paradigmático es la leucemia mieloide crónica, en la que la remisión hematológica, citogenética y molecular define grupos pronósticos¹⁷⁰. La identificación de células patológicas residuales resistentes al tratamiento, no detectadas por técnicas citológicas convencionales, se ha denominado “Enfermedad Mínima Residual” (EMR). Dentro de las neoplasias hematológicas, el estudio de EMR está más

estandarizado en leucemias agudas, donde se ha descrito que la EMR positiva tras el tratamiento implica un mayor riesgo de recaída¹⁷¹⁻¹⁷⁴. En el contexto del MM, el estudio de EMR actualmente se considera investigacional¹⁷⁵, aunque la generalización del trasplante autólogo y la mayor eficacia de los nuevos tratamientos hace que uno de los objetivos del tratamiento sea la búsqueda de la “remisión completa estricta” (RC estricta), definida por la “*International Myeloma Working Group*” como ausencia de CM mediante inmunofijación, normalización de las FLC y la ausencia de CP clonales residuales en MO, estudiadas mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia¹⁷⁶. Sin embargo, cabe señalar que tanto la inmunohistoquímica como la inmunofluorescencia (IF) son técnicas mucho menos sensibles que la CMF, puesto que utilizan para la identificación de CP patológicas el cociente κ/λ , lo que implica ante una mínima población de CP clonales, estas pueden quedar ocultas entre las CP normales y no serían identificadas. Por el contrario, el análisis multiparamétrico mediante CMF basándose en patrones fenotípicos aberrantes, permite alcanzar mayores niveles de sensibilidad.

Las técnicas más empleadas para el estudio de EMR son la biología molecular y los estudios inmunofenotípicos mediante marcajes múltiples con técnicas de CMF.

La biología molecular se ha considerado como el “*gold Standard*” para el estudio de EMR en el MM. La mayor parte de los estudios comunicados se basan en estudios de PCR cualitativa de los reordenamientos de VDJH con oligonucleótidos alelo-específicos (ASO-PCR), que presentan una alta sensibilidad de hasta 10^{-6} ¹⁷⁷. Se trata de técnicas complejas y costosas que dificultan su uso en la rutina clínica. Presentan dos problemas fundamentales: el primero, que sólo un 70-80% de los pacientes presentan una región VDJH amplificable debido a la presencia de mutaciones somáticas en los genes IgH¹⁷⁸, y el segundo que, paradójicamente, debido a su alta

sensibilidad, la mayor parte de los casos estudiados mediante técnicas de PCR cuantitativa no alcanzan nunca la negativización, lo que dificulta la interpretación de los resultados^{179,180}.

Aunque se ha propuesto soluciones para solventar estos problemas, como el empleo de reordenamientos incompletos de DJH¹⁸¹ y utilización de PCR cuantitativa en tiempo real -ASO-RQ-PCR, con buenos resultados^{181, 177,182,183} no se pueden considerar aún técnicas aplicables en la rutina clínica.

En los últimos años, la CMF multiparamétrica se ha perfilado como una técnica útil para el estudio de EMR en el MM. El empleo de marcadores que permiten identificar las CP dentro de las células hematopoyéticas de la MO (como el CD38 o el CD138) y la caracterización de fenotipos aberrantes que permiten discriminar entre CP normales y patológicas dentro del compartimento de la CP de la MO¹⁰⁸, han contribuido a la incorporación de la CMF en los laboratorios clínicos para el estudio de la EMR en el MM.

Algunos estudios comparativos entre PCR y CMF han demostrado que la PCR es una técnica más sensible cuando se emplean citómetros de flujo convencionales (10^{-6} vs. 10^{-4})^{184,185}. Sin embargo las nuevas generaciones de citómetros de flujo gracias a su capacidad de analizar un gran número de células en periodos de tiempo cortos, a la mejor caracterización de las poblaciones celulares estudiadas, y a la posibilidad de marcaje simultáneo con 6-8 colores, van a permitir un importante incremento de la sensibilidad, alcanzando niveles similares a la PCR¹⁸⁶. Además, la CMF tiene mayor aplicabilidad que la PCR, dado que los fenotipos aberrantes se encuentran en el 90% de los MM, mientras que las técnicas de PCR sólo son aplicables al 75% de los casos¹⁸⁴. Otras ventajas de la CMF frente a la biología molecular es la relativa sencillez del procesamiento de las muestras y la rapidez en la obtención de resultados, la información

complementaria que se obtiene del resto de las células de la MO y el hecho de no requerir el diseño de “primers” específicos para el seguimiento de cada paciente^{166,186-188}.

En el momento actual, el trasplante autólogo forma parte del tratamiento inicial en pacientes jóvenes con MM¹⁸⁹⁻¹⁹⁴. En este sentido, Paiva¹⁷⁵ ha comunicado que la detección de EMR positiva mediante CMF en el día +100 del trasplante autólogo es un factor pronóstico independiente para supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con MM sintomático. Otros autores han corroborado estos hallazgos, confirmando que la obtención de EMR negativa tras trasplante autólogo incrementa la supervivencia libre de progresión^{187,195}. Además, esta estrategia también puede aplicarse a los productos de aféresis que se emplean como fuente de progenitores hematopoyéticos en el autotrasplante. Las CP pueden estar presentes en SP además de MO¹¹² y podrían aumentar en respuesta estímulos como los protocolos de movilización¹³⁶, lo que contribuiría a favorecer la infusión de CP mielomatosas¹⁹⁶. Aunque la biología molecular ha sido la técnica más utilizada para el estudio de contaminación de los productos de aféresis de MM, también la CMF ha realizado aportaciones en este campo¹⁹⁶. Hasta el momento, sin embargo, no existen estudios en la literatura sobre la implicación clínica de la contaminación de los productos de aféresis.

Hipótesis y Objetivos

La gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y el mieloma quiescente (MQ) se consideran estadios precoces del mieloma múltiple (MM), con un riesgo de progresión anual del 1% para las GMSI y el 10% para el MQ. Ambos procesos son asintomáticos y no requieren tratamiento específico, aunque es necesario un seguimiento periódico para detectar precozmente el momento de la progresión.

La alta incidencia de GMSI, con un 3% en mayores de 50 años, y el alto riesgo de progresión en pacientes con MQ, conllevan una considerable carga asistencial para detectar precozmente la progresión a enfermedad sintomática. Por tanto, un mayor conocimiento de los factores de riesgo de progresión permitiría una mejor estratificación de los pacientes en función del riesgo, que podría ser utilizada para ajustar el seguimiento clínico de manera individualizada con el consiguiente ahorro de recursos asistenciales.

En los últimos años, la CMF multiparamétrica ha demostrado su utilidad en el estudio de las gammapatías monoclonales. Tanto el estudio de la expresión antigénica mediante inmunofenotipo, como la detección de aneuploidías y el estudio del ciclo celular, mediante el análisis del contenido de ADN, permite la discriminación entre células plasmáticas normales o patológicas y la evaluación pronóstica de los pacientes con MM.

Teniendo en cuenta el planteamiento del estudio, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Caracterizar fenotípicamente y por contenido de ADN el compartimiento de células plasmática de la médula ósea de pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto y mielomas quiescentes en el momento del diagnóstico, identificando y cuantificando las CP fenotípicamente normales y patológicas.

2. Valorar la capacidad de la CMF multiparamétrica en la predicción del riesgo de progresión a MM sintomático, tanto en las GMSI como en el MQ.
3. Comparar la utilidad de la CMF multiparamétrica en la predicción del riesgo de progresión con los factores pronósticos descritos en la literatura.

Material, Método y Resultados

En esta sección se describe la población estudiada, junto con los materiales y métodos utilizados para el análisis. Se muestran los resultados obtenidos de acuerdo con los objetivos planteados mediante la inclusión de los artículos originales publicados, están precedidos por un breve resumen. Los artículos a los que nos referimos son los siguientes:

✓ New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells.

Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martín-Núñez G, Alonso JM, de Las Heras N, Hernández JM, Martín A, López-Berges C, Orfao A, San Miguel JF.

Blood. 2007 Oct 1;110(7):2586-92. (FI: 10,432); PMID: 17576818

✓ Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells.

Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Las Heras N, de Coca AG, Hernández JM, Galende J, Martín-Núñez G, Báñez A, Alonso JM, Martín A, López-Berges C, Orfao A, San Miguel JF, Vidriales MB.

Br J Haematol. 2010 Jan; 148 (1): 110-4. (FI: 4,478); PMID: 19821821

Artículo 1: Nuevos criterios para identificar el riesgo de progresión en gammapatías monoclonales de significado incierto y mieloma múltiple quiescente mediante el análisis de células plasmáticas de MO por técnicas de citometría de flujo multiparamétricas.

Introducción

La GMSI y el MQ son discrasias de células plasmáticas asintomáticas, en las que el riesgo de progresión, que se produce fundamentalmente a mieloma múltiple (MM) sintomático, se mantiene de por vida, situándose en torno al 1% anual en las GMSI y al 10% en los MQ. Por ello, la identificación de factores pronósticos puede contribuir a establecer una estrategia de seguimiento individualizada para cada caso. Por otra parte, en los últimos años, la citometría de flujo (CMF) ha adquirido un papel preponderante en el diagnóstico y seguimiento de las hemopatías malignas. En particular, la CMF permite, en el estudio de las gammapatías monoclonales, discriminar entre CP normales y patológicas, lo que se ha utilizado para el diagnóstico diferencial de las gammapatías monoclonales y el estudio de enfermedad mínima residual.

Objetivos, material y método

El objetivo de nuestro estudio fue analizar el valor de la CMF multiparamétrica en el análisis del compartimento de CP de la MO, como ayuda en el diagnóstico diferencial de las gammapatías monoclonales y como predictor del riesgo de progresión de GMSI y MQ.

Se incluyeron en el estudio 407 pacientes con GMSI y 93 pacientes con MQ en el momento del diagnóstico. La mediana de seguimiento en ambos grupos fue de 56

meses (24-187) con un seguimiento mínimo de 2 años. El 8% (n=33) de las GMSI progresaron, con un tiempo medio hasta progresión de 44 meses, la mayor parte de los casos a MM (n=26), 4 casos a síndrome linfoproliferativo crónico, 2 casos a amiloidosis y 1 paciente desarrolló una leucemia de células plasmáticas. Entre los MQ, el 43% (n=47) progresó a mieloma múltiple con una mediana de tiempo hasta progresión de 18 meses.

El estudio inmunofenotípico de las CP se realizó con la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy5/CD45-APC, siguiendo una estrategia de adquisición y análisis previamente validada^{107,188}. Se calculó el porcentaje de CP en la celularidad global de la MO y posteriormente se analizó el compartimento de CP de la MO, analizando el porcentaje de CP fenotípicamente patológicas (CPP) y CP fenotípicamente normales (CPN). Además, se investigó la existencia de aneuploidía de ADN¹⁰⁴, definiéndose como aneuploides los casos con hipo/hiperdiploidía observada mediante CMF.

Resultados

Las GMSI presentaron en comparación con los MQ un menor porcentaje de CP respecto a la celularidad global (4% vs 14%; $p < 0,001$), y dentro del compartimento de las CP de la MO también un menor porcentaje de CPP (73% vs. 97%; $p < 0,001$). La CMF permitió discriminar dos grupos de pacientes con diferente riesgo de progresión, tanto en GMSI como en MQ. Así, los pacientes con GMSI en cuyo compartimento de CP de la MO la mayoría ($\geq 95\%$) correspondían a CPP, la probabilidad acumulada de progresión a los 5 años fue de 25% frente a 5% en aquellos pacientes con $< 95\%$ de CPP. De forma similar, considerando los MQ, el riesgo progresión a los 5 años fue de 64% para los pacientes con $\geq 95\%$ de CPP, frente al 8% para aquellos con $< 95\%$ de CPP. Otros factores con impacto pronóstico en la supervivencia libre de progresión en

ambas entidades fueron: la infiltración por morfología convencional ($\geq 5\%$ en GMSI y $\geq 15\%$ en MQ) ($p < 0.002$), la infiltración por CMF ($\geq 1\%$ en GMSI y $\geq 5\%$ en MQ) ($p < 0.01$) y la presencia de inmunoparesis ($p < 0.001$). Además, en los pacientes con GMSI la presencia de proteinuria de Bence-Jones ≥ 0.2 g/24 horas ($p < 0.001$), la aneuploidía de ADN ($p < 0.01$) y un CM superior a 2 g/dl ($p < 0.001$) también mostraron influencia en el análisis univariante de supervivencia libre de progresión.

El análisis multivariante demostró el valor pronóstico independiente para supervivencia libre de progresión de la determinación del % de CPP dentro del compartimento de CP de la MO tanto en las GMSI como en los MQ ($p < 0.001$ y $p < 0.003$, respectivamente). Otros factores con valor pronóstico independiente fueron la existencia de aneuploidía de ADN en las GMSI ($p < 0.001$) y la presencia de inmunoparesis en los MQ ($p < 0.02$). Basándonos los parámetros seleccionados en el análisis multivariante se estableció un índice pronóstico en función de la presencia o ausencia de dichos factores. En cada patología se definieron 3 grupos: en las GMSI, la supervivencia libre de progresión a los 5 años fue de 98%, 90% y 54% para aquellos individuos con ninguno, uno o dos factores adversos ($p < 0.001$); y en los MQ, la supervivencia libre de progresión a los 5 años fue de 96%, 54% y 28%, para aquellos con ninguno, uno o dos factores adversos, respectivamente ($p < 0.001$).

Discusión

Tanto las GMSI como los MQ representan dos formas de discrasias de células plasmáticas asintomáticas, en las que no está indicado el tratamiento, pero en las que existe riesgo de progresión que se mantiene de por vida. Por ello, en ambas entidades se han tratado de identificar factores que puedan predecir el riesgo de progresión a formas sintomáticas de enfermedad, habitualmente mieloma múltiple. Entre los factores identificados destacan: la cuantía del CM, la existencia de CM IgA, la relación anormal

de cadenas ligeras libres en suero, la presencia de proteinuria de Bence-Jones y la presencia de infiltración en MO elevada.

La CMF se ha demostrado como una herramienta útil en el estudio de gammopatías monoclonales, en áreas como el estudio de enfermedad mínima residual o el diagnóstico diferencial de las GMSI y MM. Sin embargo, hasta el momento no se había analizado su utilidad en la capacidad predictiva de progresión de las gammopatías asintomáticas. En nuestro estudio, hemos demostrado cómo la cuantificación del porcentaje de CP de fenotipo patológico dentro del compartimento de CP de la MO permite identificar pacientes con alto riesgo de progresión a formas sintomáticas de enfermedad. Así, los pacientes con un porcentaje de CPP superior a 95% presentan un riesgo acumulado de progresión a los 5 años de 25% y 64% en GMSI y MQ, respectivamente, frente a un 5% y 8% respectivamente, cuando el porcentaje de CPP es inferior al 95%.

Hemos demostrado que la determinación del porcentaje de CP patológicas mediante CMF tiene un valor pronóstico independiente para supervivencia libre de progresión, tanto para GMSI como para MQ. Este parámetro, junto con el estudio de la ploidía en GMSI y la presencia de inmunoparesis en el MQ, ha permitido desarrollar un índice pronóstico de fácil aplicación para la estratificación del riesgo de progresión de las gammopatías asintomáticas.

Con los resultados de nuestro trabajo podemos concluir que la inclusión de la citometría en el estudio de las gammopatías monoclonales asintomáticas como las GMSI o el MQ en el momento del diagnóstico podría contribuir a establecer un seguimiento individualizado de los pacientes, adaptado al riesgo de progresión. Además, esta herramienta permitiría seleccionar pacientes con MQ y elevado riesgo de progresión que podría beneficiarse de nuevos tratamientos no citotóxicos.

New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells

Ernesto Pérez-Persona,¹ María-Belén Vidriales,^{1,2} Gema Mateo,¹ Ramón García-Sanz,^{1,2} María-Victoria Mateos,¹ Alfonso García de Coca,³ Josefina Galende,⁴ Guillermo Martín-Nuñez,⁵ José M. Alonso,⁶ Natalia de las Heras,⁷ José M. Hernández,⁸ Alejandro Martín,⁹ Consuelo López-Berges,¹ Alberto Orfao,^{2,10} and Jesús F. San Miguel^{1,2}

¹Department of Hematology, University Hospital, Salamanca; ²Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Salamanca; ³Department of Hematology, University Hospital, Valladolid; ⁴Department of Hematology, Hospital Comarcal del Bierzo, Ponferrada, León; ⁵Department of Hematology, Hospital Nuestra Señora del Puerto de Plasencia, Cáceres; ⁶Department of Hematology, Hospital Río Carrión, Palencia, Cáceres; ⁷Department of Hematology, Complejo Hospitalario, León; ⁸Department of Hematology, General Hospital, Segovia; ⁹Department of Hematology, Hospital Virgen de la Concha, Zamora; and ¹⁰Department of Cytometry, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM) are plasma cell disorders with a risk of progression of approximately 1% and 10% per year, respectively. We have previously shown that the proportion of bone marrow (BM) aberrant plasma cells (aPCs) within the BMPC compartment (aPC/BMPC) as assessed by flow cytometry (FC) contributes to differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma (MM). The goal of the present study was to investi-

gate this parameter as a marker for risk of progression in MGUS (n = 407) and SMM (n = 93). Patients with a marked predominance of aPCs/BMPC ($\geq 95\%$) at diagnosis displayed a significantly higher risk of progression both in MGUS and SMM ($P < .001$). Multivariate analysis for progression-free survival (PFS) selected the percentage aPC/BMPC ($\geq 95\%$) as the most important independent variable, together with DNA aneuploidy and immunoparesis, for MGUS and SMM, respectively. Using these independent variables, we

have identified 3 risk categories in MGUS (PFS at 5 years of 2%, 10%, and 46%, respectively; $P < .001$) and SMM patients (PFS at 5 years of 4%, 46%, and 72%, respectively; $P < .001$). Our results show that multiparameter FC evaluation of BMPC at diagnosis is a valuable tool that could help to individualize the follow-up strategy for MGUS and SMM patients. (Blood. 2007;110:2586-2592)

© 2007 by The American Society of Hematology

Introduction

Monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM) represent 2 forms of asymptomatic plasma cell (PC) disorders that share in common a variable period of stable disease but which may eventually progress to symptomatic multiple myeloma (MM). MGUS is the most common plasma cell disorder, whose incidence increases with age, affecting approximately 3% of population more than 50 years of age and up to 10% in those more than 70 years of age.¹⁻³ Diagnosis of MGUS is characterized by the presence of a monoclonal immunoglobulin in serum of no more than 3 g/dL, and less than 10% of plasma cells in bone marrow (BM), in the absence of end-organ damage related to the proliferation of monoclonal plasma cell.^{1,2,4} Smoldering multiple myeloma (SMM) is also an asymptomatic plasma cell disorder that fulfills the diagnostic criteria of multiple myeloma (MM), although it is characterized by the absence of hypercalcemia, renal failure, anemia, and bone lytic lesions (CRAB symptoms).² Its estimated prevalence ranges from 15% to 44% of newly diagnosed MM.^{1,5,6}

When progression occurs, the majority of cases evolve to overt MM. The rate of progression is significantly lower for MGUS cases (approximately 1% per year⁷) than for SMM (10% per year⁸).

Therefore, a different follow-up strategy is needed in these 2 groups of monoclonal plasma cell disorders, with a closer follow-up in SMM than in MGUS. However, it would be most valuable to have individualized information on factors associated with the risk of progression at diagnosis to determine patient follow-up strategy according to their individual risk of progression. For both disorders these factors include the amount of monoclonal component, the presence of Bence Jones proteinuria, the isotype of the monoclonal immunoglobulin (IgA), and an abnormal serum free light chain ratio.^{1,4,5,8-11} Particularly in the case of SMM, the current standard of care is close follow-up without treatment until MM symptoms develop. Nevertheless, this policy may change with the availability of novel noncytotoxic agents. The obvious cohort of SMM patients in which these new agents should be tested are those at high risk of progression. Therefore, it is most important to identify this patients group in order to define the final value of "preventive treatment approaches."

In recent years, multiparameter flow cytometry (FC) immunophenotyping has been increasingly used in the setting of different haematologic malignancies.¹²⁻¹⁷ Concerning plasma cell dyscrasias, it has been shown that, based on the expression of several

Submitted May 7, 2007; accepted June 11, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 18, 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-088443.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

Presented in part at the European Hematology Association 11th annual

congress, 2006 (Amsterdam), as an oral presentation.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2007 by The American Society of Hematology

markers, normal and myelomatous plasma cells (PCs) can be easily differentiated.^{12,18,19} We have previously shown that phenotypically aberrant PC (aPC) correspond to clonal PCs, whereas PCs with a normal phenotype are polyclonal.^{12,20} Moreover, the proportion of aPCs/BMPC was the most important criteria for differential diagnosis between MGUS and MM patients.¹² Thus, in the majority of MM patients, almost all PCs (>95%) display an aberrant phenotype, whereas in MGUS patients, normal and malignant plasma cells coexist.¹² Based on this background, we wanted to investigate whether or not this valuable parameter (aPCs/BMPCs) for differential diagnosis between MGUS and MM could also help to predict the risk of transformation of MGUS and SMM into symptomatic disease.

Patients, materials, and methods

Patients

A total of 500 consecutive patients diagnosed between January 1996 and September 2003 who fulfilled the criteria of monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) (n = 407) or smoldering multiple myeloma (SMM) were included in this study. Informed written consent was obtained from all the patients included in accordance with the Human Investigations Committee at the University Hospital of Salamanca and the Declaration of Helsinki.

MGUS and SMM were defined according to the International Myeloma Working Group.² MGUS was characterized by the evidence of monoclonal component (MC) of less than 3 g/dL, absence or less than 1 g/24 hours Bence Jones proteinuria, and BMPC infiltration of less than 10%. SMM was defined by MC of 3 g/dL or greater, and/or BMPC infiltration of 10% or greater, and/or the presence of Bence Jones proteinuria greater than 1 g/dL; in all cases, absence of end-organ damage (lytic bone lesions, hypercalcemia, renal insufficiency, or anemia) was required. With respect to the criteria used for the definition of SMM,² 14 of 93 cases (15%) had both more than 10% of PCs in BM and high MC (≥ 3 g/dL), 64 patients (68%) had 10% or greater PCs in the BM but with lower MC (< 3 g/dL). The remaining 15 patients (16%) had an infiltration of BMPC lower than 10%, and diagnosis of SMM was performed in these cases on the basis of "reconfirmed" MC levels of greater than 3.0. Immunoparesis was defined as a reduction (below the lower normal limit) in the levels of 1 or 2 immunoglobulin (Ig), with respect to the values of the corresponding uninvolved Ig. Progression to multiple myeloma was established according to the criteria defined by the International Working Group.²

With a minimum follow-up of 24 months, at the close of this study the median follow-up was 56 months (range, 24-187 months). Thirty-three MGUS cases (8%) and 47 SMM patients (43%) have already progressed. Progression was defined as transformation from MGUS or SMM into symptomatic myeloma, amyloidosis, or chronic lymphoproliferative disease. The median time to progression in MGUS patients was 44 months (range, 4.4-120); the majority of patients progressed to symptomatic MM (n = 26; 79%), 4 cases progressed to chronic lymphoproliferative disease (12%), 2 cases progressed to amyloidosis (6%), and 1 progressed to plasmatic cell leukemia (3%). The median time to progression for SMM patients was 18 months (range, 2-92 months), and all of them evolved into symptomatic MM.

The following variables collected at diagnosis were included in the analysis: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status, hemoglobin (Hb), platelet count, erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum creatinine, serum liver function tests, β_2 -microglobulin, C reactive protein (CRP), total protein, albumin and MC serum levels, presence of urine MC, serum concentration of polyclonal Ig, percentage of PCs in the BM aspirate evaluated by optical microscopy, and skeleton X-ray (Table 1). The percentage of BMPC was calculated after counting 200 cells. Quantification of the MC was carried out using serum protein electrophoresis on cellulose acetate. Serum polyclonal Ig levels were measured by nephelometry.

Table 1. Clinical and biological characteristics of MGUS and SMM patients according to the type of immunoglobulin

Characteristics	MGUS (n = 407)	SMM (n = 93)
Sex, male/female, no.	205/202	46/47
Age, y (range)	71 (26-95)	69 (39-88)
Serum MC, mg/dL (range)	1.60 (0.3-3.0)	2.37 (0.8-6.5)
Immunoparesis, no. (%)	90 (25%)	47(52%)
BM PC by morphology, % (range)	4 (1-10)	14 (4-55)
BM PC by FC, % (range)	1.0 (0.1-37)	2.9 (0.9-27)
Abnormal PC, % (range)	73 (0-100)	97 (17-100)
Patients with greater than 95% aPC, % (%)	73 (18)	56 (60)
Presence of BJ proteinuria, no. (%)	40 (17)	14 (22)
Aneuploidy, no. (%)	229 (58)	62 (67)
Progression, no. (%)	33 (8)	40 (43)

Immunophenotypic studies

Immunophenotypic analyses were performed on erythrocyte-lysed K₃-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) anticoagulated whole BM samples. A total of 2×10^6 cells per tube were stained, lysed, and then washed using a direct immunofluorescence technique and multicolor staining, which was aimed at the specific identification and immunophenotypic characterization of PCs: CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy5/CD45-APC. In specific cases additional staining for cytoplasmatic Ig light chains were used to clarify the polyclonal vs monoclonal nature of PCs. The $\text{cIg}\kappa/\text{cIg}\lambda$ staining was performed in a 4-color tube including simultaneous surface staining for CD38 plus either CD45, CD56, or CD19, depending on the type of antigenic aberrancy. All monoclonal antibodies used were purchased from Becton/Dickinson Biosciences (BDB; San Jose, CA) except for CD38-FITC (Caltag Laboratories, San Francisco CA). Acquisition was performed in a FACSCalibur flow cytometer (BDB) using double-step procedure using the CellQUEST software (BDB). In the first step, a total of 20×10^3 events from the total BM cellularity were measured; in the second step, information on a minimum of 3×10^5 cells was acquired and stored through an electronic "live-gate" drawn on the side scatter (SSC)/CD38⁺⁺ events where PCs are included (Figure 1). In cases with very low numbers of PCs, the acquisition of cells was increased in order to reach the minimum target of PC events (≥ 1000). We first identified PCs based on the expression of CD138/high expression of CD38 with an intern SSC. Once PCs were identified, we focused our analysis on the PC compartment, and within it, we discriminated between PC with a normal and aberrant phenotype (polyclonal and clonal PCs, respectively).²¹⁻²³ For this purpose, we used a validated immunophenotypic approach^{23,24} where the absence of CD19 and/or CD45, the decreased expression of CD38, and overexpression of CD56 were used for the identification of aberrant phenotypes on PC (Table 2). For each case analyzed, the following data were recorded: (i) total percentage of PCs from the whole nucleated BM cellularity and (ii) percentage of abnormal plasma cells (aPC) within the BMPC compartment. The latter parameter will be referred to in the text as aPC/BMPC.

DNA index assessed by flow cytometry was performed using a double-staining procedure for nuclear DNA (with propidium iodide) and surface antigens (with anti-CD38 plus anti-CD138 monoclonal antibodies) as previously described,²⁵ and the analysis was performed specifically on the PC (CD38 plus CD138⁺) cells. Aneuploidy was defined as hypo- and hyperdiploidy bases on flow cytometry assessment.

The analysis by FC and the evaluation of the disease status, including the decision that therapy was needed, were performed by independent observers.

Statistical analyses

The Chi square and the Mann-Whitney U tests were used to estimate the statistical significance of differences observed between groups. Survival curves were plotted according to the Kaplan and Meier method, using log-rank and Breslow tests for comparison. In the univariate analysis for progression-free survival (PFS), the following variables were tested: age, sex, hemoglobin, heavy chain, light chain, amount of MC, renal function, percentage of BMPC by optical microscope, percentage of BMPC by

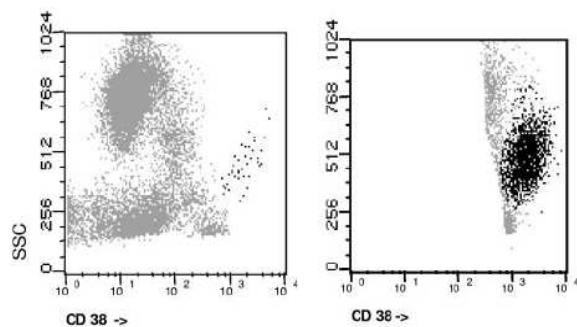


Figure 1. Gating strategy for PC analysis by multiparametric flow cytometry.

multiparameter FC, percentage of aPC/BMPC, presence of immunoparesis, DNA ploidy, and presence of Bence Jones proteinuria. Multivariate analysis¹⁵ was performed to explore the independent effect of variables that showed a significant influence on progression-free survival in the univariate analysis. The Cox regression model that was used employed the stepwise methods “forward conditional” as the variable selection model. Quantitative parameters were considered both as continuous as well as dichotomic variables.

All statistical analyses were performed using SPSS software (version 12.5; SPSS, Chicago, IL).

Results

The clinical and biologic characteristics of MGUS and SMM patients analyzed are summarized in Table 1. Median age (70 years) at diagnosis and sex distribution was similar in both groups. The frequency of IgG paraprotein was slightly higher in MGUS than in SMM (75% vs 64%) whereas the opposite figure was observed for IgA (21% vs 34%). The median value of the serum MC was 1.6 g/dL (range, 0.3 to 3.0 g/dL) and 2.37 g/dL (range, 0.8 to 6.5 g/dL) for MGUS and SMM, respectively. The light chain was κ in 73% (n = 298) of the cases of MGUS patients and in 65% of SMM cases. Immunoparesis was present in 25% of MGUS patients (18% had decreased levels of only one Ig and 7% had low levels of 2 Igs) and in 52% of SMM patients (22% of one Ig and 30% of both chains). Bence Jones proteinuria was detected in 40 (17%) MGUS and 14 (22%) SMM patients. The median percentage of bone marrow plasma cell PC (BMPC) by conventional morphology was 4% and 14% in MGUS and SMM, respectively.

As expected, multiparameter FC showed lower percentages of BMPC than morphology, probably due to a dilutional effect. The median value of PC infiltration by FC was significantly higher in patients with SMM than in MGUS (median 2.9% vs 1.0%, *P* < .001). When the analysis was restricted to the PC compartment and we discriminated between normal and phenotypically aPC (clonal PC), we observed that in SMM, aberrant PC markedly predominate (median 97% aPC from the total BMPC cellularity) whereas in MGUS the distribution of abnormal/normal PC is more balanced, with 73% of PC displaying an aberrant phenotype. Moreover, if we consider the cut-off value of more than 95% aPC/BMPC, which was previously used for differential diagnosis between MGUS and MM (it should be remembered that in symptomatic MM almost all PC [≥ 95%] display an aberrant phenotype), we observed that although 60% of SMM were above this threshold, only 18% of MGUS had 95% or greater aPC (*P* < .001).

Interestingly, the percentage of phenotypically aPC/BMPC at diagnosis allowed the discrimination of 2 groups of patients with

significantly different risks of progression to overt MM, both in MGUS and in SMM patients. Thus, in the MGUS group, 24% of patients (18/73) with more than 95% aPC/BMPC progressed with a median time to progression of 107 months, whereas only 4% (15/330) of patients progressed in the group of cases with less than 95% of aPC/BMPC (*P* < .001), with a cumulative probability of progression at 5 years of 25% versus 5%, respectively (Figure 2A). Similarly, within SMM patients the rate of progression to symptomatic MM for cases with more or less than of 95% aPC/BMPC was 63% (36/56) versus 10% (4/37) (*P* < .001) (Figure 2B), with a cumulative probability of progression at 5 years of 64% versus 8%, respectively.

Other factors associated with a significant impact on PFS in both groups of patients included bone marrow plasma cells infiltration by conventional morphology (*P* < .002), overall percentage of PC evaluated by flow cytometry (*P* < .01), and immunoparesis (*P* < .001) (Table 3). In addition, in MGUS patients, a Bence Jones proteinuria higher than 0.2 g/24 hours (*P* < .001), DNA aneuploidy (*P* = .01), and MC levels of 2 g/dL or greater (*P* < .001) also had significant impact on PFS (Table 3). Other variables such as sex, isotype of the MC Ig, β₂-microglobulin serum levels, ESR, hemoglobin, and C reactive protein were not associated with a different incidence of disease progression.

Interestingly, when we focused on patients with low risk of progression based on conventional criteria, such as low amounts of MC (< 2 g/dL for MGUS and < 3g/dL for SMM) or the absence of immunoparesis, the evaluation of the percentage of aPC/BMPC still allowed the discrimination of 2 groups of patients at different risks of progression. Thus, among cases with low MC, those patients with 95% or greater aPC/BMPC showed lower PFS than those with less than 95% aPC/BMPC, with significant impact on MGUS (*P* < .002) as well as SMM (*P* < .001) (Figure 3). In the same way, upon restricting analysis to patients with no immunoparesis, cases with 95% or greater of aPC/BMPC had poor prognosis in both diagnostic categories (SMM and MGUS) (*P* < .02) (Figure 3). Similarly, the presence of at least or less than 95% aPC/BMPC was able to discriminate 2 prognostic subgroups within patients with high BMPC infiltration or high MC in MGUS as well as SMM patients (data not shown).

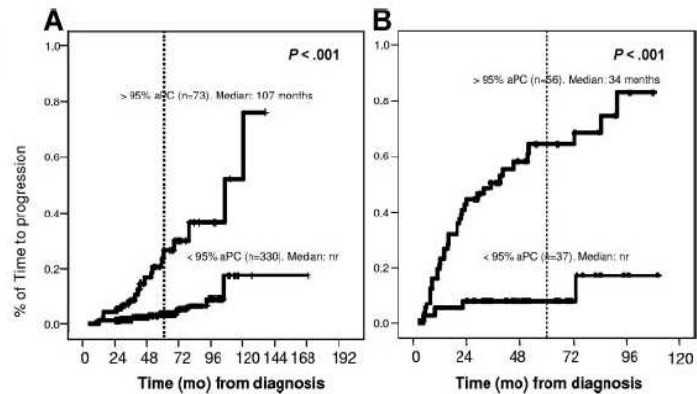
In order to explore whether or not the percentage of immunophenotypically aPC/BMPC evaluated by FC was an independent prognostic factor for PFS among MGUS and SMM patients, a multivariate analysis was performed. Interestingly, in both diagnostic groups the sole common variable with independent prognostic value for PFS was the aPC/BMPC (*P* < .001 for MGUS and *P* = .003 for SMM patients). In the MGUS group the DNA index also had independent prognostic value (*P* = .001), with a risk of progression increased by a factor of 8.2 in cases with 95% or greater of aPC/BMPC and by 4.6 in patients with DNA aneuploidy.

Table 2. Aberrant phenotypic profile in SMM and MGUS patients

CD45	CD19	CD56	%
-	-	++	50
-	-	-	24
-/dim	-	+	11
-	+	++	8
Dim	-	-	5
-	+	-	1
+	Dim	++	1

All cases were CD38+. - indicates not present; +, positive; and ++, strong expression.

Figure 2. Time to progression in MGUS and SMM according to the percentage of immunophenotypically aberrant plasma cells. (A) For MGUS, the median time to progression (TTP) was 107 months versus not reached (nr) for patients with 95% or greater versus less than 95% aberrant PC, respectively ($P < .001$). (B) For SMM, the median TTP was 34 months vs not reached for patients with 95% or greater versus less than 95% aberrant PC, respectively ($P < .001$).



In contrast, for the SMM patients, presence of immunoparesis was selected as also having independent prognostic value for PFS ($P = .02$), with a risk of progression to symptomatic MM increased by a factor of 5.4 in cases with 95% or greater of aPC/BMPC and by 2.5 in patients with low levels of one or more uninvolved immunoglobulin at diagnosis.

Based on variables with independent prognostic value for MGUS transformation ($\geq 95\%$ aPC/BMPC and DNA aneuploidy), we established a prognostic index by assigning 1 point for each adverse factor. Accordingly, 3 risk groups of MGUS patients were defined: cases with no risk factors (PFS at 5 years of 2%), cases with 1 risk factor (10% PFS at 5 years), and patients with both risk factors (46% PFS at 5 years) (Figure 4A). The same approach was used for SMM (but now based on $\geq 95\%$ aPC/BMPC and immunoparesis). The PFS at 5 years was 4%, 46%, and 72% for patients with none, 1, or 2 risk factors, respectively ($P < .001$) (Figure 4B).

Discussion

The term MGUS, introduced by Kyle more than 25 years ago,²⁶ denotes the presence of a monoclonal protein without evidence of multiple myeloma, amyloidosis, macroglobulinaemia, or other related plasma cell lymphoproliferative disorders.²⁶ Since SMM was first described by Kyle and Greipp and Alexanian in 1980,^{27,28} several series of asymptomatic MM have been reported.^{9,29-33} These patients do not display evidence of end-organ damage and are biologically similar to patients with MGUS, although the risk of developing a symptomatic myeloma is much higher.⁸ Patients should not be treated unless progression occurs, and the monitoring follow-up has to be closer for SMM than it is for MGUS. Several efforts have been made to identify parameters that will probably predict progression from MGUS or SMM to active MM. For MGUS, the size of serum M

Table 3. Clinical and biological parameters associated with risk of progression of MGUS and SMM in the univariate analysis

	MGUS			SMM		
	Median PFS, mo	Progression no. (%)	P^*	Median PFS, mo	Progression no. (%)	P^*
Immunoparesis						
None	Nr	12/266 (4.5)	$< .001$	Nr	8/42 (19)	$< .001$
1 or 2 Ig	120	17/91 (18)	—	31	31/47 (66)	—
Percentage of BMPC (optical microscope)†						
Less than 5% or 15%	Nr	11/251 (4)	.003	Nr	17/57 (30)	$< .002$
At least 5% or 15%	Nr	21/144 (15)	—	34	23/36 (64)	—
% of BMPC (flow cytometry)‡						
Less than 1% or 5%	Nr	7/196 (3)	$< .006$	Nr	17/64 (26)	$< .001$
At least 1% or 5%	Nr	25/210 (12)	—	20	22/28 (78)	—
MC						
Less than 2 g/dL MGUS and less than 3 g/dL SMM	Nr	11/279 (4)	$< .001$	84	23/64 (36)	.078
At least 2 g/dL MGUS and at least 3 g/dL SMM	Nr	20/111 (18)	—	31	17/29 (58)	—
Light chain						
κ	120	23/216 (10)	.02	72	27/59 (46)	0.46
λ	9Nr	6/165 (3)	—	92	13/33 (39)	—
DNA ploidy						
Diploid	120	11/172 (6)	.019	Nr	11/31 (43)	0.31
Aneuploid	Nr	18/108 (17)	—	73	21/42 (50)	—
Bence-Jones proteinuria						
Less than 0.2 g/24 h	120	10/216 (5)	$< .001$	92	26/59 (44)	0.9
At least 0.2 g/24 h	106	7/26 (26)	—	Nr	2/5 (40)	—

Nr indicates not reached; and —, not applicable.

* Determined by log-rank test.

† Cut-off point of bone marrow plasma cell infiltration of 5% for MGUS and 15% for SMM.

‡ Cut-off point of bone marrow plasma cell infiltration by flow cytometry of 1% for MGUS and 5% for SMM.

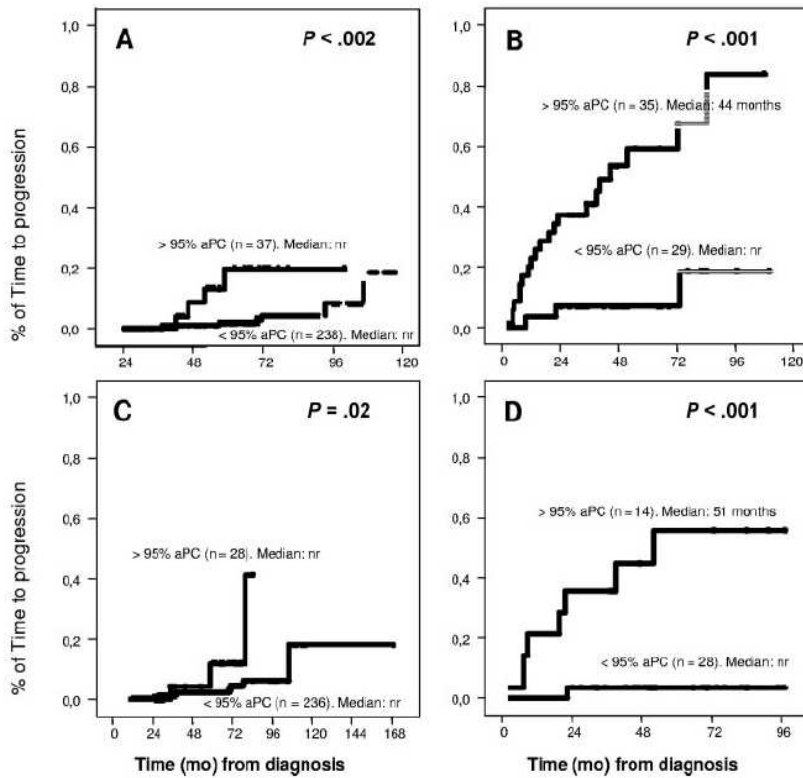


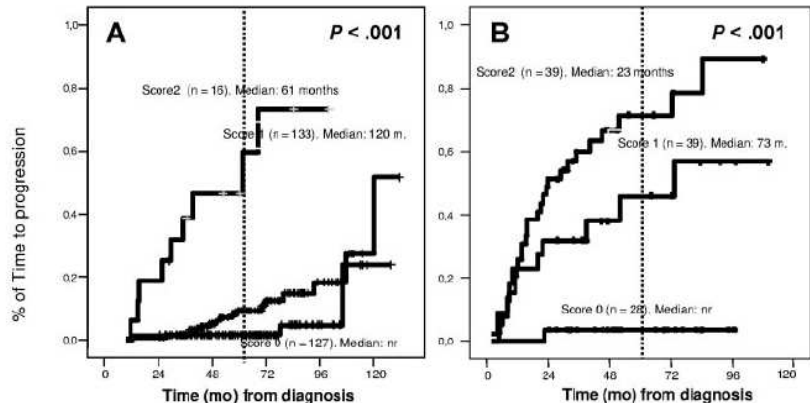
Figure 3. Impact of percentage of abnormal PC in TTP for patients at low risk. Patients with low MC (< 2 g/dL for MGUS and < 3 g/dL for SMM): (A) TTP was longer in MGUS patients with less than 95% aberrant PC ($P < .002$). (B) In SMM patients, the median TTP was 44 months versus not reached for patients with greater than or equal to 95% or less than 95% aberrant PC ($P < .001$). Patients without immunoparesis: (C) TTP was longer in MGUS patients with less than 95% aberrant PC ($P = .02$). (D) In SMM patients, the median TTP was 51 months versus not reached for patients with greater than or equal to 95% or less than 95% aberrant PC ($P < .001$).

protein,^{4,9} as well as the IgA isotype,⁹ an abnormal serum free light chain ratio,¹¹ detectable BJ protein excretion, more than 5% of PC in BM, and presence of immunoparesis⁹ have been identified as predictors of progression. Moreover, Rajkumar et al¹¹ have recently shown that the combination of a high M component (> 1.5g/dL), a monoclonal protein other than IgG, and an abnormal serum free light chain ratio is associated with a high risk of progression (58% at 20 years compared with 5% when none of these risk factors were present). As far as SMM is concerned, it has been shown that the risk of progression is increased in cases with MC levels of greater than 3 g/dL,^{5,8,9,32} IgA isotype,^{8,9} BJ protein excretion greater than 50 mg/24 hours,⁹ evolving SMM type,²⁹ greater than 10% of PC in BM,⁹ and occult bone lesions on magnetic resonance imaging (MRI).^{8,33} It should be noted that the presence of immunoparesis has been associated with a high risk of progression⁹ in MGUS but not in SMM.⁸

Multiparameter FC is an increasingly widely used technique that can be applied to the identification of PC among all BM cells,

as well as the discrimination of phenotypically abnormal plasma cells from their normal counterpart. The antigens most frequently used for the identification of aberrant PC phenotype include CD19, CD45, and CD56 in combination with CD38/CD138.^{12,18,23-25} Thus, the overexpression of CD56 together with the absence of reactivity for CD19 and for CD45 and/or decreased amounts of CD38 have been found to be common characteristics of MM plasma cells.^{12,18,34} Such aberrant phenotypes of BM plasma cells have been used for the study of minimal residual disease in MM, and it has been suggested that the persistence of immunophenotypically abnormal PC in the BM after treatment is associated with a worse clinical outcome.^{13,21-23,35} In addition, we have shown that the proportion of aPC/BMPC was the most important criteria for differential diagnosis between MGUS and MM patients.¹² Nevertheless, up until now the potential value of PC immunophenotypic investigation for predicting the risk of progression of MGUS and SMM patients has not been explored. Based on this background, we wanted to investigate the potential impact of the detection of

Figure 4. TTP in MGUS and SMM according to the score system. (A) The score system for MGUS was built on the basis of the percentage of immunophenotypically aberrant PC within the BMPC compartment (< 95% aberrant PC, score of 0; \geq 95%, score of 1) and DNA index: aneuploid (score of 1) or diploid (score of 0). In patients with a score of 1, the median TTP has not been reached; in patients with a score of 2, the median TTP is 120 months; and in patients with a score of 3, the median PFS is 61 months ($P < .001$). (B) The score system for SMM was built on the basis of the percentage of immunophenotypically aberrant PC within the BMPC compartment (< 95% aberrant PC, score of 0; \geq 95%, score of 1) and the presence (score of 1) or absence (score of 0) of immunoparesis. In patients with a score of 1, the median TTP has not been reached; in patients with a score of 2, the median TTP is 73 months; and in patients with a score of 3, the median TTP is 23 months ($P < .001$).



aPC/BMPC on the risk of transformation of MGUS and SMM into symptomatic disease. In our study, at 5 years, the risk of progression was 25% and 64% respectively, for MGUS and SMM cases in which the majority of PC have an aberrant phenotype ($\geq 95\%$ aPC/BMPC). These figures are clearly higher than those of patients with less than 95% aPC/BMPC, in which the risk of progression at 5 years is 5% and 8% for the MGUS and SMM group, respectively. It should be emphasized that the immunophenotypic strategy used here is very simple and cost-effective, because it only requires a tube sample with 4 monoclonal antibodies, which results in low cost.

Based on the 2 parameters with independent value in the multivariate analysis ($\geq 95\%$ aPC/BMPC, DNA aneuploidy for MGUS, $\geq 95\%$ aPC/BMPC, and presence of immunoparesis for SMM), we propose a simple scoring system, assigning 1 point to each adverse variable, which allows prognostic stratification of MGUS and SMM patients at diagnosis into the 3 risk categories. The cumulative probability of progression from MGUS to MM at 5 years was significantly different for the 3 subgroups: 2%, 10%, and 46%, respectively. A similar pattern was observed for SMM with a risk of progression to symptomatic disease at 5 years of 4%, 46%, and 72%, respectively, for patients with none, 1, or 2 risk factors. As mentioned above, the Mayo Clinic group has recently proposed a new risk classification based on free light chain measurements.¹¹ Of particular interest would be to prospectively explore whether free light chain and percentage aPC represent independent prognostic factors.

The current standard of care for MGUS and SMM is follow-up without treatment until symptomatic disease develops, but this policy is associated with a significant emotional burden and high cost. Inclusion of multiparameter FC analyses of the BMPC population in the diagnostic evaluation of MGUS and SMM patients could be of a great help for establishing an individualized follow-up strategy according to their risk of progression. Moreover, the availability of novel, nontoxic drugs represents an attractive opportunity to investigate their efficacy in SMM (and even MGUS) patients with high risk of progression.

In summary, in the present study we show that multiparameter FC evaluation of BMPC at diagnosis of MGUS and SMM is a

valuable tool for predicting the risk of progression to overt MM, because it allows the identification of patients at high risk of early progression (those in which the majority of PC display an aberrant phenotype), which may benefit from early treatment interventions, as opposed to a group of patients (in which both, aberrant and normal PC coexist) who will probably be free of progression for a long period of time and could be safely monitored without treatment over many years.

Acknowledgments

This work was supported in part by a national grant from the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Ref. PI50575 and FIS PI-02/0905) and Ministerio de Educación y Ciencia (Ref. SAF: 2004-06587).

We would like to thank M. Anderson and M. J. Rodrigo for their help with the English language.

Authorship

Contribution: J.F.S.M. and A.O. conceived the idea and, together with M.-B.V., designed the study protocol; E.P.-P., M.-B.V., G.M., and C.L.-B. analyzed the flow cytometry data; E.P.-P. and M.-B.V. were involved in the data analysis and, together with J.F.S.M., cowrote the paper; J.F.S.M. and A.O. reviewed and corrected the paper; R.G.-S. and M.-V.M. were responsible for databases, clinical cases, and follow-up of patients; and A.G.d.C., J.G., G.M.-N., J.M.A., N.d.I.H., J.M.H., and A.M. were responsible for clinical cases and follow-up of patients and contributed to the clinical data entry. E.P.-P. and M.-B.V. contributed equally to this work.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Jesús F. San Miguel, Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente 58-182, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: sanmiguel@gugu.usal.es.

References

- Rajkumar SV. MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2005;340-345.
- Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003;121:749-757.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 2006;134:573-589.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346:564-569.
- Dimopoulos MA, Mouloupoulos A, Smith T, Delasalle KB, Alexanian R. Risk of disease progression in asymptomatic multiple myeloma. *Am J Med*. 1993;94:57-61.
- Wisloff F, Andersen P, Andersson TR, et al. Incidence and follow-up of asymptomatic multiple myeloma. The myeloma project of health region I in Norway. II. *Eur J Haematol*. 1991;47:338-341.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-1369.
- Weber DM, Dimopoulos MA, Mouloupoulos LA, et al. Prognostic features of asymptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1997;97:810-814.
- Cesana C, Klersy C, Barbarano L, et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2002;20:1625-1634.
- Dimopoulos MA, Mouloupoulos LA, Maniatis A, Alexanian R. Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood*. 2000;96:2037-2044.
- Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2005;106:812-817.
- Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998;152:1655-1665.
- Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90:1365-1372.
- Ocio EM, Mateo G, Vidriales B, et al. Cell cycle analysis of Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma*. 2005;5:250-252.
- Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A*. 2004;58:62-71.
- Vidriales MB, San Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003;16:599-612.
- San-Miguel JF, Vidriales MB, Orfao A. Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002;15:105-118.
- Harada H, Kawano MM, Huang N, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. 1993;81:2658-2663.
- Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using

- flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. 2001;86:837-843.
20. Ocqueteau M, Orfao A, Garcia-Sanz R, et al. Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol*. 1996;95:489-493.
 21. Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002;15:197-222.
 22. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1999;107:121-131.
 23. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002;99:1853-1856.
 24. Mateo Manzanera G, San Miguel Izquierdo JF, Orfao de Matos A. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol Med*. 2005;113:5-24.
 25. Almeida J, Orfao A, Mateo G, et al. Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathol Biol (Paris)*. 1999;47:119-127.
 26. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*. 1978;64:814-826.
 27. Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1980;302:1347-1349.
 28. Alexanian R. Localized and indolent myeloma. *Blood*. 1980;56:521-525.
 29. Rosiñol L, Blade J, Esteve J, et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol*. 2003;123:631-636.
 30. Greipp PR. Smoldering, asymptomatic stage 1, and indolent myeloma. *Curr Treat Options Oncol*. 2000;1:119-126.
 31. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Eur J Haematol Suppl*. 1989;51:70-75.
 32. Facon T, Menard JF, Michaux JL, et al. Prognostic factors in low tumour mass asymptomatic multiple myeloma: a report on 91 patients. The Groupe d'Etudes et de Recherche sur le Myelome (GERM). *Am J Hematol*. 1995;48:71-75.
 33. Moulouopoulos LA, Dimopoulos MA, Smith TL, et al. Prognostic significance of magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 1995;13:251-256.
 34. Leo R, Boeker M, Peest D, et al. Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38+ +, CD56+, CD54+, clg+ is the common phenotype of myeloma cells. *Ann Hematol*. 1992;64:132-139.
 35. Dingli D, Nowakowski GS, Dispenzieri A, et al. Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system. *Blood*. 2006;107:3384-3388.

Artículo 2: Riesgo de progresión en mieloma quiescente y gammapatía monoclonal de significado incierto: análisis comparativo de la evolución del componente monoclonal y la citometría de flujo multiparamétrica de las células plasmáticas de médula ósea.

Introducción

Las GMSI y el MQ son dos entidades caracterizadas por la proliferación clonal de células plasmáticas clínicamente asintomáticas. Entre los factores identificados como asociados a un mayor riesgo de progresión se ha descrito el concepto de “evolving” y “no-evolving” en los mielomas quiescentes, que se basa en el patrón evolutivo del CM. Así, serían definidos como MQ “evolving” aquellos pacientes con un incremento del CM de al menos el 10% en los primeros 6 meses de seguimiento o un incremento progresivo y constante del CM hasta el desarrollo de sintomatología. Estos casos se caracterizan por un tiempo hasta progresión más corto.

Objetivos, material y método

El objetivo del presente trabajo es comparar el valor del análisis de la evolución precoz del CM frente al análisis multiparamétrico mediante CMF del compartimento de CP, como predictores del riesgo de progresión en MQ y GMSI.

Se incluyeron en el estudio 61 pacientes con MQ y 311 con GMSI, definidos de acuerdo con los criterios diagnósticos de la Internacional Myeloma Working Group. Definimos como “evolving” aquellos MQ con incremento del CM de al menos 10% en el primer año, y debido al curso más indolente de las GMSI, fueron definidos como “evolving” GMSI aquellas con un incremento del 10% en los tres primeros años desde

el diagnóstico. La mediana de seguimiento fue superior a 40 meses y progresaron a MM sintomático el 87% de los pacientes con MQ y el 13% de las GMSI.

El estudio fenotípico se realizó al diagnóstico y de acuerdo con métodos previamente descritos.

Resultados

El 51% de los pacientes con MQ cumplían los criterios de “evolving” y presentaron un riesgo de progresión a los 2 años del 27% frente al 11% de los MQ “no evolving” ($p=0,003$). Las GMSI clasificadas como “evolving” fueron un 39% del total y de forma similar presentaron un riesgo de progresión a los 7 años del 19% frente a 7% de las GMSI “no evolving” ($p=0,05$).

El análisis del compartimento de CP de la MO mediante CMF multiparamétrica, tanto en el grupo “evolving” como “no evolving” de MQ y GMSI, permitía discriminar individuos con diferente riesgo de progresión. Así, en los pacientes con MQ “evolving” el riesgo de progresión a los 4 años fue de 46% frente al 8% para aquellos con \geq o $<$ de 95% de CPP ($p=0,01$). También dentro de las GMSI “evolving” los casos con $\geq 95\%$ CPP presentaban un riesgo de progresión a los 7 años del 72% frente al 12% de los pacientes con $<$ de 95% de CPP ($p=0,0001$). Estas diferencias fueron también significativas en los grupos de MQ y GMSI “no evolving” ($p=0,01$ y $p<0,0001$, respectivamente).

Basándonos en estas dos variables (tipo “evolving” y presencia de $\geq 95\%$ CPP), establecimos un índice pronóstico que identificó claramente tres grupos de riesgo en ambos grupos. En los MQ el riesgo de progresión a los 3 años se situó en 0%, 12% y 46%, para aquellos con ninguno, uno o dos factores de riesgo, respectivamente ($p<0,001$). También en las GMSI las diferencias fueron significativas, con un riesgo de

progresión a los 7 años de 2, 16 y 72% para pacientes con ninguno, uno o dos factores de riesgo, respectivamente ($p < 0,001$).

Ambas variables mostraron valor pronóstico independiente en el análisis multivariante, sin embargo la presencia de $\geq 95\%$ CPP se asociaba con un mayor riesgo de progresión tanto en los individuos con MQ como con GMSI (HR: 8,9 y 9,9 respectivamente), que el tipo “evolving” (HR 3,7 y 3,0 respectivamente).

Discusión

En las gammapatías asintomáticas el riesgo de progresión a enfermedad sintomática se mantiene de manera indefinida, por lo que se han realizado numerosos esfuerzos para identificar aquellos factores pronósticos que permitan identificar a los pacientes con mayor riesgo de progresión. Recientemente, Rosiñol ha identificado dos tipos de MQ en función de la evolución del CM (“evolving” y “no evolving”). Nuestros resultados confirman la existencia de estos dos grupos pronósticos en el MQ y se demuestra asimismo que este concepto también es aplicable a las GMSI.

La capacidad de la CMF para la discriminación de las CP normales y patológicas es de gran utilidad en el estudio de las gammapatías monoclonales, y la presencia de $\geq 95\%$ de CPP dentro del compartimento global de CP se asocia con alto riesgo de progresión tanto en el MQ como en la GMSI. Nuestros resultados muestran que tanto en los MQ como en las GMSI, los dos parámetros analizados (“evolving” y $\geq 95\%$ de CPP) tienen valor pronóstico independiente para evaluar el riesgo de progresión. La utilización conjunta de ambos parámetros es de utilidad para discriminar grupos pronóstico tanto en el MQ como en las GMSI, aunque la CMF tiene mayor poder en la predicción del riesgo y además tiene la ventaja de que la información se obtiene desde el momento del diagnóstico inicial.

Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells

Ernesto Pérez-Persona,¹ Gema Mateo,¹ Ramón García-Sanz,^{1,2} María-Victoria Mateos,¹ Natalia de las Heras,³ Alfonso García de Coca,⁴ José M. Hernández,⁵ Josefina Galende,⁶ Guillermo Martín-Núñez,⁷ Abelardo Báñez,⁸ José M. Alonso,⁹ Alejandro Martín,¹⁰ Consuelo López-Berges,¹ Alberto Orfao,^{2,11} Jesús F. San Miguel^{1,2} and María-Belén Vidriales,^{1,2}

¹Department of Haematology, University Hospital, ²Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca/ CSIC, Salamanca, ³Department of Haematology, Complejo Hospitalario, León, ⁴Department of Haematology, University Hospital, Valladolid, ⁵Department of Haematology, General Hospital, Segovia, ⁶Department of Haematology, Hospital Comarcal del Bierzo, Ponferrada, León, ⁷Department of Haematology, Hospital Nuestra Señora del Puerto de Plasencia, Cáceres, ⁸Department of Haematology, Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, ⁹Department of Haematology, Hospital Río Carrión, Palencia; ¹⁰Department of Haematology, Hospital Virgen de la Concha, Zamora, and ¹¹Department of Cytometry, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Summary

The present study explored the impact of two novel criteria; having >95% abnormal plasma cells by flow cytometry at diagnosis and the evolving subtype of the disease, as predictors of progression in 61 smouldering multiple myeloma (SMM) and 311 monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS) patients. Although both criteria were of prognostic value, the risk of progression was better identified by immunophenotyping [Hazard Ratio (HR) 6.2 and 17.2 for SMM and MGUS, respectively] than evolving subtype, which had independent prognostic value only in MGUS (HR 3.6). Immunophenotyping discriminated the different risk of progression within the evolving and non-evolving subgroups of SMM ($P = 0.01$) and MGUS ($P < 0.001$).

Keywords: smouldering myeloma, MGUS, evolving pattern, flow cytometry, risk of progression.

Received 24 May 2009; accepted for publication 4 August 2009

Correspondence: María-Belén Vidriales, Department of Haematology, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente 58-182, 37007 Salamanca. Spain.
E-mail: mbvidri@usal.es

Monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) and smouldering multiple myeloma (SMM) are two forms of asymptomatic plasma cell disorders that may eventually progress to multiple myeloma MM (International Myeloma

Working Group, 2003; Rajkumar, 2005). Several reports identified factors for progression in both entities (Weber *et al*, 1997; Cesana *et al*, 2002; Kyle *et al*, 2002; Rajkumar, 2005) and recently, Rosiñol *et al* (2003, 2005) described evolving and

First published online 11 October 2009
doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07929.x

© 2009 Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, **148**, 110–114

non-evolving SMMs based on their patterns of evolution. The evolving type was defined as an increase in the level of serum M protein of at least 10% during the first 6 months of follow-up, or a progressive and constant increase of the M component until overt MM developed. These patients had a shorter time to progression (TTP) and exhibited cytogenetic characteristics frequently observed in symptomatic MM (Rosiñol *et al*, 2005). Although the concept of evolving type has not yet been applied to MGUS, it could also be useful.

Multiparameter flow cytometry (MFC) has been increasingly used in the study of plasma cell dyscrasias (Harada *et al*, 1993; Rawstron *et al*, 2008). A high proportion of abnormal plasma cells (aPC) within the bone marrow plasma cell (BMPC) compartment (>95% aPC/BMPC) has been shown to predict the risk of progression in both SMM and MGUS (Ocqueteau *et al*, 1998; Pérez-Persona *et al*, 2007).

The present study explored the impact of these two criteria (having >95% aPC/BMPC by MFC at diagnosis and the evolving subtype of the disease) as predictors of progression in SMM and MGUS. Theoretically, earlier and more accurate definition of the risk of progression in both entities should help to establish a better follow-up strategy adapted to the patient's individual risk.

Material and Methods

The study included 61 patients with SMM and 311 patients with MGUS. The International Myeloma Working Group (2003) criteria were used for diagnosis and evaluation of progression; all patients had more than 10% of PC BM infiltration and/or monoclonal component higher than 30 g/l at diagnosis. Smouldering multiple myeloma and MGUS patients had a minimum follow-up of 24 and 36 months, respectively, with measurement of monoclonal component (MC) at least four times a year for SMM and twice a year for MGUS. Evolving SMM was defined as having an increase of at least 10% of the MC in the first year, and evolving MGUS, which has an indolent course, was defined as an increase of MC of at least 10% by the third year, confirmed by two consecutive measurements separated by at least 1 month. Median follow-up for SMM was 42 months (range: 24–110 months) and 57 months (range: 36–168 months) for MGUS. Twenty-four MGUS (8%) and 17 SMM patients (28%) progressed. Median TTP for SMM patients was 28 months (range: 13–73 months), all evolving into symptomatic MM. In MGUS, median TTP was 49 months (range: 12–106 months), with 21 patients (87%) progressing to symptomatic MM, and three cases (13%) to non-Hodgkin lymphoma.

Immunophenotypic analyses were performed at diagnosis according to established methods (Mateo *et al*, 2005; Pérez-Persona *et al*, 2007; Paiva *et al*, 2008; Rawstron *et al*, 2008), using a direct immunofluorescence technique [CD38-fluorescein isothiocyanate (FITC)/ CD56-phycoerythrin (PE)/ CD19-peridinin chlorophyll-cyanin 5 (PerCP-Cy5)/

CD45-allphycocyanin (APC)]. Acquisition was performed in a FACSCalibur flow cytometer [BD Biosciences (BDB), San Jose, CA, USA] using the CELLQUEST software (BDB), providing information from $\geq 3 \times 10^5$ BM cells. Normal and aberrant phenotypes (polyclonal and clonal PC) were discriminated using a validated immunophenotypic approach (Mateo *et al*, 2005; Pérez-Persona *et al*, 2007; Paiva *et al*, 2008; Rawstron *et al*, 2008), i.e., absence of CD19 and/or CD45 expression, over expression of CD56, and weak expression of CD38, the most frequent aberrant phenotypes on myelomatous PC.

The total percentage of PCs from the whole BM cellularity and the percentage of abnormal plasma cells (aPC) within the BMPC compartment (referred to as aPC/BMPC) were recorded.

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for statistical analyses, as elsewhere described (Mateo *et al*, 2005; Pérez-Persona *et al*, 2007; Paiva *et al*, 2008).

Results

The main clinical and biological characteristics of the patients at diagnosis are shown in Table I.

Within the SMM group, 31 out of 61 patients (51%) were identified as having an evolving SMM, while 30 patients (49%) had a stable MC and were considered non-evolving SMMs. Considering MGUS patients, 121 cases (39%) were classified as evolving, and 190 (61%) as non-evolving. The cumulative

Table I. Main clinical and biological characteristics of MGUS and SMM patients.

Characteristics	MGUS N: 311	SMM N: 61
Gender (male/female)	155/156	28/33
Age (years)*	71 (32–95)	69 (39–88)
Serum MC (g/l)*	16 (6–30)	21.3 (6.2–50.3)
Ig isotype		
IgG	76%	64%
IgA	24%	34%
Light chain isotype		
Kappa	55%	64%
Lambda	45%	36%
Cases with immunoparesis†	27 (9%)	14 (23%)
% BMPC by morphology (aspirate)*	4 (1.0–9.7)	12 (2.4–12.0)
% BMPC by FC*	0.98 (0.01–37)	2.86 (0.19–27)
% abnormal PC (among BMPC)*	73 (0–100)	95 (11–100)
% patients with >95% aPC	56 (18%)	32 (52%)
Aneuploidy (%)	72 (33)	24 (39)
% cases that progressed	24 (8%)	17 (28%)

MC, monoclonal compartment; Ig, immunoglobulin; BMPC, bone marrow plasma cells; aPC, atypical plasma cell.

*Mean (range).

†Immunoparesis defined as reduction under the lower normal limit of the uninvolved immunoglobulins.

Short Report

probability of progression (CPP) at 3 years was 27% and 11% for evolving and non-evolving SMM cases, respectively ($P = 0.003$) (Fig 1A), and for MGUS patients the CPP at 7 years was 19% for evolving and 7% for non-evolving cases, respectively ($P = 0.05$) (Fig 1D).

MFC showed that 52% of SMM patients had $\geq 95\%$ of aPC/BMPC, while only 18% of cases reached this threshold in the MGUS group. This cut-off level distinguished the different risks groups in the two entities (Fig 1B and E).

Interestingly, considering evolving and non-evolving subgroups within the separate groups of SMM and MGUS patients, the evaluation of the BMPC compartment by MFC discriminated the different risks of progression. Thus, in the evolving SMM group, the risk of progression at 3 years for patients with $\geq 95\%$ aPC/BMPC and $< 95\%$ aPC/BMPC was 46% and 8% ($P = 0.01$), respectively. This was also observed in the non-evolving SMM cases, in which the risk of progression at 3 years was 15% for cases with $\geq 95\%$ aPC/BMPC, whereas no progressions were observed in the $< 95\%$ aPC/BMPC group ($P = 0.01$). Considering evolving MGUS patients, the risk of

progression for cases with $\geq 95\%$ aPC/BMPC and $< 95\%$ aPC/BMPC at 7 years was 72% and 12% ($P < 0.0001$), respectively. Similarly, among the non-evolving MGUS patients, the risk of progression at 7 years was 29% and 2% for cases with $\geq 95\%$ and $< 95\%$ aPC/BMPC, respectively ($P < 0.0001$).

Based on these two variables, we designed a prognostic index that clearly identified three risk groups. Among SMM patients, the CPP at 3 years was 0% for cases with no risk factors ($< 95\%$ aPC/BM and non-evolving), 12% for cases with one risk factor ($\geq 95\%$ aPC/BM or evolving subtype) and 46% for cases with both factors ($\geq 95\%$ aPC/BM and evolving subtype) ($P < 0.001$). The same approach was used for MGUS patients, with a CPP at 7 years of 2%, 16% and 72% for patients with none, one and two risk factors, respectively ($P < 0.001$) (Fig 1E and F).

Finally, we performed a multivariate analysis for PFS including, in addition to the already mentioned variables, those with significant impact in the univariate analysis (percentage of BMPC by morphology and by flow cytometry, and presence of immunoparesis; for MGUS we also included Bence-Jones proteinuria > 0.2 g/24 h, DNA aneuploidy and

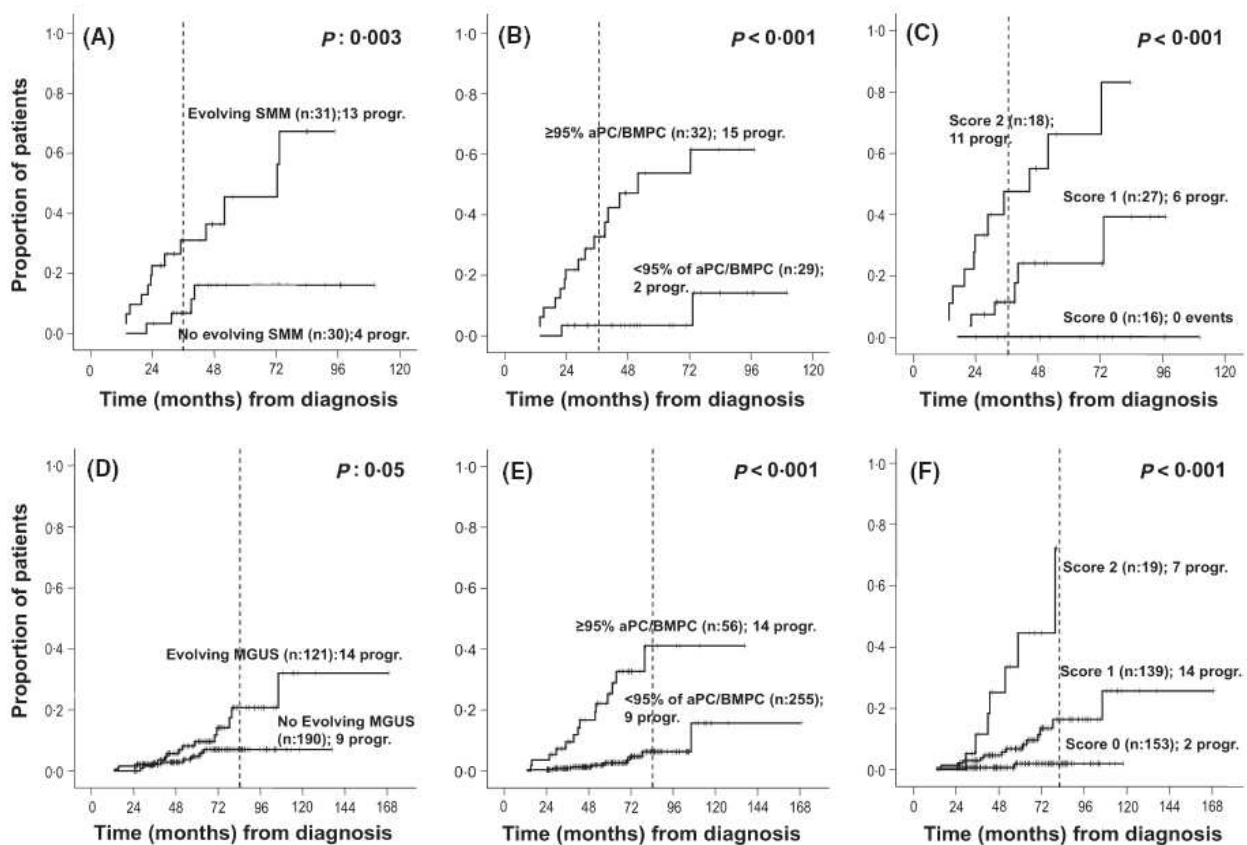


Fig 1. Time to progression (TTP) in SMM and MGUS with respect to percentage of aPC/BMPC, evolving concept and a new score. Upper panels: Risk of progression for SMM. Panel A: 27% vs. 11% for evolving SMM vs. non-evolving SMM ($P = 0.003$). Panel B: 23% vs. 3% for patients with $\geq 95\%$ vs. $< 95\%$ aPC/BMPC ($P < 0.001$). Panel C: Based on the score system (see text) of 0%, 12% and 46% for patients with 0, 1 or 2 points ($P < 0.001$). Lower panels: Risk of progression for MGUS. Panel D: 19% vs. 7% for evolving MGUS vs. non-evolving MGUS ($P = 0.05$). Panel E: 41% vs. 6% for patients with $\geq 95\%$ vs. $< 95\%$ aPC/BMPC ($P < 0.001$). Panel F: Based on the score system (see text) of 2%, 16% and 72% for patients with 0, 1 or 2 points ($P < 0.001$).

MC levels ≥ 20 g/l). In MGUS patients, having $\geq 95\%$ aPC/BMPC (HR: 17.2; $P < 0.001$) and the evolving concept (HR: 3.6; $P = 0.008$) together with aneuploidy (HR: 5.07; $P = 0.001$) were of independent prognostic value. However, for SMM patients only, having $\geq 95\%$ aPC/BMPC (HR: 6.2; $P = 0.02$) and immunoparesis (HR: 4.0; $P = 0.02$) were selected in the model. Interestingly, the greater effect on risk of progression was shown by $\geq 95\%$ aPC/BMPC in both entities.

Discussion

Asymptomatic gammopathies are characterised by the presence of a MC without evidence of organ damage (International Myeloma Working Group, 2003), MGUS being the paradigm of such entities. Several efforts have been made to identify variables that predict progression (Kyle *et al*, 2002), because the risk of transformation (Cesana *et al*, 2002) is life-long and patients should be monitored throughout their lives. Therefore, a better knowledge of risk factors associated with progression would help to individualise follow-up strategies. Accordingly, Rosiñol *et al* (2003, 2005) described two types of SMM on the basis of the MC dynamics observed in early phases of evolution. However, no other group has confirmed the existence of these two types of SMM. Our results support the different prognosis of these two categories of SMM, and we also showed that the same concept could be applied to patients diagnosed with MGUS.

Multiparametric flow cytometry has proved to be a useful technique in the study of monoclonal gammopathies (Ocqueteau *et al*, 1998; Davies *et al*, 2002; Mateo *et al*, 2005), particularly because it allows myelomatous plasma cells to be discriminated from their normal counterparts (Harada *et al*, 1993; Ocqueteau *et al*, 1998), which may be of use in differentiating the diagnoses of MGUS and MM patients (Ocqueteau *et al*, 1998), predicting the risk of progression in SMM and MGUS (Pérez-Persona *et al*, 2007), and in studying minimal residual disease in MM (Davies *et al*, 2002; San Miguel *et al*, 2002; Mateo *et al*, 2005; Paiva *et al*, 2008).

The present study showed that both factors ($\geq 95\%$ aPC/BMPC and the evolving type) had prognostic value in predicting the risk of progression in MGUS and SMM patients. The risk was clearly and more accurately identified by the immunophenotypic analyses compared with the evolving concept. Moreover, MFC allows the discrimination of two groups with different risks of progression, based on the percentage aPC/BMPC in evolving and non-evolving gammopathies. Given that both variables were independent, we decided to test the value of a scoring system based on the presence or absence of these two characteristics that discriminate different risks of progression in SMM and MGUS. It should be noted that these are complementary, since the MFC analysis provides the information upfront while the evolving concept yields information about the dynamic evolution of the MC.

In summary, we confirmed not only the existence of two prognostic groups of SMM in accordance with the evolution of MC during the early phases of follow-up, but also that the same concept can be applied to MGUS. Nevertheless, MFC analysis of the BMPC compartment is a more powerful prognostic variable for predicting progression in both SMM and MGUS. It is also important to consider that the MFC information can be obtained at the time of diagnosis, which would help to establish an individually adapted follow-up strategy from the early stages, with a lower emotional cost to patients.

Acknowledgements

This work was supported in part by a national Grant from the Spanish 'Instituto de Salud Carlos III' (Ref. PI50575) and 'Ministerio de Educación y Ciencia' (Ref. SAF: 2004-06587). We would also like to thank M. Anderson and M.J. Rodrigo for their help with the English language. This work was supported by the Cooperative Research Thematic Network (RTICs; RD06/0020/0006), MM Jevitt, SL firm, and Instituto de Salud Carlos III/ Subdirección General de Investigación Sanitaria (FIS: PI060339; 02/0905; 01/0089/01-02; and PI060339).

Author contributions

MB Vidriales, JF San Miguel and A Orfao conceived the idea and designed the study protocol. E Pérez Persona, MB Vidriales, G Mateo and C López-Berges analysed the flow cytometry data. E Pérez Persona, MB Vidriales were involved in the data analysis and co-wrote the paper, together with JF San Miguel. The paper was reviewed and corrected by JF San Miguel and A Orfao. R García-Sanz and MV Mateos were responsible for the databases of clinical cases and follow-up of patients. A. Garcia de Coca A, J Galende, G Martín-Nuñez, JM Alonso, N. de las Heras, JM Hernández JM, A Barez and A Martín were responsible for clinical cases and follow-up of patients, and contributed to the clinical data entry.

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest.

References

- Cesana, C., Klersy, C., Barbarano, L., Nosari, A.M., Crugnola, M., Pungolino, E., Gargantini, L., Granata, S., Valentini, M. & Morra, E. (2002) Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, **20**, 1625–1634.
- Davies, F.E., Rawstron, A.C., Owen, R.G. & Morgan, G.J. (2002) Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, **15**, 197–222.
- Harada, H., Kawano, M.M., Huang, N., Harada, Y., Iwato, K., Tanabe, O., Tanaka, H., Sakai, A., Asaoku, H. & Kuramoto, A. (1993) Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*, **81**, 2658–2663.

Short Report

- International Myeloma Working Group (2003) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*, **121**, 749–757.
- Kyle, R.A., Thernau, T.M., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F. & Melton, L.J. III (2002) A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*, **346**, 564–569.
- Mateo, M.G., Miguel Izquierdo, J.F. & Orfao, A. (2005) Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods in Molecular Medicine*, **113**, 5–24.
- Ocqueteau, M., 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**, 1655–1665.
- Paiva, B., Vidriales, M.B., Cerveró, J., Mateo, G., Pérez, J.J., Montalbán, M.A., Sureda, A., Montejaño, L., Gutiérrez, N., García de Coca, A., Heras, N., Mateos, M.V., López-Berges, C., García-Boyeró, R., Galende, J., Hernández, J., Palomera, L., Carrera, D., Martínez, R., de la Rubia, J., Martín, A., Bladé, C.J., Orfao, A. & San Miguel, J.F. (2008) Multiparameter flow cytometry remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*, **112**, 4017–4023.
- Pérez-Persona, E., Vidriales, M.B., Mateo, G., García-Sanz, R., Mateos, M.V., García de Coca, A., Galende, J., Martín-Nuñez, G., Alonso, J.M., delas Heras, N., Hernández, J.M., Martín, A., López-Berges, C., Orfao, A. & San Miguel, J.F. (2007) New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, **110**, 2586–2592.
- Rajkumar, S.V. (2005) MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. *Hematology*, **2005**, 340–345.
- Rawstron, A.C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdicikova, 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., Omede, P., Pellat-Deceunynck, C., Pérez, A.M., Petrucci, M., Ruggeri, M., Rymkiewicz, G., Schmitz, A., Schreder, M., Seynaeve, C., Spacek, M., de Tute, R.M., Van Valckenborgh, E., Weston-Bell, N., Owen, R.G., San Miguel, J.F., Sonneveld, P. & Johnsen, H.E. (2008) Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, **93**, 431–438.
- Rosiñol, L., Bladé, J., Esteve, J., Aymerich, M., Rozman, M., Montoto, S., Gine, E., Nadal, E., Filella, X., Queralt, R., Carrio, A. & Montserrat, E. (2003) Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *British Journal of Haematology*, **123**, 631–636.
- Rosiñol, L., Carrio, A., Bladé, J., Queralt, R., Aymerich, M., Cibeira, M.T., Esteve, J., Rozman, M., Campo, E. & Montserrat, E. (2005) Comparative genomic hybridisation identifies two variants of smoldering multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **130**, 729–732.
- 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. & Orfao, A. (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.
- Weber, D.M., Dimopoulos, M.A., Moullopoulos, L.A., Delasalle, K.B., Smith, T. & Alexanian, R. (1997) Prognostic features of asymptomatic multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **97**, 810–814.

Conclusiones

Respecto a la cuantificación de células plasmáticas de la MO y el análisis específico del compartimento de CP de la MO:

1. La CMF permite discriminar entre células plasmáticas normales y células plasmáticas patológicas tanto en GMSI como en MQ.
2. Considerando la celularidad global de la MO, el porcentaje de CP detectado por CMF en la MO de los pacientes con MQ es significativamente superior al detectando en los casos de las GMSI.
3. Considerando exclusivamente el compartimento de CP de la MO, el porcentaje de las células plasmáticas con fenotipo aberrante es significativamente superior en los MQ que en las GMSI. Es decir, en el MQ el componente predominante del compartimento de CP de la MO eran las CPP, mientras que en las GMSI la proporción CPP/CPN estaba más equilibrada. En este sentido, la mayoría de los casos de MQ (60%) mostraban más del 95% de CPP dentro del compartimento de CP de la MO, mientras que esta situación se observaba sólo en una minoría (18%) de las GMSI.

Respecto a la capacidad de la CMF multiparamétrica para predecir el riesgo de progresión a MM sintomático en las GMSI y en el MQ:

1. El análisis del compartimento de CP de la MO mediante CMF demostró que la presencia de un porcentaje de células plasmáticas con fenotipo aberrante superior al 95% permite identificar individuos

con alto riesgo de progresión a enfermedad sintomática tanto en los casos con GMSI como en aquellos con MQ.

2. Esta aplicación de la CMF es útil no sólo en el grupo global de pacientes con MQ y GMSI, sino también en los individuos considerados de bajo riesgo por otros criterios convencionales.
3. El análisis del contenido de ADN mediante CMF es un factor pronóstico independiente en las GMSI.
4. Hemos establecido un índice pronóstico que permite discriminar el riesgo de progresión en los pacientes con GMSI y MQ, lo que podría contribuir a establecer un seguimiento individualizado de los pacientes, adaptado al riesgo de progresión. Además, esta herramienta podría contribuir a seleccionar pacientes con MQ de alto riesgo que podrían beneficiarse de tratamientos precoces con fármacos no citotóxicos.
5. Nuestros resultados no sólo confirman la existencia y valor pronóstico del concepto de MQ evolving, sino que hemos demostrado que este concepto también es aplicable a las GMSI, identificando que las GMSI “evolving” tienen un impacto pronóstico adverso. Sin embargo, este parámetro tiene menor poder predictivo que el porcentaje de CPP determinado por CMF, que posee la ventaja adicional de que la información se obtiene en el momento del diagnóstico.

Bibliografía

- 1 Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and solitary plasmacytoma. Implications for progression to overt multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997;11:71-87.
- 2 Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol.* 2006;134:573-589.
- 3 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006 Mar 30 ;354 (13):1362 -9. 2006;354:1362-1369.
- 4 Giraldo CP, Franco GE, Bernal PM et al. [Aging of the population and incidence of primary acquired hemopathies in the Autonomous Community of Aragon]. *Rev Esp Salud Publica.* 1998;72:559-570.
- 5 Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009;113:5412-5417.
- 6 Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.* 2003;121:749-757.
- 7 Durie BG, Kyle RA, Belch A et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J.* 2003;4:379-398.
- 8 Saleun JP, Vicariot M, Deroff P, Morin JF. Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistere, France. *J Clin Pathol.* 1982;35:63-68.
- 9 Axelsson U. A 20-year follow-up study of 64 subjects with M-components. *Acta Med Scand.* 1986;219:519-522.
- 10 Neriishi K, Nakashima E, Suzuki G. Monoclonal gammopathy of undetermined significance in atomic bomb survivors: incidence and transformation to multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2003;121:405-410.
- 11 Cohen HJ, Crawford J, Rao MK, Pieper CF, Currie MS. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *Am J Med.* 1998;104:439-444.
- 12 Landgren O, Gridley G, Turesson I et al. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood.* 2006;107:904-906.
- 13 Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K, Kamihira S, Tomonaga M. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: study of 52,802 persons in Nagasaki City, Japan. *Mayo Clin Proc.* 2007;82:1474-1479.
- 14 Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood.* 2008;111:2962-2972.
- 15 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer.* 2004;101:2667-2674.
- 16 Smith A, Wisloff F, Samson D. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol.* 2006;132:410-451.
- 17 Anonymous. *Cancer Facts and Figures 2008.* American Cancer Society. 2008.
- 18 Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Maniatis A, Alexanian R. Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood.* 2000;96:2037-2044.

- 19 Rajkumar SV. MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2005;340-345.
- 20 Kyle RA. New Strategies for MGUS and Smoldering Multiple Myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2004;2:507-509.
- 21 Lynch HT, Ferrara K, Barlogie B et al. Familial myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359:152-157.
- 22 Ogmundsdottir HM, Haraldsdottir V, Johannesson GM et al. Familiality of benign and malignant paraproteinemias. A population-based cancer-registry study of multiple myeloma families. *Haematologica*. 2005;90:66-71.
- 23 Kristinsson SY, Bjorkholm M, Goldin LR et al. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood*. 2008;112:3052-3056.
- 24 Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR et al. Risk of plasma-cell and lymphoproliferative disorders among 14,621 first-degree relatives of 4,458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in Sweden. *Blood*. 2009.
- 25 Eriksson M, Hallberg B. Familial occurrence of hematologic malignancies and other diseases in multiple myeloma: a case-control study. *Cancer Causes Control*. 1992;3:63-67.
- 26 Albright LA, Schwab A, Camp NJ, Farnham JS, Thomas A. Population-based risk assessment for other cancers in relatives of hereditary prostate cancer (HPC) cases. *Prostate*. 2005;64:347-355.
- 27 Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood*. 2008;111:3388-3394.
- 28 Omar RZ, Barber JA, Smith PG. Cancer mortality and morbidity among plutonium workers at the Sellafield plant of British Nuclear Fuels. *Br J Cancer*. 1999;79:1288-1301.
- 29 Telle-Lamberton M, Samson E, Caer S et al. External radiation exposure and mortality in a cohort of French nuclear workers. *Occup Environ Med*. 2007;64:694-700.
- 30 Wing S, Richardson D, Wolf S et al. A case control study of multiple myeloma at four nuclear facilities. *Ann Epidemiol*. 2000;10:144-153.
- 31 Cardis E, Vrijheid M, Blettner M et al. The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry: estimates of radiation-related cancer risks. *Radiat Res*. 2007;167:396-416.
- 32 Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K et al. Relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance and radiation exposure in Nagasaki atomic bomb survivors. *Blood*. 2009;113:1639-1650.
- 33 Boice JD, Jr., Engholm G, Kleinerman RA et al. Radiation dose and second cancer risk in patients treated for cancer of the cervix. *Radiat Res*. 1988;116:3-55.
- 34 Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA et al. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in the Agricultural Health Study. *Blood*. 2009.
- 35 Landgren O, Rajkumar SV, Pfeiffer RM et al. Obesity is associated with an increased risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) among African-American and Caucasian women. *Blood*. 2010.
- 36 Blade J. Clinical practice. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2006;355:2765-2770.

- .-37 Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:927-937.
- .-38 Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2210-2216.
- .-39 Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998;91:3-21.
- .-40 Blade J, Rosinol L, Cibeira MT, de Larrea CF. Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*. 2008;22:1651-1657.
- .-41 Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2002;100:1417-1424.
- .-42 Rasillo A, Taberero MD, Sanchez ML et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cancer*. 2003;97:601-609.
- .-43 Brousseau M, Leleu X, Gerard J et al. Hyperdiploidy is a common finding in monoclonal gammopathy of undetermined significance and monosomy 13 is restricted to these hyperdiploid patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13:6026-6031.
- .-44 Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:175-187.
- .-45 Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2004;351:1860-1873.
- .-46 Vacca A, Ribatti D, Roncali L et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994;87:503-508.
- .-47 Gregersen H, Ibsen J, Mellekjær L et al. Mortality and causes of death in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 2001;112:353-357.
- .-48 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346:564-569.
- .-49 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later. *Mayo Clin Proc*. 2004;79:859-866.
- .-50 Blade J, Lopez-Guillermo A, Rozman C et al. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 1992;81:391-394.
- .-51 van de Poel MH, Coebergh JW, Hillen HF. Malignant transformation of monoclonal gammopathy of undetermined significance among out-patients of a community hospital in southeastern Netherlands. *Br J Haematol*. 1995;91:121-125.
- .-52 Baldini L, Guffanti A, Cesana BM et al. Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood*. 1996;87:912-918.
- .-53 Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2007;356:2582-2590.
- .-54 Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 2008;111:785-789.

- .-55 Pepe J, Petrucci MT, Nofroni I et al. Lumbar bone mineral density as the major factor determining increased prevalence of vertebral fractures in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol.* 2006;134:485-490.
- .-56 Bida JP, Kyle RA, Therneau TM et al. Disease associations with monoclonal gammopathy of undetermined significance: a population-based study of 17,398 patients. *Mayo Clin Proc.* 2009;84:685-693.
- .-57 Melton LJ, III, Rajkumar SV, Khosla S et al. Fracture risk in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Bone Miner Res.* 2004;19:25-30.
- .-58 Kristinsson SY, Tang M, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of skeletal fractures: a population-based study. *Blood.* 2010.
- .-59 Bataille R, Chappard D, Basle MF. Quantifiable excess of bone resorption in monoclonal gammopathy is an early symptom of malignancy: a prospective study of 87 bone biopsies. *Blood.* 1996;87:4762-4769.
- .-60 Hernandez JM, Suquia B, Queizan JA et al. Bone remodeling markers are useful in the management of monoclonal gammopathies. *Hematol J.* 2004;5:480-488.
- .-61 Pecherstorfer M, Seibel MJ, Woitge HW et al. Bone resorption in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy of undetermined significance: quantification by urinary pyridinium cross-links of collagen. *Blood.* 1997;90:3743-3750.
- .-62 Kelly JJ, Jr., Kyle RA, O'Brien PC, Dyck PJ. Prevalence of monoclonal protein in peripheral neuropathy. *Neurology.* 1981;31:1480-1483.
- .-63 Kristinsson SY, Fears TR, Gridley G et al. Deep vein thrombosis after monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Blood.* 2008;112:3582-3586.
- .-64 Sallah S, Husain A, Wan J, Vos P, Nguyen NP. The risk of venous thromboembolic disease in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Ann Oncol.* 2004;15:1490-1494.
- .-65 Kristinsson SY, Pfeiffer RM, Bjorkholm M et al. Arterial and venous thrombosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: a population-based study. *Blood.* 2010;115:4991-4998.
- .-66 Berenson JR, Anderson KC, Audell RA et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a consensus statement. *Br J Haematol.* 2010.
- .-67 Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood.* 2005;106:812-817.
- .-68 Cesana C, Klersy C, Barbarano L et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2002;20:1625-1634.
- .-69 Montoto S, Blade J, Montserrat E. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2002;346:2087-2088.
- .-70 Drayson M, Tang LX, Drew R et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood.* 2001;97:2900-2902.
- .-71 Kumar S, Rajkumar SV, Kyle RA et al. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Oncol.* 2005;23:5668-5674.

- 72 Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010.
- 73 Weber DM, Dimopoulos MA, Moulopoulos LA et al. Prognostic features of asymptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1997;97:810-814.
- 74 Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. Prognosis of asymptomatic multiple myeloma. *Arch Intern Med.* 1988;148:1963-1965.
- 75 Rosinol L, Blade J, Esteve J et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol.* 2003;123:631-636.
- 76 Facon T, Menard JF, Michaux JL et al. Prognostic factors in low tumour mass asymptomatic multiple myeloma: a report on 91 patients. The Groupe d'Etudes et de Recherche sur le Myelome (GERM). *Am J Hematol.* 1995;48:71-75.
- 77 Alexanian R. Localized and indolent myeloma. *Blood.* 1980;56:521-525.
- 78 Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV et al. 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.* 2010;24:1121-1127.
- 79 Bird J, Behrens J, Westin J et al. UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br J Haematol.* 2009;147:22-42.
- 80 Blade J, Dimopoulos M, Rosinol L, Rajkumar SV, Kyle RA. Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations. *J Clin Oncol.* 2010;28:690-697.
- 81 Blade J, Dimopoulos M, Rosinol L, Rajkumar SV, Kyle RA. Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma: Current Diagnostic Criteria, New Predictors of Outcome, and Follow-Up Recommendations. *J Clin Oncol.* 2009.
- 82 Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Datsis I et al. Imaging of myeloma bone disease--implications for staging, prognosis and follow-up. *Acta Oncol.* 2000;39:823-827.
- 83 Anagnostopoulos A, Galani E, Gika D et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in patients with solid tumors: effects of chemotherapy on the monoclonal protein. *Ann Hematol.* 2004;83:658-660.
- 84 Rajkumar SV, Lacy MQ, Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Blood Rev.* 2007;21:255-265.
- 85 Bianchi G, Kyle RA, Colby CL et al. Impact of optimal follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) on early diagnosis and prevention of myeloma-related complications. *Blood.* 2010.
- 86 Anderson KC, Alsina M, Bensinger W et al. Multiple myeloma. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2007;5:118-147.
- 87 Berenson JR, Yellin O, Boccia RV et al. Zoledronic acid markedly improves bone mineral density for patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and bone loss. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6289-6295.
- 88 Terpos E, Sezer O, Croucher PI et al. The use of bisphosphonates in multiple myeloma: recommendations of an expert panel on behalf of the European Myeloma Network. *Ann Oncol.* 2009;20:1303-1317.

- 89 Musto P, Falcone A, Sanpaolo G et al. Pamidronate reduces skeletal events but does not improve progression-free survival in early-stage untreated myeloma: results of a randomized trial. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:1545-1548.
- 90 Musto P, Petrucci MT, Bringhen S et al. A multicenter, randomized clinical trial comparing zoledronic acid versus observation in patients with asymptomatic myeloma. *Cancer*. 2008;113:1588-1595.
- 91 Cohen AL, Sarid R. The relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance and venous thromboembolic disease. *Thromb Res*. 2009.
- 92 Madan S, Greipp PR. The incidental monoclonal protein: current approach to management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Blood Rev*. 2009;23:257-265.
- 93 Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E et al. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I. A randomized study. Myeloma Group of Wertern Sweden. *Eur J Haematol*. 1993;50:95-102.
- 94 Grignani G, Gobbi PG, Formisano R et al. A prognostic index for multiple myeloma. *Br J Cancer*. 1996;73:1101-1107.
- 95 Riccardi A, Mora O, Tinelli C et al. Long-term survival of stage I multiple myeloma given chemotherapy just after diagnosis or at progression of the disease: a multicentre randomized study. Cooperative Group of Study and Treatment of Multiple Myeloma. *Br J Cancer*. 2000;82:1254-1260.
- 96 Rajkumar SV, Gertz MA, Lacy MQ et al. Thalidomide as initial therapy for early-stage myeloma. *Leukemia*. 2003;17:775-779.
- 97 Weber D, Rankin K, Gavino M, Delasalle K, Alexanian R. Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2003;21:16-19.
- 98 Barlogie B, van Rhee F, Shaughnessy JD, Jr. et al. Seven-year median time to progression with thalidomide for smoldering myeloma: partial response identifies subset requiring earlier salvage therapy for symptomatic disease. *Blood*. 2008;112:3122-3125.
- 99 Mateos M-V, Lopez-Corral L, Hernandez MT et al. Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Lenalidomide-Dexamethasone (Len/dex) Vs Therapeutic Abstinence in Smoldering Multiple Myeloma at High Risk of Progression to Symptomatic MM: Results of the First Interim Analysis. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2009;20:114:614.
- 100 Funaro A, Malavasi F. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1999;13:54-61.
- 101 Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother*. 1993;2:137-144.
- 102 Harada H, Kawano MM, Huang N et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. 1993;81:2658-2663.
- 103 Leo R, Boeker M, Peest D et al. Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38⁺⁺, CD56⁺, CD54⁺, cIg⁺ is the common phenotype of myeloma cells. *Ann Hematol*. 1992;64:132-139.
- 104 Almeida J, Orfao A, Mateo G et al. Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathol Biol (Paris)*. 1999;47:119-127.
- 105 San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol*. 1995;8:735-759.

- 106 Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood*. 1990;76:1739-1747.
- 107 Mateo MG, Miguel Izquierdo JF, Orfao dM. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol Med*. 2005;113:5-24.
- 108 Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998;152:1655-1665.
- 109 Ocqueteau M, Orfao A, Garcia-Sanz R et al. Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol*. 1996;95:489-493.
- 110 Ruiz-Arguelles GJ, San Miguel JF. Cell surface markers in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 1994;69:684-690.
- 111 Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111:3941-3967.
- 112 Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T et al. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood*. 1996;88:289-296.
- 113 Hata H, Matsuzaki H, Sonoki T et al. Establishment of a CD45-positive immature plasma cell line from an aggressive multiple myeloma with high serum lactate dehydrogenase. *Leukemia*. 1994;8:1768-1773.
- 114 Papadaki H, Kyriakou D, Foudoulakis A et al. Serum levels of soluble IL-6 receptor in multiple myeloma as indicator of disease activity. *Acta Haematol*. 1997;97:191-195.
- 115 Gaillard JP, Bataille R, Brailly H et al. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol*. 1993;23:820-824.
- 116 Filella X, Blade J, Guillermo AL et al. Cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1alpha) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma. *Cancer Detect Prev*. 1996;20:52-56.
- 117 Ocqueteau M, San Miguel JF, Gonzalez M, Almeida J, Orfao A. Do myelomatous plasma cells really express surface immunoglobulins? *Haematologica*. 1996;81:460-463.
- 118 Drew M, Barker HF, Ball J et al. Very late antigen (VLA) expression by normal and neoplastic human plasma cells; including an assessment of antibodies submitted to the Vth International Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens using human myeloma cell lines. *Leuk Res*. 1996;20:619-624.
- 119 Helfrich MH, Livingston E, Franklin IM, Soutar RL. Expression of adhesion molecules in malignant plasma cells in multiple myeloma: comparison with normal plasma cells and functional significance. *Blood Rev*. 1997;11:28-38.
- 120 Pellat-Deceunynck C, Barille S, Puthier D et al. Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res*. 1995;55:3647-3653.
- 121 Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997;11:27-42.

- 122 Tominaga N, Katagiri S, Ohnishi M et al. Analysis of surface antigen expression of human immunoglobulin-secreting cells: phenotypic heterogeneity in normal counterparts of myeloma cells. *Br J Haematol.* 1989;73:302-308.
- 123 Vidriales MB, Anderson KC. Adhesion of multiple myeloma cells to the bone marrow microenvironment: implications for future therapeutic strategies. *Mol Med Today.* 1996;2:425-431.
- 124 Barker HF, Hamilton MS, Ball J, Drew M, Franklin IM. Expression of adhesion molecules LFA-3 and N-CAM on normal and malignant human plasma cells. *Br J Haematol.* 1992;81:331-335.
- 125 Van Camp B, Durie BG, Spier C et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood.* 1990;76:377-382.
- 126 Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood.* 1999;93:1032-1037.
- 127 Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996;94:318-323.
- 128 Edmead CE, Lamb JR, Hoyne GF. The T cell surface protein, CD28. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:1053-1057.
- 129 Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol.* 1998;18:389-418.
- 130 Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N et al. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood.* 1994;84:2597-2603.
- 131 Brown RD, Pope B, Yuen E, Gibson J, Joshua DE. The expression of T cell related costimulatory molecules in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1998;31:379-384.
- 132 Zhang XG, Olive D, Devos J et al. Malignant plasma cell lines express a functional CD28 molecule. *Leukemia.* 1998;12:610-618.
- 133 Robillard N, Jego G, Pellat-Deceunynck C et al. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 1998;4:1521-1526.
- 134 Shapiro VS, Mollenauer MN, Weiss A. Endogenous CD28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: implications for multiple myeloma progression. *Blood.* 2001;98:187-193.
- 135 Hussein M, Berenson JR, Niesvizky R et al. A phase I multidose study of dacetuzumab (SGN-40; humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma. *Haematologica.* 2010;95:845-848.
- 136 Rawstron AC, Owen RG, Davies FE et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol.* 1997;97:46-55.
- 137 Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1999;107:121-131.
- 138 Jego G, Robillard N, Puthier D et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood.* 1999;94:701-712.
- 139 Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia.* 2005;19:449-455.

- 140 San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E et al. Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003;30:187-195.
- 141 Zandecki M, Facon T, Bernardi F et al. CD19 and immunophenotype of bone marrow plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Pathol.* 1995;48:548-552.
- 142 Darzynkiewicz Z, Traganos F, Melamed MR. New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry.* 1980;1:98-108.
- 143 Fonseca R, Barlogie B, Bataille R et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004;64:1546-1558.
- 144 Zandecki M, Lai JL, Genevieve F et al. Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood.* 1997;90:3682-3690.
- 145 Larsen JK. Cell proliferation: analysis by flow cytometry. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1992;34:317-335.
- 146 Andreeff M, Darzynkiewicz Z. Multiparameter flow cytometry. Part II. application in hematology. *Clin Bull.* 1981;11:120-130.
- 147 Braylan RC. Attributes and applications of flow cytometry. *Ann Clin Lab Sci.* 1983;13:379-384.
- 148 Hanson CA. Applications of flow cytometry in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol.* 1989;91:S27-S31.
- 149 Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol.* 1987;5:1690-1703.
- 150 Orfao A, Ruiz-Arguelles A, Lacombe F et al. Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica.* 1995;80:69-81.
- 151 San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1996;23:33-41.
- 152 Decaux O, Cuggia M, Ruelland A et al. [Monoclonal gammopathies of undetermined significance and their progression over time. Retrospective study of 190 patients]. *Presse Med.* 2006;35:1143-1150.
- 153 Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M et al. Prognostic implications of DNA aneuploidy in 156 untreated multiple myeloma patients. Castelano-Leones (Spain) Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br J Haematol.* 1995;90:106-112.
- 154 Mateo G, Castellanos M, Rasillo A et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3661-3667.
- 155 Morgan RJ, Jr., Gonchoroff NJ, Katzmann JA et al. Detection of hypodiploidy using multiparameter flow cytometric analysis: a prognostic indicator in multiple myeloma. *Am J Hematol.* 1989;30:195-200.
- 156 Smith L, Barlogie B, Alexanian R. Biclonal and hypodiploid multiple myeloma. *Am J Med.* 1986;80:841-843.
- 157 Terpos E, Eleutherakis-Papaiakovou V, Dimopoulos MA. Clinical implications of chromosomal abnormalities in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2006;47:803-814.
- 158 Higgins MJ, Fonseca R. Genetics of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18:525-536.

- 159 Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA et al. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement. *Mayo Clin Proc.* 2007;82:323-341.
- 160 Chng WJ, Ketterling RP, Fonseca R. Analysis of genetic abnormalities provides insights into genetic evolution of hyperdiploid myeloma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45:1111-1120.
- 161 Colovic M, Jankovic G, Suvajdzic N et al. Thirty patients with primary plasma cell leukemia: a single center experience. *Med Oncol.* 2008;25:154-160.
- 162 Kumar V, Varma N, Varma S et al. Flow cytometric analysis of DNA indices, expression of p53 and multidrug resistance genes in multiple myeloma patients. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004;26:271-277.
- 163 San Miguel J, Mateos MV, Gutierrez NC. Risk stratification in the era of novel therapies. *Cancer J.* 2009;15:457-464.
- 164 Garcia-Sanz R, Gonzalez-Fraile MI, Mateo G et al. Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients. *Int J Cancer.* 2004;112:884-889.
- 165 Mateos MV, Hernandez JM, Hernandez MT et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: updated time-to-events results and prognostic factors for time to progression. *Haematologica.* 2008;93:560-565.
- 166 San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006;42:1510-1519.
- 167 Nadav L, Katz BZ, Baron S et al. Diverse niches within multiple myeloma bone marrow aspirates affect plasma cell enumeration. *Br J Haematol.* 2006;133:530-532.
- 168 Paiva B, Vidriales MB, Perez JJ et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica.* 2009;94:1599-1602.
- 169 Paiva B, Vidriales MB, Mateo G et al. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood.* 2009;114:4369-4372.
- 170 Iacobucci I, Saglio G, Rosti G et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3037-3042.
- 171 San Miguel JF, Martinez A, Macedo A et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 1997;90:2465-2470.
- 172 Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 1998;351:550-554.
- 173 Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1998;16:3774-3781.
- 174 San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C et al. Early immunophenotypic evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood.* 2001;98:1746-1751.

- 175 Paiva B, Vidriales MB, Cervero J et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112:4017-4023.
- 176 Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20:1467-1473.
- 177 Ladetto M, Donovan JW, Harig S et al. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000;6:241-253.
- 178 Owen RG, Johnson RJ, Rawstron AC et al. Assessment of IgH PCR strategies in multiple myeloma. *J Clin Pathol*. 1996;49:672-675.
- 179 Lemoli RM, Martinelli G, Zamagni E et al. Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood*. 2000;95:2234-2239.
- 180 Cremer FW, Ehrbrecht E, Kiel K et al. Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive parameter in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26:851-858.
- 181 Gonzalez D, Gonzalez M, Alonso ME et al. Incomplete DJH rearrangements as a novel tumor target for minimal residual disease quantitation in multiple myeloma using real-time PCR. *Leukemia*. 2003;17:1051-1057.
- 182 Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Salama P, Ayala R, Bautista JM. The use of fluorescent molecular beacons in real time PCR of IgH gene rearrangements for quantitative evaluation of multiple myeloma. *Clin Lab Haematol*. 2004;26:31-35.
- 183 Voena C, Malnati M, Majolino I et al. Detection of minimal residual disease by real-time PCR can be used as a surrogate marker to evaluate the graft-versus-myeloma effect after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:791-793.
- 184 Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90:1365-1372.
- 185 Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002;15:197-222.
- 186 Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008;93:431-438.
- 187 Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002;100:3095-3100.
- 188 San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002 Mar 1;99 (5):1853 -6. 2002;99:1853-1856.
- 189 Thomas S, Alexanian R. Current treatment strategies for multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007;7 Suppl 4:S139-44.:S139-S144.
- 190 Kristinsson SY, Landgren O, Dickman PW, Derolf AR, Bjorkholm M. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J Clin Oncol*. 2007;25:1993-1999.

- .-191 Blade J. Autologous transplantation in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006;91:1157.
- .-192 Lenhoff S, Hjorth M, Westin J et al. Impact of age on survival after intensive therapy for multiple myeloma: a population-based study by the Nordic Myeloma Study Group. *Br J Haematol*. 2006;133:389-396.
- .-193 Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Hayman SR, Kumar SK. High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6:343-360.
- .-194 Lenhoff S, Hjorth M, Holmberg E et al. Impact on survival of high-dose therapy with autologous stem cell support in patients younger than 60 years with newly diagnosed multiple myeloma: a population-based study. *Nordic Myeloma Study Group. Blood*. 2000;95:7-11.
- .-195 Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:306-314.
- .-196 Mateo G, Corral M, Almeida J et al. Immunophenotypic analysis of peripheral blood stem cell harvests from patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2003 Sep ;88 (9):1013 -21. 2003;88:1013-1021.