



Remisión completa en el mieloma múltiple: Impacto pronóstico de las bandas oligoclonales, cociente de cadenas ligeras libres en suero y células plasmáticas residuales en médula ósea

Carlos José Fernández de Larrea Rodríguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**REMISIÓN COMPLETA EN EL MIELOMA MÚLTIPLE:
IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS BANDAS OLIGOCLONALES,
COCIENTE DE CADENAS LIGERAS LIBRES EN SUERO Y
CÉLULAS PLASMÁTICAS RESIDUALES EN MÉDULA ÓSEA**

Tesis presentada por

Carlos José Fernández de Larrea Rodríguez

Para optar el grado de Doctor en Medicina

Director de la tesis:

Dr. Joan Bladé

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Mayo de 2011

A mi madre,
primera guía en el sendero de la ciencia,
por darme más de lo que nunca podré agradecer

A mi padre,
ejemplo de vida y estudio, consejero fiel,
fuente de cariño y estímulo sin límites

A mis hermanos,
compañeros constantes del camino
recorrido y por recorrer

A Joan Bladé,
estímulo fundamental de este trabajo,
modelo de médico y científico,
mentor en hematología e investigación;
gracias por la confianza depositada en mí,
y por su afecto y dedicación sin límites

Al Doctor Álvaro Urbano,
por haberme dado la oportunidad de integrarme
en el Instituto de Hematología y Oncología que dirige

AGRADECIMIENTOS

A Laura Rosiñol y Maite Cibeira, predecesoras inmediatas y modelos en el grupo de las gammapatías monoclonales, buenas compañeras en el más amplio sentido de la palabra, guías afectuosas en quienes depositar la confianza vale la pena.

A Jordi Esteve, tutor en mis inicios en la hematología, ejemplo desde el punto de vista profesional y humano.

A Paco Cervantes, por su colaboración desinteresada y sus consejos e ideas imprescindibles durante mi formación.

A todos los médicos adjuntos del servicio de Hematología, por brindar y compartir siempre sus conocimientos y destrezas en el ámbito asistencial, científico y docente. En particular agradezo a Armando López-Guillermo, Carmen Martínez, Montse Rovira y Enric Carreras, quienes me brindaron la oportunidad de colaborar activamente en sus líneas de investigación.

A mis compañeros durante la residencia de hematología, en particular María Suárez-Lledó y Alejandra Martínez-Trillos, por su ayudas, consejos y compañía durante toda esa etapa.

A los miembros de la Unidad de Amiloidosis y Mieloma, de los servicios de Inmunología y Bioquímica (en especial Jordi Yagüe, Juan Ignacio Aróstegui, Montserrat Elena, Xavier Filella) por todo su apoyo técnico, logístico y científico durante la elaboración de la presente tesis.

A todo el personal de la Unidad de Hematopatología (María Rozman, Josep Lluís Aguilar, Marta Aymerich, Neus Villamor, Dolos Colomer, Anna Carrió), con quienes compartí un período enriquecedor de mi residencia y gracias al cual vieron luz varios de los trabajos aquí reseñados.

A todo el personal de enfermería y administrativo del servicio de Hematología, Hemostasia y Hemoterapia, y de la Unidad de Hematopatología.

A todos los pacientes y sus familiares

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AL	Amiloidosis primaria
Alo-TIR	Trasplante alogénico de intensidad reducida
ASIP	Patrón anormal en la inmunofijación sérica
ATG	Gammaglobulina antitimocítica
β2M	beta-2-microglobulina
BCNU	Carmustina (2-cloroetilnitrosourea)
BIRD	Claritromicina/lenalidomida/dexametasona
CTD	Ciclofosfamida/talidomida/dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBMT	European Blood and Marrow Transplantation
EMR	Enfermedad mínima residual
EICH	Enfermedad del injerto contra el huésped
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HOVON	Haemato Oncology Foundation for Adults in the Netherlands
IgH	Gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
IgL	Gen de la cadena ligera de las inmunoglobulinas
IL6	Interleucina 6
IL1β	Interleucina 1-beta
IMWG	International Myeloma Working Group
FDG	Fluorodesoxiglucosa
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto
IFM	Intergroupe Français puis Francophone du Myélome
Linfocitos NK	Linfocitos “natural killer”
MAG	Myelome Autogreffe Group
MM	Mieloma múltiple
MBRP	Muy buena respuesta parcial
MP	Melfalán/prednisona
MPR	Melfalán/prednisona/lenalidomida
MPT	Melfalán/prednisona/talidomida

MQ	Mieloma quiescente
MRC	Medical Research Council
MRT	Mortalidad relacionada con el trasplante
PAD	Bortezomib (PS341)/adriamicina/dexametasona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET/TC	Tomografía de emisión de positrones/tomografía computadorizada
PETHEMA	Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatía Maligna
RMN	Resonancia magnética nuclear
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa-B
RC	Respuesta completa
RP	Respuesta parcial
RCP	Proteína C reactiva
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Curva Característica Operativa del Receptor
SLE	Supervivencia libre de evento
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
TAD	Talidomida/adriamicina/dexametasona
TGF-β	Factor transformador del crecimiento-beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VAD	Vincristina/adriamicina/dexametasona
VBAD	Vincristina/BCNU/adriamicina/dexametasona
VBMCP	Vincristina/BCNU/melfalán/ciclofosfamida/prednisona
VTD	Bortezomib/talidomida/dexametasona

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	2
1.	GAMMAPATÍAS MONOCLONALES	
1.1.	Concepto	3
1.2.	Clasificación	3
1.3.	Etiología	7
2.	MIELOMA MÚLTIPLE	
2.1.	Patogenia	9
2.1.1.	Alteraciones genéticas	10
2.1.2.	Microambiente medular	12
2.2.	Epidemiología	14
2.3.	Manifestaciones clínicas	15
2.4.	Datos de laboratorio	17
2.5.	Diagnóstico y diagnóstico diferencial	18
2.6.	Pronóstico	19
2.6.1.	Factores relacionados con el paciente	19
2.6.2.	Factores relacionados con el clon tumoral	20
2.6.3.	Factores relacionados con la masa tumoral	22
2.7.	Tratamiento	25
2.7.1.	Tratamiento inicial en pacientes “jóvenes”	26
2.7.2.	Tratamiento inicial en pacientes no candidatos a trasplante	29
2.7.3.	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos	31
2.7.4.	Trasplante alogénico	35
2.7.5.	Tratamiento de consolidación y mantenimiento	39
2.7.6.	Tratamiento de rescate	40
3.	RESPUESTA AL TRATAMIENTO	
3.1.	Evolución histórica de la respuesta en el mieloma múltiple	44

3.2.	Evaluación sérica de la remisión completa	47
3.2.1.	Remisión completa “estricta”	50
3.2.2.	Bandas oligoclonales y remisión completa	54
3.3	Evaluación medular de la remisión completa	56
3.4.	Evaluación ósea y extramedular de la remisión completa	59
II.	HIPÓTESIS	60
III.	OBJETIVOS	62
IV.	RESULTADOS	64
	Trabajo 1: El cociente anormal de cadenas ligeras libres en suero en pacientes con mieloma múltiple en remisión completa se asocia a la presencia de bandas oligoclonales: implicaciones en la definición de remisión completa estricta.	65
	Resumen	66
	Separata	68
	Carta en relación al trabajo 1: Las cadenas ligeras libres y la remisión completa estricta en el mieloma múltiple: más preguntas que respuestas	71
	Resumen	72
	Separata	73
	Trabajo 2: Aparición de bandas oligoclonales en pacientes con mieloma múltiple en remisión completa tras quimioterapia de inducción: asociación con el uso de nuevos agentes	76
	Resumen	77
	Separata	78
	Trabajo 3: Mieloma múltiple en remisión completa serológica tras trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos: impacto de la estimación de células plasmáticas en médula ósea por morfología convencional en la progresión de la enfermedad	81
	Resumen	82
	Separata	83
V.	DISCUSIÓN	87
VI.	CONCLUSIONES	96

I. INTRODUCCIÓN

1. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

1.1. Concepto

El mieloma múltiple (MM) forma parte de un grupo de trastornos denominados gammapatías monoclonales, que se caracterizan por la proliferación clonal de células plasmáticas productoras de una proteína homogénea de carácter monoclonal (componente M o paraproteína), restringida por cadenas ligeras kappa o lambda, que se detecta en el suero y/o en orina. De hecho, el MM constituye el prototipo de gammapatía monoclonal maligna, donde la proliferación tumoral plasmocelular, la cuantía de la paraproteína producida y la inmunodeficiencia asociada dan lugar a un cuadro clínico-biológico característico (Kyle & Rajkumar, 2008). Hoy se sabe que esta neoplasia proviene en una gran mayoría, sino en todos los casos, de un estadio premaligno de proliferación clonal denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) (Landgren *et al*, 2009a). De otro lado, en algunos casos, el MM sintomático viene precedido por un estadio asintomático más avanzado, denominado mieloma quiescente (MQ) (Bladé *et al*, 2010a).

1.2. Clasificación

Las gammapatías monoclonales se clasifican actualmente en dos grandes grupos: malignas y benignas (Tabla 1). El *International Myeloma Working Group* (IMWG) publicó en el año 2003 un documento de consenso donde se establecen los criterios diagnósticos de las diferentes gammapatías monoclonales (IMWG, 2003). Siguiendo estos criterios, una GMSI se define por la presencia de un componente M sérico <30 g/L y una infiltración medular por células plasmáticas inferior al 10%, en ausencia de sintomatología atribuible a

la gammapatía. Por el contrario, se considera que los pacientes que presentan un componente M sérico ≥ 30 g/L, una proteinuria de cadenas ligeras superior a 1 g en orina de 24 horas, o bien $\geq 10\%$ de células plasmáticas en médula ósea tienen un mieloma. Los umbrales del componente M y del grado de infiltración medular son arbitrarios, por lo que se acepta el diagnóstico de MM con valores inferiores a los descritos previamente siempre y cuando exista afectación orgánica atribuible al mieloma, conocidas por su acrónimo inglés CRAB (Tabla 2) (Bladé *et al*, 2010). La presencia o ausencia de síntomas relacionados con la gammapatía monoclonal permite distinguir el MM sintomático del MQ.

Tabla 1. Clasificación de las gammopatías monoclonales.

I. Gammopatías monoclonales malignas
<p>A. Mieloma múltiple</p> <ol style="list-style-type: none">1. Mieloma múltiple sintomático2. Mieloma quiescente3. Leucemia de células plasmáticas4. Mieloma no secretor5. Síndrome de POEMS (mieloma osteosclerótico) <p>B. Plasmocitoma localizado</p> <ol style="list-style-type: none">1. Plasmocitoma óseo solitario2. Plasmocitoma extramedular <p>C. Macroglobulinemia de Waldenström</p> <p>D. Enfermedades de las cadenas pesadas (α, μ, γ, δ)</p> <p>E. Amiloidosis primaria</p>
II. Gammopatía monoclonal de significado incierto
<p>A. Gammopatía monoclonal idiopática (significado incierto)</p> <p>B. Gammopatías monoclonales transitorias en el contexto de inmunodepresión (infecciones –en particular virus de la inmunodeficiencia humana-, trasplante de médula ósea, trasplante hepático o renal)</p>

Tabla 2. Manifestaciones clínicas producidas en tejidos y órganos por el proceso proliferativo de células plasmáticas (CRAB)

<p>Hipercalcemia (Calcio $\geq 11,5$ mg/dL)</p> <p>Insuficiencia Renal (Creatinina ≥ 2 mg/dL)</p> <p>Anemia: hemoglobina 2 g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad</p> <p>Lesiones óseas: lesiones líticas u osteoporosis con fracturas por “compresión”</p> <p>Otras: hiperviscosidad (rara), amiloidosis, infecciones bacterianas recurrentes (>2 episodios en 12 meses), plasmocitomas extramedulares</p>
--

CRAB (Calcio, Insuficiencia Renal, Anemia o Lesiones Óseas [Bone])

1.3. Etiología

La causa de las gammopatías monoclonales se desconoce, si bien existen datos que apoyan la influencia de factores genéticos, con la contribución de factores ambientales aún desconocidos (Munshi *et al*, 2007; Brown *et al*, 2008). Así, su aparición es probablemente consecuencia de un proceso multifactorial, donde factores genéticos podrían aumentar la susceptibilidad del individuo a estímulos oncogénicos que dieran lugar a la proliferación de un precursor de la célula plasmática como ocurre en la GMSI. Es altamente probable que intervengan uno o más pasos adicionales en la transformación de este clon plasmocelular estable y controlado por el sistema inmune, en el clon maligno incontrolado que da lugar al MM sintomático.

Entre algunos de los factores que podrían dar lugar a una gammapatía monoclonal se encuentran:

a) Radiaciones ionizantes, insecticidas y pesticidas. Algunos autores han descrito una mayor incidencia de MM en personas expuestas a estos agentes (Herrington *et al*, 2004). Así, en un estudio la prevalencia de GMSI fue del doble en personas que utilizaban ciertos pesticidas, postulándose una relación entre estos productos y la mielomagénesis (Landgren *et al*, 2009b). Sin embargo, la mayoría de estos estudios aún no son concluyentes.

b) Trastornos en la regulación del sistema inmunológico. Se ha sugerido, en base a estudios realizados en poblaciones caucásicas, que las gammopatías monoclonales podrían relacionarse con la inmunosenescencia. Apoyan dicha hipótesis tanto el incremento de la incidencia de las gammopatías monoclonales con la edad (Kyle *et al*, 2006), como el hecho que una considerable proporción de pacientes que han sido sometidos a un trasplante renal, hepático o de médula ósea presenten una gammapatía

monoclonal transitoria mientras persiste la inmunodepresión, que también se correlaciona con la edad (Bladé *et al*, 2008a).

c) Estimulación antigénica crónica. La asociación de GMSI con la artritis reumatoide (Eriksson *et al*, 1993), con ciertas infecciones crónicas, como las producidas por el virus de inmunodeficiencia humana (Konrad *et al*, 1993) y el virus de la hepatitis C (Andreone *et al*, 1998), así como con una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Brown *et al*, 2008) apoyan esta hipótesis.

d) Factores genéticos. La asociación de factores constitucionales en la etiopatogenia de las gammapatías monoclonales se sustenta básicamente en su diferente frecuencia en las distintas razas y en la existencia de casos familiares (Loth *et al*, 1991). Respecto a la posible predisposición genética en relación con la raza, se ha descrito mayor prevalencia de GMSI en individuos de raza negra en comparación con la población caucásica, independientemente de su origen geográfico y edad, así como una menor prevalencia de gammapatías monoclonales en la población asiática (Devesa *et al*, 1991; Landgren *et al*, 2006a; Landgren *et al*, 2007; Iwanaga *et al*, 2007). Por otro lado, diversos autores han demostrado la existencia de asociación familiar entre GMSI y MM (Loth *et al*, 1991; Landgren *et al*, 2006b), así como con otros síndromes linfoproliferativos como la macroglobulinemia de Waldenström o la leucemia linfática crónica (Landgren *et al*, 2009c).

e) Otros factores de riesgo observados en estudios epidemiológicos incluyen la obesidad (Landgren *et al*, 2010) o la utilización crónica de diversos fármacos (Landgren *et al*, 2006c).

2. MIELOMA MÚLTIPLE

2.1. Patogenia

En dos estudios recientes se ha demostrado que todos los pacientes con MM tienen el antecedente de una GMSI, fase preclínica en la que el clon maligno permanece estable durante años hasta que, por causas aún desconocidas, escapa a los mecanismos reguladores que limitaban su crecimiento y se produce la transformación maligna (Landgren *et al*, 2009a; Weiss *et al*, 2009). Es muy probable que el MM sea la consecuencia de diferentes pasos oncogénicos (Hallek *et al*, 1998), entre los que se incluyen alteraciones genéticas que se acumulan en la célula tumoral, cambios en el microambiente medular donde se produce el crecimiento tumoral, y fallos en el sistema inmune que permiten que la enfermedad escape a su control (Mailankody *et al*, 2010).

En base a diversos estudios moleculares, se postula que la célula tumoral que origina el MM es una célula B madura que ha pasado por el centro germinal del folículo linfoide. Esta célula ha sufrido el proceso de hipermutación somática y el cambio del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IgH*) que condiciona el cambio de isotipo de *IgH* (“*IgH* switch”). La excepción la constituyen los casos poco frecuentes de MM de isotipo IgM e IgD, los cuales provienen de células menos maduras en los cuales aún no se ha producido este cambio (González *et al*, 2007). En condiciones normales, el linfocito que ha pasado por el centro germinal migra a la médula ósea donde puede permanecer durante largo tiempo como célula plasmática.

Respecto a la expresión de antígenos celulares estudiados mediante citometría de flujo, a diferencia de la célula plasmática normal (CD38+ intensa, CD19+ y CD56-), el fenotipo de la célula plasmática mielomatososa es IgS-, IgC+, CD38+ débil, CD138+ (Syndecan-1),

CD19-, CD56+ (San Miguel *et al*, 1995a). De hecho, se ha descrito que se produce una disminución progresiva en la expresión de CD38 desde la célula plasmática normal hasta la célula clonal de la GMSI, MM y leucemia de células plasmáticas (Pérez-Andrés *et al*, 2005). La célula plasmática puede, además, mostrar una expresión variable de otros antígenos de línea B o incluso de otras líneas hematopoyéticas (CD10, CD20, CD22, CD34, CD117). La respectiva proporción de células plasmáticas con fenotipo normal (CD19+, CD56-) o patológico (CD19-, CD56+) contribuye a diferenciar el MM de la GMSI. Así, el 98% de las GMSI tienen más de un 3% de células plasmáticas fenotípicamente normales, mientras que en sólo el 1,5% de los MM se observan valores superiores al 3% (Ocqueteau *et al*, 1998).

Al igual que la citometría de flujo, la tecnología de "microarrays" permitiría diferenciar la célula plasmática normal de la clonal, en base a su diferente perfil de expresión génica. Sin embargo, esta técnica no permite distinguir entre las células plasmáticas clonales de una GMSI o de un MM (Zhan *et al*, 2002; Davies *et al*, 2003). Más recientemente, estudios con "microarrays" de tercera generación han permitido observar una firma genética en la GMSI, que cuando se observa en el MM constituye un factor de buen pronóstico (Zhan *et al*, 2007). Tomando en consideración todo lo anterior, resulta muy probable que el clon de células plasmáticas sea ya "maligno" desde que aparece en la GMSI (Bladé *et al*, 2008a).

2.1.1. Alteraciones genéticas

Se postula que el hecho oncogénico inicial en el MM podría consistir en translocaciones de *IgH* (gen situado en 14q32) (Avet-Loisseau, 2007). Dichas translocaciones serían consecuencia de errores que se producen durante el proceso de recombinación de *IgH*, o bien durante la fase de hipermutación somática en el centro germinal del folículo linfóide (Bergsagel *et al*, 2004; Fonseca *et al*, 2004), y que podrían dar lugar a la desregulación de los genes de las ciclinas D (Bergsagel *et al*, 2005), tanto de forma directa (11q13: ciclina

D1; 6p21: ciclina D3) como indirecta (4p16, 16q23, otras: ciclina D2). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos responsables de la desregulación de los genes de ciclina en los pacientes con MM que no presentan translocaciones de *IgH* o *IgL* (gen de la cadena ligera de las inmunoglobulinas) (alrededor del 35% de los casos). En este sentido, un modelo reciente propone dos vías diferenciadas en la patogenia del mieloma: una para los mielomas no hiperdiploides, asociados habitualmente a translocaciones de *IgH* como evento oncogénico inicial, y otra para los mielomas hiperdiploides, asociados a trisomías de los cromosomas impares, cuyo mecanismo todavía se desconoce (Fonseca *et al*, 2009). De esta forma, la disregulación de los genes de ciclina sería el fenómeno oncogénico universal que aumentaría la sensibilidad de la célula plasmática más sensible a los estímulos proliferativos, favoreciendo su expansión clonal (Bergsagel *et al*, 2005).

Una vez se ha establecido el clon de GMSI, no se conocen los mecanismos moleculares responsables de su progresión a la fase maligna. Muchas de las alteraciones cromosómicas presentes en el MM (aneuploidía, monosomía 13 y otras) ya se encuentran en la fase de GMSI, por lo que se desconoce si estas anomalías preceden o siguen a las translocaciones de *IgH* (Hallek *et al*, 1998). Por el contrario, otras alteraciones como las mutaciones de *C-MYC*, *K-RAS*, *N-RAS* o la delección de *P53*, son propias de fases avanzadas del MM, lo que sugiere que estén más relacionadas con la progresión que con el origen de la enfermedad (Fonseca *et al*, 2009).

En la actualidad han cobrado interés otros mecanismos no cromosómicos de regulación génica. Entre ellos cabe destacar los microRNA, moléculas de RNA de pequeño tamaño, capaces de regular la transcripción de otros genes. Existe una “firma” característica de microRNAs en las células de MM, que incluyen moduladores de la expresión de proteínas críticas en la mielomagénesis (Pichiorri *et al*, 2008), la cual difiere según las anormalidades citogenéticas encontradas (Gutiérrez *et al*, 2010). Otro mecanismo implicado es el de la metilación del DNA, fenómeno epigenético que permite regular la transcripción selectiva de

ciertos genes, crucial en el desarrollo embrionario y en la génesis de muchas neoplasias. Este patrón de metilación permite distinguir entre células plasmáticas malignas y no malignas, siendo específico de las alteraciones citogenéticas recurrentes (Walker *et al*, 2010).

2.1.2. Microambiente medular

El microambiente tumoral, en el que se establecen complejas interacciones entre las células neoplásicas y las células normales del estroma con la intervención de múltiples citocinas y factores de crecimiento, se considera esencial en la patogenia de la mayoría de neoplasias (Liotta *et al*, 2001). En la médula ósea, este microambiente está constituido por la matriz extracelular y las células estromales medulares, que incluyen fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, células vasculares endoteliales y linfocitos. De hecho, tanto las células plasmáticas normales como las mielomatosas y las células estromales medulares, dependen del microambiente medular para su supervivencia, crecimiento y diferenciación (Shain *et al*, 2000). En el MM, varios fenómenos biológicos se ven influidos por las interacciones entre el tumor y el microambiente medular: el “homing” o adhesión selectiva de las células mielomatosas, los diversos factores paracrinós secretados, la neoangiogénesis regulada por mediadores solubles y los relacionados con la resorción ósea y la osteoclastogénesis.

a) “Homing” y proliferación tumoral

Las células endoteliales de la médula ósea secretan SDF-1 α , ligando de CXCR4, favoreciendo así la adhesión de las células plasmáticas dentro del compartimiento estromal al estimular la quimiotaxis de las células mielomatosas. (Hideshima *et al*, 2002; Alsayed *et al*, 2002). De otro lado, la interacción entre las células mielomatosas y las células endoteliales induce la producción de diversas citocinas angiogénicas (Gupta *et al*, 2001). Una vez en la médula ósea, las células plasmáticas interaccionan

con las proteínas de la matriz extracelular mediante diversas moléculas de adhesión, tales como VLA-4, CD56 y CD44 (Vande Broek *et al*, 2008)

b) Factores paracrinos

Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (por ejemplo, en el MM), en la médula ósea se producen interacciones de células entre sí y con la matriz extracelular que desencadenan la secreción de múltiples citocinas (interleucina [IL]-6, IGF-1, IL-1 β , factor de crecimiento transformador [TGF]- β , y factor de necrosis tumoral [TNF]- α) por parte de las células del estroma medular y de las propias células tumorales (Cook *et al*, 1997; Costes *et al* 1998; Dankbar *et al* 2000; Lacy *et al* 1999). Estas citocinas modulan, a través de complejas redes, la secreción de otras citocinas.

c) Angiogénesis

La formación de nuevos vasos es un proceso complejo regulado por un delicado equilibrio entre factores proangiogénicos y anti-angiogénicos. Está bien demostrado que existe una clara correlación entre el grado de angiogénesis medular y la actividad tumoral en las gammapatías monoclonales. Así, se ha descrito un grado de angiogénesis bajo en la amiloidosis primaria (AL) y GMSI, intermedio en el MQ, y alto en el MM activo. Estos datos explicarían que un aumento en la angiogénesis se asocie a mal pronóstico en esta enfermedad (Rajkumar *et al*, 2000; Vacca *et al*, 1999). Sin embargo, el estudio de aspectos histológicos y bioquímicos ha dado lugar a resultados contradictorios (Cibeira *et al*, 2008).

d) Resorción ósea

La osteólisis en el MM es el resultado de un aumento en la destrucción ósea y una disminución de la neoformación ósea que ocurren sobre todo en la interfase entre el hueso sano y la proliferación plasmocelular del MM activo (Roodman *et al*, 2001).

Mientras que el mecanismo responsable de la actividad disminuida de los osteoblastos se desconoce, el aumento en la resorción ósea se atribuye al efecto de numerosos factores potencialmente activadores de los osteoclastos (IL-6, IL-1 β , “parathyroid hormone-related protein”, factor de crecimiento hepatocítico y TNF- α). Estos factores, cuya secreción en el microambiente medular es consecuencia de las interacciones entre las células tumorales y las estromales, activan los osteoclastos mediante dos mecanismos fundamentales. El primero implica a la proteína inflamatoria macrofágica-1 α , secretada por las células tumorales y que actúa como un factor estimulante de la maduración y quimiotaxis de los osteoclastos (Callander *et al*, 2001; Han *et al*, 2001). El segundo mecanismo parece esencial en la regulación de la osteoclastogénesis y se basa en el receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANK). El ligando de RANK (RANKL), que normalmente se expresa en la membrana de osteoblastos y células T, interactúa con RANK en un precursor osteoclástico generando un osteoclasto activo (Michigami *et al*, 2000; Pearse *et al*, 2001). La heparanasa producida por las células mielomatosas también contribuiría a un aumento en la expresión de este ligando (Yang *et al*, 2010).

2.2. Epidemiología

El MM constituye el 1% de todas las neoplasias y más del 10% de las hemopatías malignas (Jemal *et al*, 2009). Su incidencia anual es de 4 casos nuevos por 100.000 habitantes, habiéndose mantenido estable a lo largo del tiempo (Kyle *et al*, 2004). La edad mediana de presentación en la población caucásica se sitúa alrededor de los 65 años, siendo poco frecuente en individuos menores de 40 años y excepcional en menores de 30 años (2% y 3 por mil de todos los casos, respectivamente) (Bladé *et al*, 1996a; Bladé *et al*, 1996b). Su incidencia es menor en las poblaciones china y japonesa, manteniéndose la baja frecuencia en la población emigrada a Estados Unidos (Devesa *et al*, 1991). Por el contrario, la incidencia es mayor en afroamericanos que en caucásicos (Kyle *et al*, 2003).

2.3. Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico característico del MM consiste en dolores óseos, anemia, infecciones de repetición, hipercalcemia, insuficiencia renal y plasmocitomas extramedulares. El dolor óseo, que constituye la manifestación inicial en el 70% de los casos (Kyle *et al*, 2003), es de características mecánicas y generalmente se localiza en columna vertebral y parrilla costal. Se observan con gran frecuencia alteraciones radiológicas en forma de osteoporosis, osteólisis y/o fracturas patológicas (80% de los casos). Es característico el que las lesiones óseas radiológicas sean puramente osteolíticas, con reacción esclerótica circundante escasa o nula, dando el aspecto de lesiones “en sacabocado”. Las lesiones osteoscleróticas se observan sólo en el 1% de los casos. Una tercera parte de los pacientes presentan anemia normocítica y normocroma, cuyo origen es multifactorial (infiltración medular, insuficiencia renal y dilucional en el caso de componentes monoclonales de gran cuantía), mientras que otras citopenias son infrecuentes. Hasta un 14% de los pacientes pueden presentar macrocitosis asociada a déficit de vitamina B12 (Baz *et al*, 2004). La fiebre debida al propio mieloma es excepcional (1% de los casos) (Mueller *et al*, 2002). Los pacientes con MM tienen una mayor susceptibilidad a padecer infecciones debido a una inmunodeficiencia asociada, producida fundamentalmente por una disminución en la síntesis de inmunoglobulinas policlonales. Las complicaciones infecciosas son generalmente bacterianas: el neumococo suele ser el agente causal más frecuente de las infecciones pulmonares, mientras que los bacilos Gram negativos lo son de las urinarias.

El 30% de los pacientes presentan hipercalcemia al momento del diagnóstico, pero sólo en un 13% la cifra de calcio sérico es superior a 11 mg/dL, requiriendo tratamiento urgente (Kyle *et al*, 2003). Por otra parte, aproximadamente un 20% de los enfermos presentan insuficiencia renal al diagnóstico, con una cifra de creatinina superior a 2 mg/dL, y hasta un 10% de los

pacientes presentan una insuficiencia renal lo suficientemente grave como para requerir tratamiento sustitutivo con diálisis. Las principales causas de insuficiencia renal son la hipercalcemia y el "riñón del mieloma". El sustrato anatomopatológico del "riñón del mieloma" consiste en el depósito de cilindros formados por cadenas ligeras en los túbulos distales y colectores, situación que desemboca en insuficiencia renal, a menudo favorecida por un factor desencadenante como deshidratación, hipercalcemia o uso de diuréticos de asa. Otras causas infrecuentes de insuficiencia renal lo constituyen la AL asociada y la enfermedad por depósito de cadenas ligeras. Cuando la insuficiencia renal es moderada (creatinina <4 mg/dL), es reversible en la mitad de los casos. Por el contrario, cuando la cifra de creatinina es >4 mg/dL, la función renal se normaliza únicamente en el 10% de los casos. Así, los factores que predicen la reversibilidad de la insuficiencia renal son creatinina <4 mg/dL, calcio sérico $\geq 11,5$ mg/dL y proteinuria <1 g/24h (Bladé *et al*, 1998a).

Son pocos los estudios en los que se ha evaluado la incidencia de plasmocitomas extramedulares. La incidencia de enfermedad extramedular, definida tanto por masas en tejidos blandos originados a partir del hueso como por siembra metastásica en pacientes recién diagnosticados oscila entre el 7 y el 18%. En un estudio, el 20% de los pacientes con compromiso extramedular tuvieron plasmocitomas en más de una localización (Wu *et al*; 2009). La presencia de isotipo lambda de cadenas ligera y el mieloma exclusivamente secretor de cadenas ligeras son considerados factores de riesgo para el desarrollo de plasmocitomas (Bladé *et al*, 1994; Bladé *et al*, 1996; Wu *et al*, 2009; Varettoni *et al*, 2009). Pueden aparecer en cualquier localización, siendo su manifestación más grave la compresión de la médula espinal debida a plasmocitomas paravertebrales. Esta situación requiere un tratamiento urgente para evitar que se establezca una paraparesia o paraplejía que puede ser irreversible. El 20% de los pacientes presentan hepatomegalia y menos del 5% esplenomegalia. Alrededor del 5% de los pacientes con MM tienen amiloidosis asociada, que puede manifestarse en forma de síndrome nefrótico, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome del túnel carpiano, neuropatía periférica o hipotensión ortostática.

2.4. Datos de laboratorio

El aspirado de médula ósea muestra una infiltración por células plasmáticas superior al 5% en el 90% de los pacientes con MM, siendo la mediana de la infiltración medular en el momento del diagnóstico del 30%. El proteinograma electroforético sérico y/o urinario revela una banda homogénea en el 85% de los casos. En el 15% restante, la electroforesis sérica es normal o muestra sólo una pequeña banda (mielomas de cadenas ligeras, algunos casos de mieloma IgG o IgA con escaso componente M y los raros casos de mieloma IgD o no secretor). En la mitad de los casos se encuentra proteinuria de cadenas ligeras (proteinuria de Bence-Jones). El estudio cualitativo de las inmunoglobulinas mediante inmunofijación sérica y urinaria es imprescindible para identificar la clase de inmunoglobulina que se produce en exceso y confirmar su carácter monoclonal. El tipo de paraproteína más frecuente en el MM es IgG (50-60% de los casos), seguido por los tipos IgA (20-30%), cadenas ligeras -Bence Jones puro (15%) e IgD (2%). La frecuencia del MM no secretor es inferior al 2%, siendo aún más excepcionales los tipos IgE e IgM. La relación de cadenas ligeras kappa:lambda es de 2:1, con excepción del caso del mieloma IgD (Kyle *et al*, 2003). Los niveles de una o las dos inmunoglobulinas no involucradas en el componente monoclonal están disminuidas en el 91% de los pacientes, fenómeno conocido como inmunoparesis (Rawstron *et al*, 1998). Las manifestaciones clínicas del mieloma IgG e IgA son muy similares. También son muy similares entre sí, tanto desde el punto de vista clínico como biológico, el mieloma de cadenas ligeras y el IgD (Bladé *et al*, 1994), presentando insuficiencia renal, hipercalcemia, proteinuria de cadenas ligeras y amiloidosis asociada con mayor frecuencia que los tipos IgG e IgA.

Otras posibles manifestaciones destacables desde el punto de vista analítico son la anemia (hemoglobina inferior a 9 g/dL en un tercio de los pacientes), aumento de la velocidad de

sedimentación globular y fenómeno de “rouleaux” en sangre periférica de los pacientes con un componente M sérico elevado, elevación de la creatinina sérica e hipoalbuminemia.

2.5. Diagnóstico y diagnóstico diferencial

El diagnóstico de MM sintomático requiere el hallazgo de un componente M sérico en general superior a 30 g/L, proteinuria de cadenas ligeras superior a 1g/24 horas o la presencia de una infiltración medular por células plasmáticas igual o superior al 10% (o bien la demostración histológica de un plasmocitoma), asociado a la existencia de afectación orgánica atribuible a la enfermedad (anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia, lesiones osteolíticas o infecciones bacterianas recurrentes).

El diagnóstico diferencial se plantea con la GMSI, el MQ, la AL y el carcinoma metastásico. Los pacientes que cumplen los criterios analíticos de MM, en ausencia de sintomatología atribuible a la gammapatía monoclonal se considera que tienen un MQ. Por otro lado, los pacientes asintomáticos con un componente M sérico inferior a 30 g/L y una proporción de células plasmáticas en médula ósea inferior al 10%, tienen una GMSI. Clínicamente puede resultar difícil diferenciar una GMSI de un MM en fase inicial. En este sentido, y como ya se ha mencionado anteriormente, el estudio inmunofenotípico de las células plasmáticas nos puede ayudar en base a la proporción de células con fenotipo normal o patológico (Ocqueteau *et al*, 1998). Los límites entre la AL y el MM son arbitrarios, ya que ambos procesos son trastornos plasmoproliferativos con distintas manifestaciones clínico-biológicas. En la AL, la proporción de células plasmáticas en médula ósea suele ser inferior al 20%, no se observan lesiones óseas líticas y la proteinuria de cadenas ligeras suele ser escasa. No obstante, cuando las manifestaciones clínicas son las propias de la AL y no existen osteólisis, puede descartarse razonablemente el diagnóstico de MM, aunque la proporción de células plasmáticas en médula ósea sea superior al 20% y exista una elevada eliminación de cadenas ligeras por orina. Por último, en los pacientes que presentan múltiples lesiones líticas

y no tienen componente monoclonal sérico ni urinario, debe efectuarse un exhaustivo estudio inmunohistoquímico de las supuestas células plasmáticas al objeto de descartar la existencia de un carcinoma metastásico, antes de aceptar el diagnóstico de mieloma no secretor (Bladé *et al*, 2006).

2.6. Pronóstico

La mediana de supervivencia de los pacientes con MM es de alrededor de 3 años. Sin embargo, dicha supervivencia es muy variable, de forma que mientras algunos pacientes fallecen a los pocos meses del diagnóstico y otros sobreviven incluso más de 10 años. Por ello resulta de gran interés la identificación de factores pronósticos que permitan predecir la evolución de la enfermedad y en base a ellos poder efectuar un tratamiento más individualizado. Los factores pronósticos pueden estar relacionados con el propio paciente, con el clon tumoral y/o depender de la masa tumoral.

2.6.1. Factores relacionados con el paciente

La edad y el estado general son dos factores fundamentales, con valor pronóstico independiente. Así, se han descrito medianas de supervivencia de 87 y 54 meses en pacientes menores de 30 y 40 años, respectivamente, frente a medianas de tan sólo 23 meses en pacientes mayores de 70 años, sin poderse atribuir dichas diferencias al tratamiento más intensivo de los pacientes jóvenes por tratarse de series de la era “pretrasplante” (Bladé *et al*, 1996a; Bladé *et al*, 1996b). De manera histórica y multifactorial, la supervivencia de los pacientes menores de 60 años se ha incrementado significativamente entre 1973 y 2004, alcanzando hasta un 57% y 41% a los 5 y 10 años, respectivamente. Sin embargo, en el grupo entre 60 y 69 años sólo se observa una discreta mejoría, y ninguna en los pacientes aún mayores (Brenner *et al*, 2008). Pese a estas diferencias, los años de vida perdidos siguen siendo más importantes en los pacientes jóvenes (Ludwig *et al*, 2010). Por

otro lado, el estado inmunológico del paciente también es un factor importante en el control de la enfermedad. En este sentido, se ha observado que las diferentes subpoblaciones de linfocitos NK varían a lo largo de la evolución del MM, y que un nivel bajo de células CD4+ o alto de células CD19+ se correlaciona con una menor o mayor supervivencia, respectivamente (San Miguel *et al*, 2005).

2.6.2. Factores relacionados con el clon tumoral

a) Morfología e inmunofenotipo de la célula plasmática

La morfología inmadura de la célula plasmática o plasmablástica se asocia a peor evolución y tiene valor pronóstico independiente (Rajkumar *et al*, 1999). La expresión de determinados antígenos en las células plasmáticas y detectados por inmunofenotipo, tales como CD20 e IgS (asociados a célula madura), CD11a y CD44 (asociados a diseminación extramedular), un CD28 elevado (asociado a proliferación celular) junto a CD117 negativo, se han correlacionado también con un pronóstico adverso. En cambio, la persistencia de más de un 5% de células plasmáticas fenotípicamente normales en el momento del diagnóstico se correlaciona con una supervivencia global (SG) y libre de progresión (SLP) más prolongadas (Paiva *et al*, 2010).

b) Citogenética y expresión de oncogenes

Tal como ocurre en otras hemopatías, las anomalías citogenéticas constituyen el principal factor pronóstico en el MM. Así, se consideran de alto riesgo la t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23), la delección de 17p13, las alteraciones del cromosoma 1, la delección del cromosoma 22 o la hipodiploidia. En cambio, la presencia de la t(11;14)(q13;q32) o las trisomías de los cromosomas 9, 11 y 17 se asocian a buen pronóstico. La delección total o parcial del cromosoma 13, cuando se analiza por FISH, no constituye “*per se*” un factor pronóstico desfavorable (San Miguel *et al*, 2004; Stewart *et al*, 2007; Avet-Loiseau *et al*, 2007; Gutiérrez *et al*, 2007; Fonseca *et al*, 2009). De otro lado, hoy se cuestiona el valor de

la t(14;16) (Avet-Loiseau *et al*, 2010). Estudios de genética molecular más profundos demuestran que amp(5q31.3) se asocia a buen pronóstico, mientras que del(12p13.31) comportan mal pronóstico. Estos hallazgos, junto a los valores séricos de la beta-2-microglobulina (β 2M), han permitido el diseño de un nuevo sistema de clasificación pronóstica del MM (Avet-Loiseau *et al*, 2009).

Las alteraciones de determinados oncogenes, o genes supresores de tumores implicados en la patogenia del MM, también tienen influencia pronóstica. Entre ellos destacan las mutaciones o deleciones de *P53* (Lodé *et al*, 2010). Asimismo, la metilación del gen supresor *P16* también se han asociado a un pronóstico adverso (Mateos *et al*, 2002).

c) Actividad proliferativa y respuesta al tratamiento

La proporción de células plasmáticas en fase de síntesis (fase S) constituye el denominado índice proliferativo, uno de los factores pronósticos más importantes en el MM. Para su determinación puede utilizarse la técnica de “labeling index” (LI) con bromodeoxiuridina o bien la citometría de flujo con ioduro de propidio (fase S). De este modo, el número de células en fase S, junto a los hallazgos citogenéticos, la β 2M, el estado general (ECOG) y la edad ha permitido construir varios modelos predictivos de la supervivencia en el MM (Steensma *et al*, 2001; San Miguel *et al*, 1995b; San Miguel *et al*, 2005).

La respuesta favorable al tratamiento inicial es el factor individual con mayor impacto pronóstico en el MM, siendo también muy importante la calidad y duración de dicha respuesta. De otro lado, se ha considerado clásicamente que una respuesta rápida al tratamiento constituye un factor de mal pronóstico. Sin embargo, una respuesta rápida al tratamiento se asocia a recaída temprana y corta supervivencia sólo en aquellos pacientes con un índice de proliferación celular elevado. En cambio, aquellos pacientes con un índice proliferativo bajo que responden con rapidez al tratamiento cistostático tienen muy buen

pronóstico, pues en estos casos la respuesta rápida se debe exclusivamente a la gran sensibilidad del clon tumoral a la quimioterapia (Boccardo *et al*, 1989).

d) Angiogénesis

Existen una serie de publicaciones sobre la importancia pronóstica de la angiogénesis, medida por densidad de microcapilares en la médula ósea, en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (Kumar *et al*, 2004), lo cual a su vez se correlacionaría con la proporción de células plasmáticas circulantes (Kumar *et al*, 2003) y con un patrón de afectación ósea difuso en resonancia magnética (Moulopoulos *et al*, 2010). Sin embargo, en algunas series de pacientes tratados con nuevos fármacos, la relación entre la neoangiogénesis con los niveles de citocinas y con la tasa de respuestas al tratamiento no es tan clara (Cibeira *et al*, 2008).

2.6.3. Factores relacionados con la masa tumoral

La clasificación publicada en 1975 (Durie & Salmon, 1975), establecía una relación entre la masa tumoral y el componente M a través de modelos matemáticos (Tabla 3). Sin embargo, su validez pronóstica no se ha podido reproducir por completo. De otro lado, algunos marcadores bioquímicos tales como la β 2M y la proteína C reactiva (RCP) han resultado de mayor utilidad. Así, la β 2M aumenta con la masa tumoral y con el deterioro de la función renal, y su incremento se correlaciona con una supervivencia más corta. Los niveles séricos de RCP se consideran un fiel reflejo de la concentración de IL-6. La determinación de β 2M y RCP constituye una combinación útil para predecir la supervivencia de los pacientes con MM (Bataille *et al*, 1992). Por otro lado, los enfermos menores de 40 años, con función renal normal y β 2M baja tienen una supervivencia mediana de ocho años (Bladé *et al*, 1996a). Finalmente, el *International Myeloma Working Group* ha propuesto la clasificación ya conocida como Índice Pronóstico Internacional (IPI), derivada del análisis de los datos de

11.171 pacientes procedentes de grupos cooperativos e instituciones de América, Asia y Europa. Dicho sistema se basa en los niveles séricos de β_2m y albúmina (Tabla 4) y permite discriminar tres grupos de riesgo independientes de la edad, región geográfica o tipo de tratamiento (quimioterapia convencional o trasplante). Su principal ventaja respecto a otros sistemas pronósticos radica en su simplicidad y amplia reproducibilidad (Greipp *et al*, 2005).

Tabla 3. Clasificación pronóstica de Durie y Salmon

Estadio	Criterios	Masa tumoral (Células x 10 ¹² /m ²)
Estadio I (A o B)	Todos los criterios siguientes: <ul style="list-style-type: none"> · Valor de hemoglobina > 10 g/dL. · Valor de calcio sérico normal o < 12 mg/dL. · Radiología: estructura ósea normal o plasmocitoma óseo solitario. · Baja producción de componente M con valor de IgG < 5 g/dL y de IgA < 3 g/dL. · Proteinuria de Bence Jones < 4 g/24h. 	< 0,6
Estadio II (A o B)	Sin criterios de Estadio I ni de Estadio III.	0,6 - 1,2
Estadio III (A o B)	Uno o más de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none"> · Valor de hemoglobina < 8,5 g/dL. · Valor de calcio sérico > 12 mg/dL. · Lesiones óseas líticas avanzadas. · Elevada producción de componente M con valor de IgG > 7 g/dL y de IgA > 5 g/dL. · Proteinuria de Bence Jones > 12 g/24h. 	> 1,2

Clasificación A o B: según valor de creatinina sérica (< o > 2,0 mg/dl)

Tabla 4. Índice pronóstico internacional (IPI)

Estadio	Criterio	Supervivencia mediana (meses)
I	$\beta 2M < 3,5$ mg/dL y albúmina $\geq 3,5$ g/dL	62
II	$\beta 2M < 3,5$ mg/dL y albúmina < 3,5 g/dL o $\beta 2M 3,5 - 5,5$ mg/dL	44
III	$\beta 2M > 5,5$ mg/dL	29

2.7. Tratamiento

La introducción de los agentes alquilantes hace más de medio siglo fue el primer gran avance en el tratamiento del MM (Bergsagel *et al*, 1962; Alexanian *et al*, 1969), pues permitió prolongar una supervivencia que hasta entonces era inferior al año. Sin embargo, los resultados de la clásica combinación melfalán/prednisona (MP), con un 50% de respuestas parciales (RP), menos de 5% de respuestas completas (RC) y una mediana de supervivencia entre 2 y 3 años, no pueden considerarse satisfactorios (Alexanian *et al*, 1969). Dichos resultados se han intentado mejorar utilizando regímenes poliquimioterápicos en los que se combinan los agentes alquilantes con esteroides (prednisona o dexametasona) y vincristina, con o sin adriamicina. Con ello se logró aumentar la tasa de respuestas, sin alcanzar una prolongación significativa de la supervivencia en comparación con el tratamiento con MP (Bladé *et al*, 1993; Bladé *et al*, 2001a; Myeloma Trialist's Collaborative Group, 1998). La quimioterapia intensiva seguida de la infusión de progenitores hematopoyéticos consigue aumentar la tasa de RC (35-40%) y prolongar la SLP y la SG en algunas series (Attal *et al*, 1996; Child *et al*, 2003) pero no en otras (Bladé *et al*, 2005; Femand *et al*, 2005a; Barlogie *et al*, 2006a). En base a estos resultados, el TPH autólogo se ha convertido en el tratamiento estándar en pacientes "jóvenes", si bien no se considera un tratamiento curativo. Con el TPH alogénico se puede alcanzar la curación en una fracción de pacientes. Sin embargo, dada la elevada morbi-mortalidad que conlleva, el TPH alogénico sigue siendo un procedimiento experimental. Por último, la introducción de nuevos fármacos como la talidomida, el bortezomib o la lenalidomida, con mecanismos de acción diferentes a los de la quimioterapia convencional y que tienen como blanco terapéutico no sólo la célula tumoral sino también sobre el microambiente medular, ha representado otro avance en el tratamiento de esta enfermedad. De hecho, dos estudios han mostrado una prolongación significativa de la supervivencia de los pacientes con MM en la última década (Brener *et al*, 2008; Kumar *et al*, 2008a), fundamentalmente a base de la mejor evolución de los pacientes menores de 65 años.

2.7.1. Tratamiento inicial en pacientes “jóvenes”

La palabra “joven” en pacientes con MM se aplica a aquéllos que son candidatos a intensificación con TPH, ya sea autólogo (progenitores del propio paciente) o alogénico (progenitores de donante familiar o no emparentado). Se trata de pacientes hasta 70 años, habitualmente menores de 65 años, con buen estado general y sin comorbilidades que limiten la práctica del procedimiento.

El régimen de inducción ideal debería dar lugar a una elevada tasa de respuestas, con limitada toxicidad y sin comprometer la obtención de progenitores hematopoyéticos. En este sentido, los regímenes “clásicos” basados en poliquimioterapia con agentes alquilantes y/o dexametasona a dosis elevadas deben tener en cuenta que la exposición al melfalán sea la menor posible con el fin de no comprometer la obtención posterior de progenitores hematopoyéticos. Entre estos regímenes, uno de los utilizados más ampliamente ha sido el VAD (vincristina y adriamicina en perfusión de 4 días y dexametasona), con el que se obtienen alrededor de un 50-60% de respuestas con un 5 a 10% de RC. La combinación ciclofosfamida/dexametasona se ha comparado con VAD en un estudio aleatorizado en el que se observó una tasa de respuestas parciales y completas similar (57% y 7% frente a 44% y 11%, respectivamente), con las ventajas de no precisar vía central y obtenerse más rápidamente la respuesta (Mellqvist *et al*, 2008). Otro régimen de inducción, ampliamente utilizado en nuestro medio, es el VBMCP/VBAD alternante (vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida y prednisona / vincristina, BCNU, adriamicina y dexametasona). Con dicho tratamiento se alcanza una elevada tasa de respuestas con baja toxicidad (Tabla 5). En este caso, la alternancia de ciclos basados en alquilantes (VBMCP) y ciclos basados en dexametasona (VBAD) permite la obtención de progenitores hematopoyéticos sin problemas de movilización (De la Rubia *et al*, 2006). Con este tratamiento se alcanza una tasa de respuestas del 70% pretrasplante, incluyendo un 10 a

15% de RC, y un 70-90% de respuestas postrasplante, con un 30 a 40% de RC (Attal *et al*, 1996; Bladé *et al*, 2005; Fermand *et al*, 2005a; Barlogie *et al*, 2006a).

Los excelentes resultados obtenidos con los nuevos fármacos como la talidomida, el bortezomib o la lenalidomida en fases avanzadas de la enfermedad, ha impulsado la investigación de su eficacia en primera línea. Con ello se pretende, además, minimizar la exposición del paciente a los agentes alquilantes. En este sentido, se han iniciado numerosos ensayos clínicos con diferentes combinaciones de fármacos como tratamiento de inducción pretrasplante. En general, los resultados son prometedores en todos ellos, con tasas de respuestas muy elevadas (Tabla 6) y con la ventaja de obtener dichas respuestas tras un menor número de ciclos que con la quimioterapia convencional, en particular con el bortezomib. Este hecho permitiría teóricamente efectuar tratamientos de inducción más cortos. Sin embargo, debido al seguimiento aún limitado, todavía no se puede establecer cuál es el régimen con mayor influencia sobre la SG. De hecho, está aún por demostrar si los regímenes de inducción basados en los nuevos fármacos son superiores a la quimioterapia convencional. En este sentido, diversos grupos han llevado a cabo estudios aleatorizados en los que se comparan los “nuevos” con los “viejos” regímenes de inducción: bortezomib/dexametasona frente a VAD (Intergrupo Francés de Mieloma) (Harusseau *et al*, 2010), talidomida/adriamicina/dexametasona (TAD) frente a VAD (Lokhorst *et al*, 2008), bortezomib/adriamicina/dexametasona (PAD) frente a VAD (Grupo holandés o *Dutch Hemato-Oncology Group*, HOVON), y ciclofosfamida/talidomida/dexametasona frente a ciclofosfamida/VAD (*Medical Research Council*, MRC). También el grupo español PETHEMA ha llevado a cabo un estudio fase III donde se han comparado tres regímenes de inducción (VBMCP/VBAD + bortezomib frente a talidomida/dexametasona frente a bortezomib/talidomida/dexametasona). Los resultados de este último estudio muestran una superioridad del esquema VTD frente a los otros dos regímenes (Rosiñol *et al*, 2010). Muy probablemente, cuando dispongamos de los resultados de los mencionados estudios, la

elección de un tratamiento de inducción para un paciente con MM se efectuará de forma más individualizada, quizá teniendo en cuenta datos biológicos de la enfermedad, en particular las alteraciones citogenéticas asociadas, permitiéndonos realizar un tratamiento adaptado a los diferentes grupos de riesgo (San Miguel *et al*, 2008a).

Tabla 5. Pacientes candidatos a trasplante: resultados antes y después del TPH autólogo tras inducción con “viejos” y “nuevos” regímenes.

“Viejos” regímenes	RC pre-TPH (%)	RC post-TPH (%)
Dexametasona / VAD	5	35
Ciclofosfamida / Dexametasona	7	32
VBMCP / VBAD	10	35

Bladé *et al*, 2010b; Harousseau *et al*, 2010; Mellqvist *et al*, 2008

Tabla 6. Pacientes candidatos a trasplante: resultados antes y después del TPH autólogo tras inducción con “nuevos” regímenes.

“Nuevos” regímenes	RC pre-TPH (%)	RC post-TPH (%)
Talidomida/dexametasona	6	23-24
Bortezomib/dexametasona	12	33
PAD-1	24	43
VTD	21-30	43-52
Terapia total III*		56% a los 2 años

**VTD-PACE más trasplante autólogo en tándem seguido por consolidación VTD/TD

Cavo *et al*, 2006; Harousseau *et al*, 2006; Rosiñol *et al*, 2007; Popat *et al*, 2008; Barlogie *et al*, 2007; Rosiñol *et al*, 2010; Cavo *et al*, 2010.

2.7.2. Tratamiento inicial en pacientes no candidatos a trasplante

Los pacientes mayores de 65 años o con comorbilidad limitante para ser sometidos a un TPH han recibido clásicamente un tratamiento más conservador, basado en agentes alquilantes, como son los regímenes melfalán/prednisona (MP) o ciclofosfamida/prednisona. En los últimos años, la introducción de nuevos fármacos ha permitido ensayar nuevas combinaciones terapéuticas con resultados esperanzadores (Tabla 7): melfalán/prednisona/talidomida (MPT), melfalán/prednisona/bortezomib (MPV), melfalán/prednisona/lenalidomida (MPR), lenalidomida con dosis bajas de dexametasona (Len/dex), talidomida/dexametasona, o ciclofosfamida/talidomida/dexametasona (CTD).

Tabla 7. Pacientes no candidatos a trasplante: resultados del tratamiento inicial.

Referencia	Régimen	Tasa de respuesta (%)	RC (%)	SLE	SG
Rajkumar et al, 2008	Tal/DEX vs. DEX	63 vs. 46	7,7 vs. 2,6	22,6 vs. 6,5 meses	29 m vs. NA
Facon et al, 2007	MPT vs. MP	76 vs. 35	13 vs. 2	RR 0,56 (a favor de MPT)	51,6 vs. 33,2 meses
Hulin et al, 2009	MPT vs. MP	62 vs. 31	7 vs. 1	24,1 vs 19 meses	45,3 vs. 27,7 meses
Palumbo et al, 2008a	MPT vs. MP	76 vs. 48	16 vs. 4	21,8 vs. 14,5 meses	45 vs. 47,6 meses
Waage et al, 2010	MPT vs. MP	42 vs 28	6 vs. 3*	20 vs. 18 meses	29 vs. 33 meses
Wijermans et al, 2010	MPT vs. MP	66 vs. 47	2 vs. 2	13 vs. 10 meses	37 vs. 30 meses
San Miguel et al, 2008b	MPV vs. MP	71 vs. 35	30 vs. 4	24 vs. 16,6 meses	RR= 0,61, p=0,008
Palumbo et al, 2007	MPR	81	24	92% a 1 año	100% a 1 año
Ludwig et al, 2008	Tal/DEX vs. MP	68 vs. 50	2 vs. 2	16,7 vs. 20,7 meses	41,5 vs. 49,4 meses
Rajkumar et al, 2010	Len/DEX vs Len/dex	82 vs. 70	-	-	87 vs. 75% a 2 años
Lacy et al, 2007	Len/DEX	86	24	59% a 2 años	90% a 2 años
Niesvizky et al, 2008b	BiRD	90	28	75,2% a 2 años	-

NA: no alcanzada; Tal: talidomida; DEX: dexametasona; MPT: melfalán/prednisona/talidomida; MP: melfalán/prednisona; RR: riesgo relativo; MPV: melfalán/prednisona/bortezomib; MPR: melfalán/prednisona/lenalidomida; Len: lenalidomida; dex: dosis bajas de dexametasona, BiRD: claritromicina, lenalidomida y dexametasona. * RC por electroforesis negativa.

2.7.3. Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

La aproximación terapéutica universalmente aceptada para pacientes “jóvenes” diagnosticados de MM sintomático consiste en un tratamiento de inducción seguido de intensificación mediante un TPH autólogo, siendo melfalán a dosis de 200 mg/m² el régimen de acondicionamiento considerado estándar. Los intentos de combinaciones con otros fármacos, tales como ciclofosfamida, VP-16 y BCNU, regímenes con tres alquilantes (tioTEpa, busulfan y ciclofosfamida), incremento de la dosis de melfalán a 220 mg/m² o la asociación de melfalán 140 mg/m² con irradiación corporal total, no han mejorado la eficacia del procedimiento (Bladé *et al*, 2010b). Con el TPH autólogo a partir de progenitores de sangre periférica se logran tasas de respuesta de hasta el 80%, con un 25-40% de RC por inmunofijación (Vesole *et al*, 1996), y con una mortalidad asociada al procedimiento inferior al 5%. Sin embargo, aunque la tasa de RC es superior a la obtenida con la quimioterapia convencional (Alexanian *et al*, 2001; Bladé *et al*, 2005), no se ha podido demostrar que el TPH autólogo sea superior en términos de supervivencia (Tabla 8). Así, en dos estudios aleatorizados, uno del Intergrupo Francés de Mieloma (IFM) (Attal *et al*, 1996) y otro del Medical Research Council (MRC) del Reino Unido (Child *et al*, 2003), el TPH autólogo se asoció a una mayor SLP y SG frente a la quimioterapia. En cambio, los estudios también aleatorizados de los grupos español (PETHEMA) (Bladé *et al*, 2005), francés (MAG) (Ferland *et al*, 2005a) y el Intergrupo Americano (Barlogie *et al*, 2006a) no encontraron diferencias significativas entre ambas aproximaciones terapéuticas. Varias razones podrían explicar las discrepancias observadas entre estos ensayos. En primer lugar, con respecto a la población de estudio, en el ensayo español (Bladé *et al*, 2005) solo se aleatorizaron pacientes con enfermedad quimiosensible, y el estudio francés (Ferland *et al*, 2005a) sólo incluyó pacientes entre 55 y 65 años. No existen datos de si la aleatorización al diagnóstico en el

primer caso, o la inclusión de pacientes más jóvenes en el segundo ensayo, hubiesen dado lugar a conclusiones distintas. En segundo lugar, la intensidad de la dosis en el ensayo de tratamiento convencional del grupo PETHEMA (VBCMP/VBAD) (Bladé *et al*, 2005) y en el intergrupo americano (VBCMP) (Barlogie *et al*, 2006a) fue mayor que en el IFM (Attal *et al*, 1996) y el del MRC (Child *et al*, 2003). Una revisión sistemática y metaanálisis de todos los ensayos aleatorizados de TPH autólogo frente a quimioterapia convencional, incluyendo un total de 2411 pacientes, mostró una SLP más prolongada en favor del trasplante, sin un impacto significativo en la SG. Por otro lado, la potencial prolongación de la supervivencia parece ser similar tanto si el TPH autólogo se realiza en primera línea como si se efectúa en el momento de la recaída como terapia de rescate (Ferland *et al*, 1998; Barlogie *et al*, 2006a).

Con la finalidad de aumentar la tasa de RC postrasplante se ha propuesto la realización de dos TPH autólogos consecutivos o en “tándem”. Cuatro grupos han llevado a cabo estudios aleatorizados comparando el trasplante único frente al doble TPH autólogo, con resultados contradictorios (Attal *et al*, 2003; Cavo *et al*, 2007a; Fermand *et al*, 2005b; Sonneveld *et al*, 2007) (Tabla 9). El grupo IFM (Attal *et al*, 2003) refirió una prolongación de la mediana de supervivencia en 10 meses con el trasplante en “tándem”, y que la SG a 7 años para el trasplante en “tándem” frente a un único procedimiento fue de 42% y 21%, respectivamente. Un subanálisis no planificado mostró que los pacientes que se beneficiaron del segundo trasplante fueron sólo aquellos que no alcanzaron al menos una muy buena respuesta parcial (MBRP) con el primer procedimiento. En este subgrupo, la SG a los 7 años fue de 43% y 11% con trasplante en “tándem” y TPH autólogo único, respectivamente. EL estudio italiano Bologna 96 (Cavo *et al*, 2007a) encontró una prolongación significativa de la supervivencia libre de eventos (SLE), sin impacto en la SG con “tándem” frente a trasplante único. Un subanálisis no planificado de los pacientes que no alcanzaron RC o casi CR también mostró una significativa mayor SLE, sin que ello se tradujese en una prolongación de la SG. A mayor abundamiento, ninguno de estos dos

estudios fueron adecuadamente calculados con una potencia estadística para evaluar la equivalencia entre uno frente a dos trasplantes en pacientes que alcanzaran al menos una MBRP tras el primer procedimiento. Por tanto, la pregunta a este respecto sigue sin respuesta. Una revisión sistemática y metaanálisis de 1608 pacientes comparando uno frente a dos TPH autólogos mostró únicamente una SLE significativamente más prolongada (Kumar *et al*, 2009).

Aún no está establecido si se debe efectuar o no un TPH autólogo en los pacientes que ya se hallan en RC tras el tratamiento de inducción. Algunos trabajos demuestran que la supervivencia de este grupo de pacientes, cuando por motivos diversos no llegan a trasplantarse, es similar a la de los que alcanzan la RC postrasplante (Alexanian *et al*, 2001; Wang *et al*, 2010). Estos resultados fueron obtenidos en pacientes cuyo tratamiento de inducción consistía en esquemas basados en dexametasona o quimioterapia convencional, por lo que no se conoce si pueden extrapolarse a los pacientes tratados con nuevos fármacos. De hecho, con la introducción de estos nuevos agentes se pretende obtener la máxima disminución del componente monoclonal pretrasplante con el fin de aumentar las posibilidades de obtener una RC postrasplante. Se espera que los resultados de los numerosos estudios actualmente en curso permitan optimizar el uso de los nuevos fármacos en este contexto y contribuyan a establecer cuáles son los pacientes que se obtienen un mayor beneficio del TPH autólogo.

Tabla 8. Estudios aleatorizados en los que se compara la quimioterapia intensiva seguida de TPH autólogo frente a la quimioterapia convencional.

Autor (grupo cooperativo), año	Tasa de respuesta (%)	SLP (meses)	SG (meses)
Attal <i>et al</i> (IFM), 1996	22 vs 5*	28 vs 18*	57 vs 42*
Child <i>et al</i> (MRC), 2003	44 vs 9*	32 vs 20*	55 vs 42*
Bladé <i>et al</i> (PETHEMA), 2005	30 vs 11*	42 vs 34	67 vs 65
Fermand <i>et al</i> (GMA), 2005	8 vs 6	25 vs 19	48 vs 48
Barlogie <i>et al</i> (US Intergroup), 2006	17 vs 15	25 vs 21	58 vs 53

* Diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 9. Resultados del trasplante autólogo único frente al doble autotrasplante.

Referencia	No. Pacientes	Tasa de respuesta (%)	SLE (meses)	SG (meses)
Attal <i>et al</i>, 2003	399	42 vs 50* (p=NS)	25 vs 30 (p=0.03)	48 vs 58 (p=0.01)
Cavo <i>et al</i>, 2007	321	33 vs 47** (p=0.008)	23 vs 35 (p=0.001)	65 vs 71 (p=NS)
Sonneveld <i>et al</i>, 2007	303	13 vs 32*** (p<0.001)	24 vs 27 (p=0.006)	50 vs 55 (p=NS)
Fermand <i>et al</i>, 2005b	227	37 vs 39*** (p=NS)	31 vs 34 (p=0.75)	57 vs 73 (p=0.09)

NS= No significativo. * RC/MBRP, ** RC/"nCR", *** RC.

2.7.4. Trasplante alogénico

El TPH alogénico fue introducido en el tratamiento del MM hace 25 años. Entre sus potenciales ventajas respecto al TPH autólogo se encuentran la ausencia de contaminación del injerto por células tumorales y el posible efecto del injerto contra el mieloma, lo que le convierte en un potencial tratamiento curativo. La existencia de un efecto antimieloma del injerto se apoya en la obtención de RC tras la infusión de linfocitos del donante en pacientes en recaída post-trasplante. Sin embargo, debido a su elevada toxicidad, fundamentalmente relacionada con la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), con una mortalidad asociada al procedimiento que puede llegar al 50%, y a la posibilidad de recaídas a pesar de la respuesta inicial, su uso es muy restringido (pacientes muy jóvenes con factores de mal pronóstico) (Bladé *et al*, 2010b). En los últimos años, la experiencia adquirida en el manejo del TPH mieloablativo y una mejor selección de los pacientes ha permitido mejorar discretamente los resultados, con un 40-60% de RC, pero aún con una elevada mortalidad durante el primer año postrasplante (entre el 30 y el 40%) y una baja tasa de largos supervivientes (10-20%) (Gahrton *et al*, 2001; Bensinger *et al*, 2008). Por otro lado, se ha intentado disminuir la toxicidad asociada a este tipo de trasplante mediante la depleción linfoide T, con resultados decepcionantes (Lokhorst *et al*, 2003; Alyea *et al*, 2003).

Con el objetivo de disminuir la toxicidad asociada con este procedimiento, manteniendo el efecto antitumoral de la celularidad inmune del injerto, se introdujo el TPH alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida (alo-TIR). El acondicionamiento habitualmente consiste en fludarabina/melfalán o fludarabina/dosis bajas de irradiación corporal total (2 Gys). El *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) publicó en 2005 una serie de 229 pacientes tratados con alo-TIR (Crawley *et al*, 2005). Dicha serie incluía un 14% de pacientes mayores de 60 años, observándose una mortalidad relacionada con

el trasplante (MRT) al año de seguimiento del 22%, con una SLP y SG a los tres años del 21% y 41%, respectivamente. El alo-TIR se asoció a mejor supervivencia cuando se realizó en pacientes con enfermedad quimiosensible, en primera remisión, tras un TPH autólogo y cuando la EICH crónica fue limitada, mientras que pacientes previamente muy tratados y con enfermedad progresiva no parecían beneficiarse del mismo. En un análisis más reciente basado en la experiencia con alo-TIR en el registro del EBMT entre 1998 y 2002, comparándolo retrospectivamente con el TPH alogénico mieloablativo, se observó una menor MRT (24 vs 37% a los 2 años, $p=0,002$) pero a expensas de una menor tasa de RC (33 vs 53%, $p<0,001$) y menor SLP (19 vs 34% a los 3 años, $p<0,001$) debido a un mayor riesgo de recaída con el alo-TIR (Crawley *et al*, 2007) (Tabla 10). En este contexto, la depleción linfocitaria T “*in vivo*”, especialmente el uso de alemtuzumab, se asociaron a una mayor tasa de recaídas. Como principales complicaciones del alo-TIR cabe destacar la EICH aguda y crónica que afectan al 45% y 55% de pacientes, respectivamente (Pérez-Simón *et al*, 2006), así como una elevada incidencia de infecciones fúngicas y reactivación de infecciones víricas. Así pues, el alo-TIR es un procedimiento en continua investigación, que debe realizarse preferentemente en el contexto de ensayos clínicos, y que no parece útil en pacientes con enfermedad avanzada.

Tomando en cuenta que una baja masa tumoral en el momento del TPH alogénico resulta crítico para la efectividad del mismo, se ha investigado el empleo de un TPH autólogo previo para reducir la masa tumoral. Utilizando un esquema de acondicionamiento basado fundamentalmente en fludarabina y melfalán, se ha logrado reducir la mortalidad a los 100 días. Así mismo, se han referido resultados similares con donantes familiares y con no emparentados (Kröger *et al*, 2002a; Kröger *et al*, 2002b). Dos estudios con largo seguimiento incluyendo TPH autólogo seguido de alo-TIR de hermano HLA-idéntico acondicionado con el esquema de “Seattle” (2 Gys de irradiación corporal total) han mostrado un prometedor plateau en la SLP entre el 25 y el 30% a los 6 años. Cabe

destacar que la EICH crónica no se asoció ni con la tasa de RC ni con la incidencia de recaídas (Rotta *et al*, 2009; Bruno *et al*, 2009).

El tratamiento con TPH autólogo seguido de un alo-TIR ha sido objeto de activa investigación con resultados diversos (Garban *et al*, 2006; Bruno *et al*, 2007; Rosiñol *et al*, 2008b) (Tabla 11a). La mortalidad relacionada con el trasplante se ha situado en un rango entre 10% y 16% en los tres estudios. En la serie del IFM (Garban *et al*, 2006) no se observó ningún beneficio en términos de RC, SLE y SG del alo-TIR frente a los dos TPH autólogos en tándem. Por contra, el grupo italiano (Bruno *et al*, 2007) refirió un tasa de RC mayor y una prolongación significativa de la supervivencia en favor del alo-TIR. En el estudio español (Rosiñol *et al*, 2008b) no existieron diferencias significativas en SLE ni SG entre los dos grupos. Sin embargo, las curvas de los pacientes con alo-RIC mostraron un plateau muy prometedor a partir de los tres años de seguimiento. Las diferencias entre los resultados alcanzados en estos tres estudios podrían explicarse por las diferencias en los criterios de inclusión de los pacientes y los esquemas de acondicionamiento (Tabla 11b).

Tabla 10. Trasplante alogénico mieloablativo frente al alo-TIR (Crawley *et al*, 2007).

Procedimiento	No. Pacientes	MRT (%)	Tasa de RC (%)	SLP (meses)	SG (% a los 3 años)
Mieloablativo	196	37	53	19	51
Alo-TIR	320	24	33	34	38
p		0,002	<0,001	<0,001	NS

MRT: mortalidad relacionada con el trasplante; NS= No significativo.

Tabla 11a. Doble trasplante autólogo frente a autotrasplante seguido de alo-TIR.

Referencia	No. Pacientes	Tasa de RC (%)	SLE (meses)	SG (meses)
Garban <i>et al</i>, 2006	166 vs 51	33 vs 33 (p=NS)	32 vs 35 (p=NS)	43 vs 35 (p=0,07)
Bruno <i>et al</i>, 2007	82 vs 80	26 vs 55 (p=0,004)	29 vs 35 (p=0,02)	54 vs 80 (p=0,01)
Rosiñol <i>et al</i>, 2008b	85 vs 25	11 vs 40* (p=0,01)	26 vs 19,6** (p=NS)	58 vs NA** (p=NS)

NS= No significativo. NA= No alcanzada.

* Mejora en la respuesta con el segundo trasplante.

Tabla 11b. Diferencias metodológicas en la selección de los pacientes y en los regímenes de acondicionamiento en los estudios sobre doble trasplante autólogo frente a autotrasplante seguido de alo-TIR

Referencia	Características para la selección de pacientes	Acondicionamiento
Garban <i>et al</i>, 2006	Alto riesgo (elevación de β 2M o delección del 13q)	Fludarabina, Busulfán y ATG
Bruno <i>et al</i>, 2007	Todos	Irradiación corporal total (2 Gys)
Rosiñol <i>et al</i>, 2008b	No en RC/casi CR tras el primer trasplante	Fludarabina y Melfalán 140 mg/m ²

ATG=gammaglobulina antitumoral. β 2M: beta-2-microglobulina.

2.7.5. Tratamiento de consolidación y mantenimiento

El papel del tratamiento de mantenimiento (tratamiento continuo hasta el momento de la progresión o toxicidad) o consolidación (2 a 4 ciclos de quimioterapia combinada tras el tratamiento de inducción) en el MM es también un área en continua investigación. Los pacientes que responden al tratamiento inicial sin conseguir una RC (persistencia del componente monoclonal y de una proporción variable de células mielomatosas en la médula ósea) alcanzan la denominada “fase de meseta”. Dicha fase consiste en un periodo de estabilidad clínica y biológica en el que la masa tumoral no se modifica. En esta situación clínica, la quimioterapia no ha demostrado aportar ningún beneficio, mientras que el interferón mostró sólo un cierto incremento en la tasa de SLP pero no en la SG (Mihelic *et al*, 2007). De otro lado, la administración de prednisona aumentó la duración de la respuesta con escaso efecto sobre la supervivencia (Berenson *et al*, 2002; Shustik *et al*, 2007).

Tras la introducción de los nuevos fármacos en el tratamiento del MM, la talidomida fue el candidato “a priori” idóneo como tratamiento de mantenimiento al tratarse de un agente oral y con actividad inmunomoduladora (Alexanian *et al*, 2002). Un ensayo clínico diseñado por el IFM (Attal M *et al*, 2006) demostró que la talidomida, administrada durante una mediana de 15 meses tras el TPH autólogo y a una dosis de 200 mg/día, se asociaba a una mayor tasa de respuestas, mejor SLP y SG frente a pamidronato y frente a placebo. Sin embargo, este beneficio sólo se observó en los pacientes que no habían alcanzado una MBRP tras el trasplante. Ello sugiere que la talidomida probablemente actúa más como un tratamiento de “consolidación”, disminuyendo la masa tumoral, que como un mantenimiento puro. En base a estos hallazgos, se propuso el uso de talidomida postrasplante únicamente en aquellos pacientes que no hubiesen alcanzado una MBRP. También las combinaciones de fármacos pueden tener su papel en el mantenimiento. Así,

la combinación talidomida/prednisona prolonga el tiempo hasta la progresión frente al mantenimiento con prednisona sola (Spencer *et al*, 2006). Sin embargo, la neuropatía periférica constituye la principal limitación de la talidomida a medio y largo plazo. La lenalidomida podría ofrecer los mismos beneficios, con menos efectos tóxicos. En dos estudios aleatorizados independientes, el mantenimiento con lenalidomida ha disminuido el riesgo de progresión en comparación a la abstención terapéutica (Attal *et al*, 2010; McCarthy *et al*, 2010). En pacientes no candidatos a TPH autólogo, que recibieron tratamiento de inducción con melfalán, prednisona y lenalidomida, el mantenimiento con lenalidomida disminuyó el riesgo de progresión en un 75% frente a los sujetos control (Palumbo *et al*, 2010a). Resultados preliminares sugieren que el bortezomib, bien como fármaco único o asociado a inmunomoduladores, puede tener un papel en el tratamiento de mantenimiento (Palumbo *et al*, 2010b; Mateos *et al*, 2010).

2.7.6. Tratamiento de rescate

En los pacientes quimiosensibles, que recaen o progresan tras suspender el tratamiento inicial, la tasa de respuestas cuando se vuelve a administrar el mismo tratamiento se sitúa entre el 50 y el 70% (Paccagnela *et al*, 1991). Sin embargo, la duración de estas respuestas disminuye con los tratamientos sucesivos, siendo las medianas de duración de las primeras, segundas y terceras respuestas, respectivamente, de 22, 11 y 6 meses (Paccagnela *et al*, 1991). La mediana de supervivencia desde la recaída es de alrededor de un año. En pacientes con mieloma en recaída quimiosensible, la intensificación con TPH autólogo o bien con TPH alogénico, convencional o alo-TIR constituye la mejor opción terapéutica siempre que la edad y las condiciones del paciente lo permitan. Los resultados del tratamiento en pacientes en recaída con enfermedad quimioresistente son decepcionantes. Así, el tratamiento con VBAP o VBAD en pacientes con enfermedad resistente a los agentes

alquilantes produce un 25% y un 35% de respuestas, respectivamente (Bladé *et al*, 1986; Bladé *et al*, 1992).

En cuanto a los pacientes con MM primariamente resistente a la quimioterapia, su mediana de supervivencia es de 15 meses (Bladé *et al*, 2001). Se ha sugerido que en esta situación el tratamiento de rescate más eficaz es el TPH autólogo (Alexanian *et al*, 1994; Vesole *et al*, 1994), debiendo valorarse también de forma individualizada la posibilidad del TPH alogénico. Cuando el trasplante no es factible, el tratamiento con VAD o con dosis elevadas de dexametasona produce una tasa de respuestas de alrededor del 25% (Barlogie *et al*, 1984, Richardson *et al*, 2005). Sin embargo, dentro de este grupo de pacientes quimioresistentes, podemos diferenciar aquellos con enfermedad resistente progresiva de los que presentan enfermedad resistente estable. De hecho, el grupo español PETHEMA/GEM analizó la evolución de 81 pacientes resistentes a la quimioterapia inicial que recibieron intensificación posterior con un TPH autólogo, y los resultados preliminares muestran que los pacientes con enfermedad progresiva tienen una supervivencia significativamente inferior a los pacientes con enfermedad estable, los cuales a su vez presentan una SG similar a la de los pacientes quimiosensibles (Rosiñol *et al*, 2008a).

En definitiva, para los pacientes con MM resistente, en recaída o progresión, no existe una alternativa terapéutica estandarizada. Fue en este grupo de pacientes en el que se utilizó por primera vez la talidomida, hace ya más de una década, en base a su potencial efecto antiangiogénico (Palumbo *et al*, 2008b). Los resultados prometedores observados con este fármaco (Tosi *et al*, 2002; Cibeira *et al*, 2006) impulsaron la investigación farmacológica dando lugar al desarrollo de otros nuevos agentes, con mecanismos de acción diferentes a los de la quimioterapia convencional (actuando no sólo sobre la célula plasmática sino también sobre el microambiente medular), entre los que cabe destacar el bortezomib y la lenalidomida. En esta situación, la elección del tratamiento de rescate debe tener en cuenta factores como el tratamiento previo y si este incluyó o no trasplante, el grado y

duración de la respuesta a dicho tratamiento, el estado general y la edad del paciente, el tipo de recaída (agresiva o más “indolente”) o la toxicidad de tratamientos previos, en particular la presencia de neuropatía periférica por talidomida o bortezomib. La presencia de enfermedad extramedular llevaría a escoger esquemas no basados en talidomida, pues su efecto a dicho nivel es escaso (Bladé *et al*, 2001b; Rosiñol *et al*, 2004); en cambio, el bortezomib ha mostrado actividad significativa en este escenario (Rosiñol *et al*, 2006). A pesar de que estudios recientes parecen mostrar tasas de respuesta elevadas con regímenes triples o incluso cuádruples, a menudo son estudios basados en pocos pacientes, seleccionados y con escaso seguimiento, siendo además la toxicidad asociada importante. De ahí que deba valorarse muy seriamente la conveniencia de realizar tratamientos secuenciales en sucesivas recaídas (Bladé *et al*, 2008b). Los estudios aleatorizados que han permitido la aprobación de tres fármacos (bortezomib, doxorubicina liposomal y lenalidomida) para su uso en MM en recaída se muestran en la Tabla 12.

Con todo, el MM continúa siendo en la mayoría de los casos una enfermedad incurable, de curso clínico recurrente, en el que se van agotando las diferentes alternativas terapéuticas disponibles (agentes alquilantes, regímenes basados en dexametasona, quimioterapia a dosis elevadas/rescate con progenitores hematopoyéticos, nuevos fármacos). De hecho, en los pacientes con MM resistente o en los que estos tratamientos no son factibles (edad muy avanzada, afección grave del estado general, pancitopenia, toxicidad farmacológica) es recomendable efectuar un tratamiento conservador basado en dosis intermitentes de ciclofosfamida y prednisona a días alternos, sin olvidar las medidas de soporte (transfusiones, analgesia) que permitan mejorar su calidad de vida.

Tabla 12. Tratamiento del MM en recaída o resistente (estudios aleatorizados).

Referencia	Régimen	Tasa de respuesta (%)	RC (%)	Tiempo a la progresión (meses)	SG
Richardson et al, 2005	Bort. vs. DEX	38 vs. 18	6 vs. 1	6,2 vs. 3,5	80 vs. 66% a 1 año
Orlowski et al, 2007	Bort.+DLP vs. Bort.	44 vs. 41	4 vs. 2	9,3 vs. 6,5	76 vs. 65% a 15 m
Weber et al, 2007	Len/DEX vs. DEX	61 vs. 19,9	14,1 vs. 0,6	11,1 vs. 4,7	29,6 vs 20,2 meses
Dimopoulos et al, 2007	Len/DEX vs. DEX	60,2 vs. 24	15,9 vs. 3,4	11,3 vs 4,7	NA vs. 20,6 meses

RC: respuesta completa; SG: supervivencia global; Bort: bortezomib; DEX: dexametasona; DLP: doxorubicina liposomal pegilada; Len: lenalidomida; NA: no alcanzada.

3. RESPUESTA AL TRATAMIENTO

3.1 Evolución histórica de la respuesta en el mieloma múltiple

Aunque la definición de respuesta al tratamiento en el MM se ha basado en diferentes criterios, el componente monoclonal en suero y orina ha sido parte fundamental en todos.

Dicha evolución comienza en los años sesenta, cuando se realizó una primera aproximación al concepto de respuesta, basada en la disminución de más de 15 g/L en el componente monoclonal o el incremento en 20 g/L del valor de hemoglobina (Mass, 1962). Posteriormente, se requirió una disminución del 50% en el componente monoclonal y de los plasmocitomas para definirla, considerándose, por tanto, la enfermedad extramedular como parte imprescindible de cualquier evaluación de la respuesta (Chronic Leukemia/Myeloma Task Force, 1968). Basándose en modelos matemáticos según la ecuación de Smith y Salmon, también se estimó que sería una respuesta la disminución del 75% en la síntesis del componente monoclonal (Sullivan & Salmon, 1972). Esta aproximación sólo era aplicable si el isotipo de cadena pesada involucrado era la IgG.

El hito clave en la cronología de la respuesta al tratamiento en el MM se encuentra en la publicación de los criterios del grupo de EBMT (Bladé *et al*, 1998b), que se muestran en la Tabla 13. Por primera vez, se define la remisión completa (CR) en el MM, como la desaparición del componente monoclonal por inmunofijación en suero y orina, junto con la desaparición de los plasmocitomas y una normalización del recuento de células plasmáticas en médula ósea. Estos tres elementos (componente sérico, enfermedad medular y afección extramedular) sientan aún los pilares fundamentales de la evaluación integral de la respuesta en el MM, y han sido la base para la evaluación de la respuesta en la mayoría de los ensayos clínicos para el tratamiento de esta enfermedad.

Tabla 13. Criterios de respuesta según el EBMT (Bladé *et al*, 1998b).

Respuesta	Criterios de Respuesta
Respuesta completa (RC)	Requiere cada uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> – Desaparición del CM original en suero y orina mediante inmunofijación, mantenido durante un mínimo de 6 semanas. – <5% células plasmáticas en la médula ósea. – Desaparición de plasmocitomas. – No aumento del tamaño o número de lesiones osteolíticas.
Respuesta parcial (RP)	Requiere todos los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> – Disminución $\geq 50\%$ del CM mantenido durante ≥ 6 semanas. – Disminución $\geq 90\%$ en la excreción de cadenas ligeras en orina en 24 horas o hasta <200 mg, mantenido durante ≥ 6 semanas. – Disminución $\geq 50\%$ en el tamaño de los plasmocitomas. – No aumento del tamaño o número de lesiones óseas líticas.
Respuesta mínima (RM)	Requiere todos los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> – Disminución 25-49% del CM mantenido durante ≥ 6 semanas. – Disminución en la excreción de cadenas ligeras en orina en 24 horas del 50-89%, que todavía exceda 200 mg/24 h, mantenido durante un mínimo de 6 semanas. – Disminución de 25-49% en el tamaño de los plasmocitomas. – No aumento del tamaño o número de lesiones óseas líticas.
Sin cambio	<ul style="list-style-type: none"> – No se cumplen los criterios para RM ni enfermedad progresiva.

Respuesta	Criterios de Respuesta
Progresión (para pacientes que no han alcanzado RC)	Requiere uno o más de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> – Aumento >25% en el nivel de CM en suero, que también debe representar un aumento absoluto de al menos 5 g/l y confirmarse en una nueva determinación. – Aumento >25% en la excreción de cadenas ligeras en orina en 24 horas, que también debe representar un aumento absoluto de al menos 200 mg/24 horas y confirmarse. – Aumento >25% en las CP en un aspirado medular, que también debe representar un aumento absoluto de al menos un 10%. – Aumento en el tamaño de lesiones óseas líticas o plasmocitomas extramedulares preexistentes. – Aparición de nuevas lesiones óseas líticas (sin incluir las fracturas por compresión) o de plasmocitomas extramedulares. – Hipercalcemia no atribuible a otra causa.
Recidiva (después de una RC)	Requiere al menos uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> – Reparición del CM al realizar la inmunofijación o electroforesis confirmada en al menos una determinación. – $\geq 5\%$ de células plasmáticas en la biopsia o aspirado medular. – Aparición de nuevas lesiones óseas líticas o plasmocitomas. – Hipercalcemia no atribuible a otra causa.

CM: Componente monoclonal.

Casi una década después, y basándose en el sistema de clasificación anterior, se estableció un nuevo sistema internacional de clasificación de la respuesta (Durie et al, 2006), cuyas características se describen en la Tabla 14. Como novedades se incorporaban la RC estricta (“stringent CR”), al considerar aparte de los criterios del EBMT para RC, la normalización del cociente de cadenas ligeras libres en suero y la ausencia de células clonales en médula ósea, y la MBRP (“very good partial response; VGPR”).

Tabla 14. International uniform response criteria for multiple myeloma (Durie *et al*, 2006).

Grado de respuesta*	Criterios
Respuesta completa	Inmunofijación negativa (suero y orina) <5% células plasmáticas en médula ósea No plasmocitomas
Respuesta completa estricta	Criterios de RC y además: <ul style="list-style-type: none"> – Cociente de cadenas ligeras libres normal – Ausencia de células plasmáticas clonales (determinado mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia)
Muy buena respuesta parcial	Disminución $\geq 90\%$ en el CM sérico CM urinario <100 mg/24h
Respuesta parcial	Disminución $\geq 50\%$ en el CM sérico Disminución $\geq 90\%$ en el CM urinario o <200 mg/24h Disminución $\geq 50\%$ de los plasmocitomas extramedulares

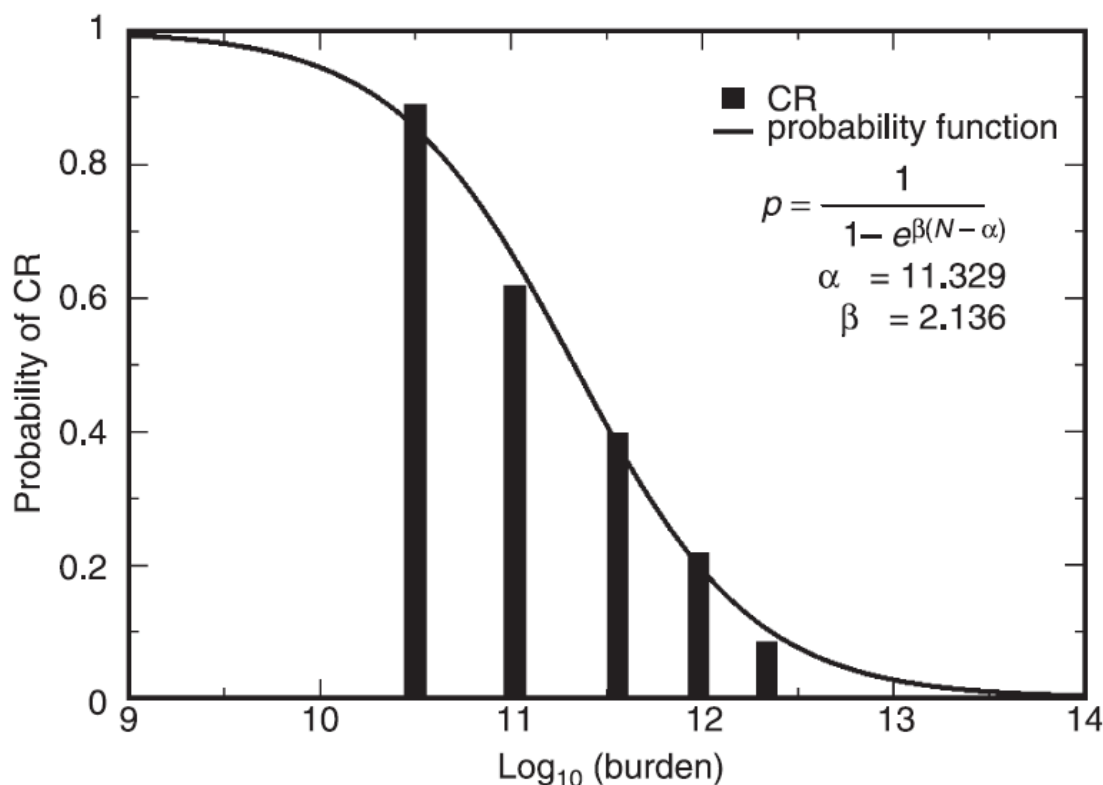
CM: Componente monoclonal. * Todos los grados de respuesta requieren dos determinaciones consecutivas realizadas en cualquier momento.

3.2. Evaluación sérica de la remisión completa en el mieloma múltiple

En muchas hemopatías malignas, tales como las leucemias agudas o los linfomas de alto grado, existe desde hace décadas una estrecha correlación entre la consecución de la RC y el pronóstico. En enfermedades más crónicas, tales como los linfomas foliculares o la leucemia linfática crónica, en los que alcanzar la RC es menos común, resulta más difícil establecer una relación entre la RC y el pronóstico. En este último grupo se enmarcaba el MM, hasta la introducción del TPH autólogo como estándar de tratamiento en los pacientes jóvenes (Harousseau *et al*, 2009). La importancia de alcanzar una RC, demostrada por inmunofijación sérica y urinaria negativa, ha sido demostrada en múltiples estudios. En el contexto de TPH autólogo de progenitores hematopoyéticos, se ha sugerido que los

pacientes que auténticamente se pueden beneficiar del procedimiento son sólo aquellos que alcanzan una RC tras el mismo (Bladé *et al*, 2000; Alexanian *et al*, 2001). Otros estudios han demostrado el efecto pronóstico de la RC en la supervivencia tras TPH autólogo de progenitores hematopoyéticos (Lahuerta *et al*, 2008). De hecho, un metaanálisis reciente muestra que existe una fuerte correlación entre el grado de respuesta tras el tratamiento de inducción y la supervivencia postrasplante (Van de Velde *et al*, 2007). Por ello, existe un gran interés en identificar al subgrupo de pacientes con una elevada probabilidad de obtener una RC. En este sentido, existen dos estudios que indican que la quimiosensibilidad al tratamiento quimioterápico previo constituye el factor que determina la probabilidad de alcanzar una RC postrasplante. El factor predictivo más importante para la RC tras el TPH autólogo, es la masa tumoral pretrasplante. Un componente monoclonal sérico inferior a 10 g/L previo al TPH autólogo, se asocia a una elevada probabilidad de alcanzar una RC post-trasplante (Alexanian *et al*, 2001; Nadal *et al*, 2004). Ello viene reforzado por modelos matemáticos simples en los cuales se demuestra que la masa tumoral previa (estimada según volumen plasmático y componente monoclonal sérico, considerando constantes la producción promedio por parte las células plasmáticas y la tasa de eliminación diaria) constituye un excelente factor predictivo de RC tras el TPH autólogo (Dingli *et al*, 2007) (Figura 1)

Figura 1. La masa tumoral pre-trasplante como predictor de la probabilidad de respuesta completa en el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos en el mieloma múltiple. (Dingli *et al*, 2007)



Salvo en pacientes mayores “frágiles”, donde la toxicidad del tratamiento excede el beneficio esperado, o quizás en pacientes con enfermedad indolente previa, incluyendo GMSI o MQ (Pineda-Roman *et al*, 2007), el alcanzar una RC no es un evento cosmético sino que se correlaciona con una supervivencia más prolongada. Más aún, el objetivo último sería el mantener dicha respuesta a lo largo del tiempo (Barlogie *et al*, 2008), ya que existe evidencia de que el mantenimiento de la misma podría ser tanto o más importante para prolongar la supervivencia que el hecho de haber alcanzado dicha RC, especialmente en pacientes de alto riesgo (Hoering *et al*, 2009).

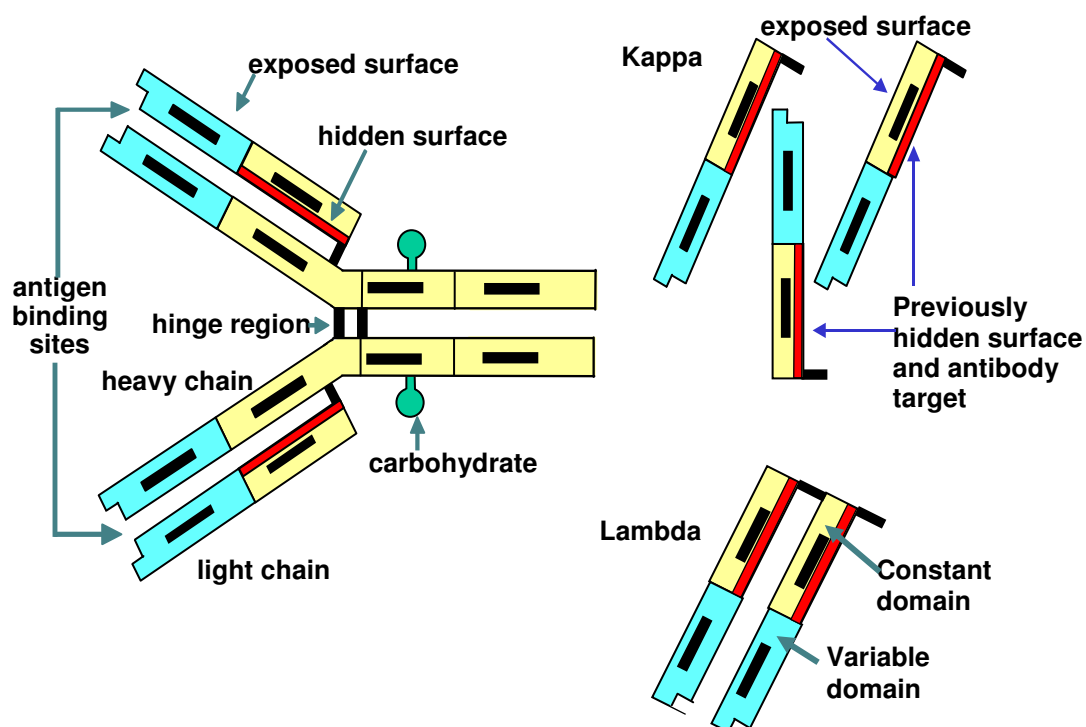
Por otra parte, durante muchos años el tratamiento estándar para pacientes con MM no candidatos a TPH autólogo ha sido la combinación de melfalán y prednisona (MP), o

regímenes basados en dexametasona. La tasa de respuesta global era inferior al 50%, con una tasa de RC que no superaba el 5%; una duración mediana de la respuesta de un año y medio, y una SG mediana alrededor de 3 años (Bladé *et al*, 2010b). Cabe señalar que para esta población de pacientes, la incorporación de nuevos fármacos al MP, tales como MP-talidomida (MPT) (Palumbo *et al*, 2007; Facon *et al*, 2007), MP-bortezomib (MPV) (San Miguel *et al*, 2008b), MP-lenalidomida (MPR) (Palumbo *et al*, 2007) o lenalidomida junto a dexametasona (Lacy *et al*, 2007) han dado lugar a una tasa de RC sin precedentes de hasta el 15%, 30%, 24% y 24%, respectivamente. Sin embargo, el impacto de estas RC en SLE o SG no había sido establecido. La reciente publicación del grupo italiano y holandés (Gay *et al*, 2011), en 1.175 pacientes tratados con MP, MPT, MPV o MPV seguido de VT, demostró que la SLP y al SG fueron significativamente más prolongadas en los pacientes en RC frente a aquellos que sólo alcanzaron VGPR o RP, independientemente de la edad, el brazo de tratamiento o el estadio pronóstico internacional. En el contexto de pacientes en recaída, también se ha observado que el hecho de alcanzar una RC tiene impacto pronóstico (Niesvizky *et al*, 2008a).

3.2.1. Remisión completa “estricta”

La disponibilidad de la determinación de cadenas ligeras libres en suero ha constituido un nuevo avance en la definición de RC desde el punto de vista serológico. Esta determinación se basa en el reconocimiento por anticuerpos específicos de epítopos en las cadenas ligeras que se encuentran ocultos conformacionalmente cuando la inmunoglobulina intacta se encuentra ensamblada (Figura 2).

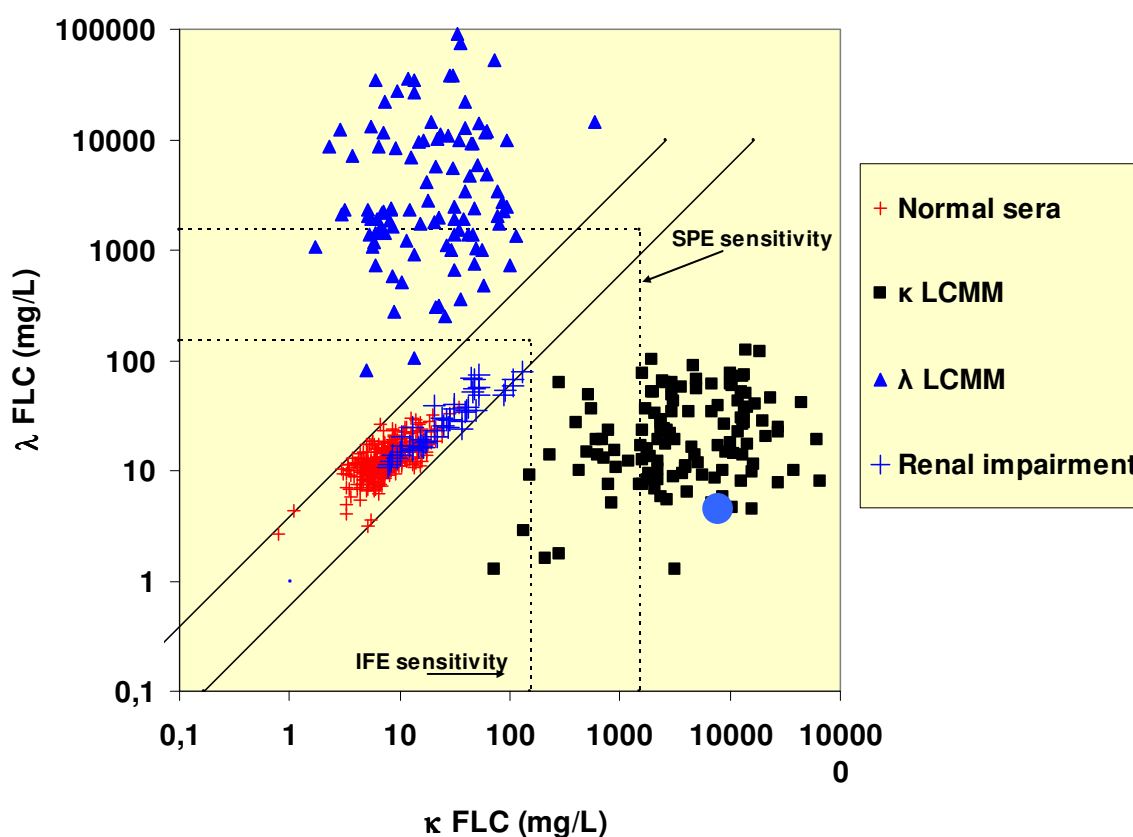
Figura 2. Estructura de las cadenas ligeras libres.



Modificado de: Bradwell. Serum free Light Chain Analysis. 2008

De esta forma, mediante estudios nefelométricos se puede determinar cuantitativamente los niveles de las cadenas ligeras kappa y lambda, no unidas a cadenas pesadas, y establecer un cociente entre las dos fracciones libres. Basado en muestras de la población sana, el valor de normalidad de dicho cociente se ha establecido entre 0,26 a 1,65 (Figura 3). Valores por encima o por debajo de dichos cocientes, reflejarían un incremento relativo de cadenas ligeras kappa o lambda, respectivamente (Dispenzieri *et al*, 2009).

Figura 3. Concentraciones séricas de cadenas ligeras libres en individuos normales, paciente con mieloma múltiple de cadenas ligeras y pacientes con alteración de la función renal.



Modificado de: Bradwell. Serum free Light Chain Analysis. 2008

La determinación de cadenas ligeras libres puede tener diversas aplicaciones prácticas:

1. "Screening" de las gammapatías monoclonales en la población general (Katzman *et al*, 2009), en combinación con la electroforesis de proteínas y la inmunofijación en suero y orina.
2. Pronóstico de las diversas gammapatías monoclonales. Ejemplos de ello lo constituyen el valor pronóstico en la progresión a MM en el caso de la GMSI (Rajkumar *et al*, 2005), del

MQ (Dispenzieri *et al*, 2008) o del plasmocitoma óseo solitario (Dingli *et al*, 2006) y en la SG de pacientes diagnosticados de MM (Kyrtsolis *et al* 2007; Snozek *et al*, 2008) e incluso de otras gammapatías monoclonales como AL (Dispenzieri *et al*, 2006; Kumar *et al*, 2010a).

3. La determinación de cadenas ligeras libres proporciona teóricamente una medida muy sensible cuando el componente monoclonal es escaso. Esto se basa en el hecho de que la capacidad de detectar cadenas ligeras libres en la electroforesis de proteínas y en la inmunoelectroforesis es limitada, y depende de la capacidad del riñón para reabsorber y catabolizar las cadenas ligeras libres filtradas por el glomérulo (Bradwell *et al*, 2003). Así, se ha empleado esta determinación en el seguimiento de gammapatías oligosecretoras o no productoras de inmunoglobulinas intactas, tales como el mieloma oligosecretor o la AL (Dispenzieri *et al*, 2009).

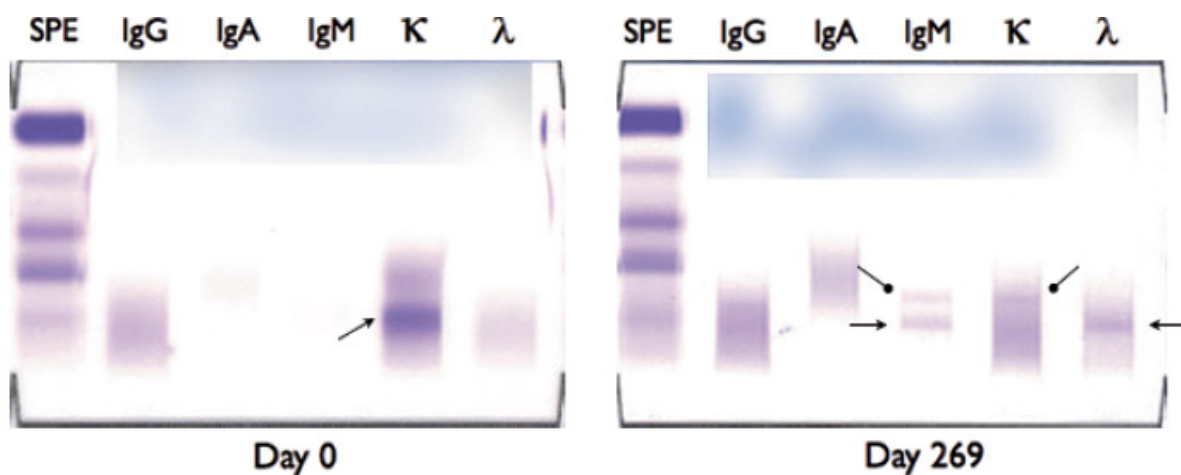
La producción de cadenas ligeras libres también se han relacionado con otros aspectos biológicos, como la presencia de traslocaciones de mal pronóstico tales como t(4;14) o t(14;16), hecho que, sin embargo, no excluiría un valor pronóstico independiente de dicha determinación (Kumar *et al*, 2010b). Otra utilidad de la determinación de cadenas ligeras libres radicaría en el seguimiento de pacientes con insuficiencia renal secundaria a riñón de mieloma (Harding *et al*, 2011). Dado que la experiencia con esta prueba aún es limitada, su posible uso no está exento de controversias, como su escasa utilidad en el seguimiento de pacientes con MM e inmunoglobulinas intactas (Uljon *et al*, 2011)

Un estudio preliminar de la Clínica Mayo (Kumar *et al*, 2008b) indicaba que la normalización del cociente de cadenas ligeras libres en suero en pacientes en RC por inmunofijación negativa, era un factor asociado a una supervivencia más prolongada. Sin embargo, estos datos todavía no se han confirmado.

3.2.2. Bandas oligoclonales y remisión completa

Otro aspecto a considerar en la evaluación de la remisión completa desde el punto de vista serológico es la aparición de bandas oligoclonales. Las descripciones originales incluían básicamente el cambio del isotipo de cadena pesada o ligera con respecto a la paraproteína original. Se trata de un fenómeno frecuente tras TPH, tanto en modelos clínicos como experimentales (Mitus *et al*, 1989). El mecanismo de esta respuesta restringida de anticuerpos no puede ser explicado por un mecanismo determinado, pero podría ser debido tanto a la pérdida del control normal de los linfocitos T en la proliferación de las células B, alteración de la maduración de la afinidad en los linfocitos B o bien por un fallo en la respuesta de memoria contra algunos antígenos (Gerritsen *et al*, 1993). Este tipo de respuestas es característico de la ontogenia del sistema inmune humoral en la infancia, y por tanto esta forma de recuperación post-trasplante podría corresponder a una recapitulación de dicha ontogenia tras el tratamiento mieloablativo (Small *et al*, 1990). En el momento de la recaída la reaparición de la banda concuerda con el isotipo original al diagnóstico (Maisnar *et al*, 2007). Estas bandas corresponden en la inmunoelectroforesis a inmunoglobulinas no relacionadas con la banda original del MM, ya sea en su isotipo de cadena ligera y/o pesada, o debido su movilidad inmunoelectroforética diferente (Figura 4). Este fenómeno se describió por primera vez tras el TPH autólogo en pacientes con MM. Así, un 10% de 550 pacientes presentaban bandas oligoclonales, con una duración mediana de 7 meses (Zent *et al*, 1998). Además, la presencia de bandas oligoclonales también se correlacionó con un pronóstico favorable, ya que la SLE y SG fueron significativamente más prolongadas en los pacientes en los que aparecieron dichas bandas.

Figura 4. Aparición de bandas oligoclonales (IgM kappa y lambda) en un pacientes con un mieloma múltiple Bence-Jones kappa en tratamiento inmunomodulador con lenalidomida y dexametasona al día 269 de tratamiento.



Modificado de Mark *et al*, 2008

Más recientemente, este fenómeno se ha descrito en el contexto de terapia inmunomoduladora no mieloablativa. Así, los denominados patrones anormales de inmunofijación sérica (ASIPs, por las siglas en inglés de *Atypical Serum Immunofixation Patterns*) se correlacionaron con una mayor profundidad en la respuesta en pacientes con MM tratados en el estudio BiRD (claritromicina, lenalidomida y dexametasona), mostrando de nuevo una correlación con un pronóstico favorable (Mark *et al*, 2008).

3.3. Evaluación medular de la remisión completa en el mieloma múltiple

La evaluación de la infiltración en médula ósea tras el tratamiento ha evolucionado de forma gradual en los últimos años. La primera aproximación corresponde a los criterios del EBMT, donde para definir la RC se requiere un valor inferior al 5% de células plasmáticas (Bladé *et al*, 1998b). Adicionalmente, el International Myeloma Working Group requiere que se descarte la naturaleza clonal de dichas células plasmáticas. En uno u otro caso, en pocos estudios se ha estudiado el papel de la respuesta medular en pacientes con inmunofijación sérica y urinaria negativa. Pese a las recomendaciones tanto del EBMT como del IMWG, se ha llegado a sugerir que el examen de la médula ósea por microscopía óptica podría ser eliminado en los casos con respuesta serológica completa, argumentando que los límites (por ejemplo, 5%) son arbitrarios, la no existencia de estudios prospectivos sobre su significado pronóstico, y las molestias que ocasiona al paciente la punción medular en esternón o en cresta ilíaca (Chee *et al*, 2009). Un publicación reciente de la Clínica Mayo sobre 92 pacientes, ha mostrado que pacientes con más del 5% de células plasmática en médula ósea, pese a encontrarse en RC desde el punto de vista de la inmunofijación, tenían una tendencia a una SG más corta (7,9 años frente a 5,7 años) desde el diagnóstico, siendo esta diferencia significativa cuando los cálculos se efectuaron desde el momento de la negativización de la inmunofijación. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias en cuanto a la SLP (Chee *et al*, 2009).

En paralelo a los progresos técnicos realizados en la investigación biomédica, la definición de RC en médula ósea ha ido más allá de la morfología en muchas entidades hematológicas malignas. La primera herramienta que se empleó fue la citometría de flujo multiparamétrica, la cual ya forma parte de la práctica habitual en la evaluación de la enfermedad mínima residual (EMR) en la leucemia aguda. Sin embargo, hasta hace poco dicha técnica se ha considerado experimental en el MM. Actualmente, ya se han establecido criterios a seguir con dicha técnica, con un dintel de detección de 0,01% de células plasmáticas neoplásicas. La

técnica es rápida, aplicable a la casi totalidad de los pacientes y de bajo coste (Rawstron *et al*, 2008). Un panel incluyendo marcadores de superficie (por ejemplo, CD19/CD56/CD38/CD45) junto a la determinación de clonalidad a través de la determinación de cadenas ligeras intracitoplasmáticas permite la detección de EMR (de Tute *et al*, 2007).

La presencia de células plasmáticas por inmunofenotipo a los tres meses del TPH autólogo cobra valor pronóstico en una serie de 45 pacientes en RC, asociándose a un mayor riesgo de progresión a los 5 años (Rawstron *et al*, 2002). En este sentido, el estudio del grupo español es quizás la muestra más patente de la importancia de determinar la EMR por citometría de flujo en el MM (Paiva *et al*, 2008). En este estudio, la presencia de EMR en el día 100 post-trasplante se relacionó con una significativa prolongación de la SLP (71 frente a 37 meses) y una SG (no alcanzada frente a 89 meses). Este nivel de significación se mantuvo en el análisis multivariable. De hecho, los pacientes con EMR positiva, tuvieron una SLP más corta que aquellos con EMR negativa, independientemente de su respuesta serológica por inmunofijación.

Un grado mayor de respuesta puede definirse por estudios de biología molecular. Se trata de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, adaptando la PCR en tiempo real para cuantificar el número de células mielomatosas residuales, utilizando el reordenamiento de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Así, se diseñaron sondas consenso para regiones específicas por familia de la región variable de la cadena pesada, en asociación con nucleótidos alelo-específicos. La sensibilidad alcanzada es de 10^{-5} (Ladetto *et al*, 2000).

Tras un TPH autólogo, la persistencia de EMR molecular era una constante, mientras que los enfermos sometidos a TPH alogénico alcanzaban la RC molecular en un 40-50% de los casos (Corradini *et al*, 1999; Martinelli *et al*, 2000a). El hecho de lograr una remisión

molecular persistente se ha asociado a una prolongación significativa de la SLP (Corradini *et al*, 2003). El estudio más reciente del mismo grupo, ha mostrado incluso que en seguimiento tras TPH autólogo en pacientes en MBRP, es posible alcanzar una remisión molecular fuera del ámbito del TPH alogénico. En 39 pacientes en MBRP o RC tras TPH autólogo, se realizó consolidación con 4 ciclos de VTD. Existió una elevada correlación entre grado de carga tumoral residual por PCR y la probabilidad de recaída, alcanzando los pacientes en RC molecular una remisión mantenida (Ladetto *et al*, 2010). Aunque las técnicas moleculares tienen una mayor sensibilidad que la citometría convencional de 4 colores, ésta última se puede aplicar a una mayor proporción de pacientes con mieloma, es mucho más rápida y menos costosa. Además, con la disponibilidad actual de citómetros de 6 y 8 colores, la sensibilidad de ambos abordajes se hace casi similar (Paiva *et al*, 2008). La limitación común de ambas técnicas radica en la posibilidad de que exista un patrón de infiltración en parche por parte de las células plasmáticas en la médula ósea y, lo que es más importante aún, a la posibilidad de recaídas extramedulares en ausencia de infiltración medular.

3.4. Evaluación ósea y extramedular de la remisión completa

La evaluación de la enfermedad extramedular es quizás la que menos atención ha recibido hasta la fecha. La definición clásica incluye la desaparición de los plasmocitomas. En cuanto a las lesiones óseas, el “gold-estándar” para la evaluación inicial y en el momento de progresión de lesiones óseas es la seriada esquelética. Sin embargo, su valor es muy limitado para evaluar la respuesta (Dimopoulos *et al*, 2009). Otras técnicas, como la tomografía computadorizada mejoran la sensibilidad de los estudios radiológicos, pero tampoco son útiles en la evaluación de la respuesta, ya que las lesiones óseas focales pueden disminuir o permanecer sin cambios tras el tratamiento, limitándose por tanto a valorar el tamaño residual de plasmocitomas extramedulares no accesibles a la exploración clínica. Algunos estudios consideran a la resonancia magnética nuclear (RMN) como una posible herramienta en este sentido (Dimopoulos *et al*, 2009). Con toda probabilidad, la técnica más prometedora sea la tomografía computadorizada, combinada con la tomografía de emisión de positrones (PET/TC). Mediante esta técnica es posible valorar el tamaño de las lesiones junto con su actividad metabólica, mediante la determinación de la captación de la 5-fluorodesoxiglucosa (FDG). Dicha aproximación es de particular utilidad en los plasmocitomas extramedulares. Por ejemplo, la completa supresión de la captación de FDG tras el TPH autólogo se correlaciona con una respuesta de buena calidad, y se asocia a SLP y SG más prolongadas (Zamagni *et al*, 2010). Sin embargo, su papel en la práctica clínica es aún caso-específico y su validez debe investigarse de estudios clínicos controlados (Dimopoulos *et al*, 2009).

II. HIPÓTESIS

1. Un menor número de células plasmáticas residuales en médula ósea tras el TPH autólogo en pacientes con MM en RC serológica se asociará a una mejor SG y SLP. El valor de corte se podría encontrar muy por debajo del 5% requerido en los criterios de respuesta.

2. La aparición de bandas oligoclonales es un fenómeno frecuente y no transitorio tras el TPH autólogo e implica un pronóstico favorable. La desaparición de las mismas puede predecir las recaídas. Este hecho también se presenta en pacientes en RC tras tratamiento de inducción no mieloablatoivo. En este caso, su prevalencia podría ser distinta según se trate de regímenes que utilicen únicamente fármacos alquilantes o bien con los que incorporen nuevos agentes.

3. El resultado de la determinación de cadenas ligeras libres en suero en pacientes en RC tras TPH autólogo podría obedecer a factores no relacionados directamente con la persistencia de enfermedad y sí estar relacionados con la restauración inmune post-TPH, tales como la existencia de bandas oligoclonales.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer la posible contribución pronóstica de la presencia de bandas oligoclonales, de la determinación de cadenas ligeras libres en suero y de la proporción de células plasmáticas residuales en médula ósea, en pacientes con MM en RC.

Objetivos específicos

1. Cuantificar el número de células plasmáticas en médula ósea tras TASP en pacientes con MM en RC serológica.
2. Establecer un punto de corte en la proporción de células plasmáticas en médula ósea en pacientes en RC con significado pronóstico.
3. Determinar la prevalencia y el comportamiento de las bandas oligoclonales en pacientes con MM en RC tanto tras TASP como tras tratamiento de inducción.
4. Comparar la incidencia de bandas oligoclonales tras el tratamiento de inducción, en base al tipo de fármacos utilizados (quimioterapia convencional frente a nuevos fármacos).
5. Analizar los valores del cociente de cadenas ligeras libres κ/λ en suero en pacientes con MM en RC tras TASP, y su posible relación con la presencia de bandas oligoclonales.

IV. RESULTADOS

Trabajo 1

**ABNORMAL SERUM FREE LIGHT CHAIN RATIO IN PATIENTS WITH
MULTIPLE MYELOMA IN COMPLETE REMISSION HAS STRONG
ASSOCIATION WITH THE PRESENCE OF OLIGOCLONAL BANDS:
IMPLICATIONS FOR STRINGENT COMPLETE REMISSION DEFINITION**

**Carlos Fernández de Larrea, María Teresa Cibeira, Montserrat Elena,
Juan Ignacio Aróstegui, Laura Rosiñol, Montserrat Rovira, Xavier Filella,
Jordi Yagüe, Joan Bladé.**

Blood 2009; 114: 4954-4956.

Resumen del trabajo 1

La RC en el MM se define por la ausencia de la proteína monoclonal en suero y orina por inmunofijación. Sin embargo, el International Myeloma Working Group ha propuesto recientemente la categoría adicional de RC estricta, en la que se requiere un cociente de cadenas ligeras libres kappa/lambda normal en suero. Existe aún escasa información sobre el significado pronóstico de esta categoría de RC. Por otra parte, la presencia de bandas oligoclonales, no relacionadas con el componente monoclonal original, es una situación frecuente tras el TPH o tras el tratamiento de inducción con nuevos fármacos y conllevan un pronóstico favorable al ser consecuencia de una respuesta inmune robusta. El objetivo del estudio fue establecer la prevalencia de un cociente de cadenas ligeras libres en suero anormal en 34 pacientes con MM en RC tras el TPH. Catorce de los 34 pacientes (41,2%) presentaron un cociente de cadenas ligeras libres en suero anormal. La frecuencia de este cociente anormal clasificando a los pacientes según presentaran o no bandas oligoclonales en suero y/u orina fue 72,7% frente a 26%, respectivamente ($p=0,023$). Estas bandas tuvieron una duración de 0,7 a 9,4 años, y persistieron en todos los pacientes, excepto en uno que recayó. La mediana del cociente fue 2,55 (IC 95% 1,89-3,20) en los pacientes con bandas oligoclonales, en contraste con 0,87 (IC 95% 0,70-1,04) en aquellos que no las presentaban ($p=0,011$). En todos los casos de cociente anormal, este se encontraba por encima del límite superior, reflejando una sobreproducción relativa de cadenas libres kappa.

Este es el primer artículo que muestra que la presencia de bandas oligoclonales en pacientes con MM en RC da, con frecuencia, lugar a un cociente anormal de cadenas ligeras libres en suero. Ya que una respuesta oligoclonal en suero se asocia a un pronóstico favorable, estos resultados cuestionan la definición actual de RC estricta, y

sugieren que el impacto pronóstico del cociente de cadenas ligeras libres en suero debería estudiarse tomando en consideración la presencia de las bandas oligoclonales.

Brief report

Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition

Carlos Fernández de Larrea,¹ María Teresa Cibeira,¹ Montserrat Elena,² Juan Ignacio Arostegui,³ Laura Rosiñol,¹ Montserrat Rovira,¹ Xavier Filella,² Jordi Yagüe,³ and Joan Bladé¹

Departments of ¹Hematology, ²Biochemistry, and ³Immunology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

The prevalence of an abnormal serum free light chain (FLC) ratio in 34 patients with multiple myeloma in complete response (CR) after hematopoietic stem cell transplantation was studied. Fourteen of 34 patients (41.2%) showed an abnormal FLC ratio. The frequency of abnormal FLC ratio in patients with or without oligoclonal bands was 72.7% ver-

sus 26%, respectively ($P = .023$). The median value of FLC ratio was 2.55 (95% confidence interval, 1.89-3.20) in patients with oligoclonal bands versus 0.87 (95% confidence interval, 0.70-1.04) for those with no oligoclonal bands ($P = .011$). This is the first report showing that the presence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in CR frequently re-

sults in an abnormal FLC ratio. Because an oligoclonal immune response is associated with a good outcome, our results question the current definition of stringent CR and support that the prognostic impact of oligoclonal bands should be also assessed on multivariate analysis. (Blood. 2009;114:4954-4956)

Introduction

Complete remission (CR) in multiple myeloma (MM) is defined by the absence of the original monoclonal protein in both serum and urine immunofixation (IFE).¹ The measurement of serum free light chains (FLCs) can potentially allow the detection of levels of free κ and λ chains below the IFE threshold.² Theoretically, this assay could help to identify groups of patients in CR with different risk of progression. In this regard, the International Myeloma Working Group (IMWG) has recently proposed the so-called Uniform Response Criteria, incorporating a normal FLC ratio (0.26:1.65) to fulfill the stringent complete response (sCR),³ in addition to negative IFE in serum and urine plus less than 5% clonal bone marrow plasma cells. However, there are limited data on the prognostic significance of sCR.² Interestingly, 10% to 33% of patients with MM in CR have monoclonal or oligoclonal bands, a fact associated with a favorable outcome.^{4,5} These oligoclonal bands result from a robust humoral immune response to therapy and are different and unrelated to the baseline myeloma protein. The aim of this study was to determine the prevalence of abnormal FLC ratio in patients with MM in CR after stem cell transplantation and to establish its possible relationship with the presence of oligoclonal bands.

Methods

Thirty-four patients (16 male/18 female; median age, 50 years) with MM who reached CR after hematopoietic stem cell transplantation (26 autologous and 8 allogeneic) were studied. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínic of Barcelona. The diagnosis of MM was established according to the criteria of the Chronic

Leukemia-Myeloma Task Force.⁶ CR was defined according to European Blood and Marrow Transplantation criteria.¹ Thus, all patients had a negative serum and urine IFE for the original monoclonal myeloma protein and less than 5% bone marrow plasma cells. The median follow-up in CR was 5 years (range, 1-23.2 years). The main characteristics of the patients are detailed in Table 1.

An oligoclonal band was defined by a serum and/or urine IFE different either in heavy and/or light chain component from the original monoclonal protein. The serum FLC measurement (FREELITE assay; Binding Site Ltd) was performed by immune nephelometry, and serum FLC ratio κ/λ was determined. FREELITE assays were kindly provided by Binding Site Ltd. Statistical tests were performed with SPSS software 14.0 for Windows. Categorical variables were contrasted by Fisher exact test and median differences by Mann-Whitney U test.

Results and discussion

Serum and/or urine oligoclonal bands were observed in 14 of the 34 patients (41.2%). The characteristics of this subgroup of patients are shown in Table 2. The isotype distribution of the original myeloma protein and the monoclonal and oligoclonal bands for patients who developed new immunoglobulins is shown in Table 2. Eight patients (57.1%) presented a fluctuating oligoclonal pattern during their follow-up, whereas the remainder showed a single oligoclonal immunoglobulin. Eleven of the 34 patients (32.4%) had an abnormal serum FLC κ/λ ratio, being in all cases higher than the upper normal limit, which indicates an overproduction of κ light chains. This discordance between the light chain involved in the oligoclonal IFE pattern and light

Submitted June 1, 2009; accepted September 8, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 1, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-06-224832.

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.

© 2009 by The American Society of Hematology

Table 1. Patient characteristics

Characteristic	Value
Median age, y (range)	50 (24-67)
Male/female	16/18
Heavy-chain component (%)	
IgG	44.1
IgA	26.5
Only light chains	26.5
IgM	2.9
Light-chain component (%)	
κ	61.8
λ	38.2
Initial chemotherapy (%)	
VBCMP/VBAD	60.6
Other	39.4
Autologous transplantation (%)	76.5
Allogeneic transplantation (%)	
Chronic GVHD (%)	62.5

VBCMP indicates vincristine, BCNU, cyclophosphamide, melphalan, prednisone; VBAD, vincristine, BCNU doxorubicin, dexamethasone; and GVHD, graft-versus-host disease.

chain in excess in FLC ratio has been previously reported,⁷ and it most probably reflects the degree of immune reconstitution rather than the result of a specific light chain clonal production.

IFE oligoclonal bands were detected in 8 of the 11 patients with an abnormal FLC ratio (72.7%) versus 6 of 23 (26%) with a normal serum FLC ratio ($P = .023$). Moreover, the median value of serum FLC ratio was higher in patients with IFE oligoclonal bands (2.55; 95% confidence interval, 1.89-3.20 versus 0.87; 95% confidence interval 0.70-1.04; $P = .011$). CD4 levels at 4 months after transplantation were available in 14 patients. Although the median value was higher in patients with abnormal FLC ratio (418/mL vs 329/mL) and in those with oligoclonal bands (417/mL vs 294/mL), the differences did not reach statistical significance.

The emergence of oligoclonal bands was first recognized after autologous stem cell transplantation (ASCT). Thus, in a series from the University of Arkansas, 10% of the patients with MM who underwent ASCT showed IFE oligoclonal bands or isotype switch.⁴ The presence of oligoclonal bands was associ-

ated with a significantly higher CR rate (67% vs 37%) and with significantly longer event-free survival and overall survival.⁴ Mark et al⁵ have recently reported that 33% of patients treated with clarithromycin, lenalidomide, and dexamethasone developed what they termed atypical serum IFE patterns (ASIPs) consisting of the emergence of monoclonal and oligoclonal immunoglobulins unrelated to the original monoclonal protein. The presence of ASIPs was associated with a significantly higher CR rate (71% vs 23%).

It is a general thought that oligoclonal bands are transient. In the University of Arkansas series, the median duration of IFE oligoclonal bands was 7 months (range, 1-22 months).⁴ However, in our series, the oligoclonal bands lasted from 0.7 to 9.4 years and persisted during all follow-up in all patients except in one who relapsed (Table 2). Our results agree and are supported with the findings of Mark et al,⁵ who showed that IFE oligoclonal bands fluctuated and persisted for years. The emergence of serum oligoclonal bands reflects a robust humoral immune response and consequently an immune system reconstitution that can be achieved after either HDT/SCT or highly effective nonmyeloablative therapy with novel agents. There was no available information regarding the incidence of sCR in patients with or without oligoclonal bands in the aforementioned series.^{4,5} Kumar et al⁸ reported in abstract form that sCR was an independent survival predictor in patients with MM and negative IFE after ASCT, but no information was given concerning the presence or absence of IFE oligoclonal bands.

Higher pretransplantation and posttransplantation CR rate is being reported with the incorporation of novel agents in induction pretransplantation regimens.⁹⁻¹³ Similarly, in patients not eligible for ASCT, new combination regimens melphalan, prednisone, and thalidomide,^{14,15} melphalan, prednisone, and bortezomib,¹⁶ melphalan, prednisone, and lenalidomide,¹⁷ or lenalidomide/dexamethasone¹⁸ are resulting in an unprecedented CR rate of 15%, 30%, 24%, and 24%, respectively. As Mark et al⁵ reported, it is very probable that the emergence of IFE oligoclonal bands in patients in CR after treatment with these novel agents is considerable. Indeed, in our experience, the prevalence of oligoclonal bands in 31 patients in CR after standard-dose therapy is significantly higher when including

Table 2. Characteristics of patients who developed oligoclonal bands

Patient no.	Age, y	Sex	Primary chemotherapy	ASCT	Allogeneic transplantation	Original M-spike	Primary oligoclonal band	Other oligoclonal band	FLC ratio	Oligoclonal band duration, y
1	49	Female	(1)	Yes*	Yes*	IgA-λ	IgG-κ	IgG-λ	1.41	2.2+
2	56	Male	No†	Yes	No	κ	IgG-λ	No	4.53§	7.5+
3	63	Female	(1)	Yes	No	IgA-λ	IgG-κ	No	3.05§	1.7+
4	42	Female	(2)	Yes	No	IgG-λ	IgG-κ	IgG-λ	0.94	1.7+
5	36	Male	(1)	Yes*	Yes*	κ	IgG-κ	IgG-λ	1.77§	2.1+
6	44	Male	(3)	Yes*	Yes*	κ	IgM-λ	λ	1.66§	1.5+
7	54	Male	(1)	Yes	No	IgG-κ	IgG-λ	IgM-λ	0.38	3.1
8	59	Female	(4)	Yes	No	IgG-κ	IgG-λ	IgG-κ	2.15§	1.5+
9	47	Male	(1)	Yes	No	κ	IgG-κ	λ	3.97§	0.7+
10	61	Male	(1)	Yes	No	IgA-κ	IgG-κ	No	1.30	8.8+
11	55	Female	(5)	Yes	No	IgM-λ	IgG-κ	λ	3.00§	1.0+
12	60	Female	(2)	Yes	No	IgA-κ	IgG-κ	No	0.99	2.4+
13	59	Female	(1)	Yes	No	IgG-κ	IgG-λ	No	1.68§	9.4+
14	51	Female	(1)	Yes	No	IgG-λ	IgG-λ‡	No	0.97	5.1+

Primary chemotherapy: (1) VBCMP/VBAD; (2) bortezomib/dexamethasone; (3) VAD; (4) thalidomide/dexamethasone; and (5) bortezomib/thalidomide/dexamethasone.

*Tandem autologous/allogeneic transplantation.

†MM and associated systemic amyloidosis: high-dose therapy with no previous induction.

‡With the same original isotype but different migration pattern in serum immunofixation.

§Abnormal ratio.

novel drugs than with cytotoxic agents (57.1% [8/14] vs 11.8% [2/17]; $P = .009$; C.F.d.L., M.T.C., N. Tovar, L.R., J.I.A., J.Y., J.B., unpublished observation, August 2009). According to our results, the presence of oligoclonal bands frequently results in an abnormal serum FLC ratio. The IMWG CR, as currently defined, does not distinguish between patients with or without IFE oligoclonal bands in patients who are negative for their original monoclonal protein. In addition, although the recent IMWG guidelines for serum FLC analysis recommend the use of serum FLC κ/λ ratio to document sCR, the prognostic impact of sCR versus non-sCR has not yet been validated.² Our results support that, when the prognostic impact of sCR versus CR is formally validated, the analysis should also address the presence of IFE oligoclonal bands.

In conclusion, this is the first report showing that the presence of IFE oligoclonal bands in patients with MM in CR frequently results in an abnormal serum FLC ratio. Our results question the current definition of sCR and support that its possible prognostic relevance should be studied, taking into account the presence of ASIPs in a multivariate analysis.

References

- Bladé J, Samson D, Reece D, et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT: European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1115-1123.
- Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009;23(2):215-224.
- Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(9):1467-1473.
- Zent CS, Wilson CS, Tricot G, et al. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 1998;91(9):3518-3523.
- Mark T, Jayabalan D, Coleman M, et al. Atypical serum immunofixation patterns frequently emerge in immunomodulatory therapy and are associated with a high degree of response in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2008;143(5):654-660.
- Committee of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force. Proposed guidelines for protocol studies: II. Plasma cell myeloma. Prepared by a Committee of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force, National Cancer Institute. *Cancer Chemother Rep*. 1968;1(1):17-39.
- Vickrey E, Allen S, Krishnamurthy J, Singh V, Mehta J, Singhal S. The utility of serum free light measurement in myeloma patients with oligoclonal bands on serum or urine immunofixation [abstract]. *Blood*. 2008;112(11): Abstract 5121.
- Kumar S, Dispenzieri A, Larson D, et al. Normalization of the serum free light chain (FLC) ratio is associated with superior overall survival among myeloma patients achieving immunofixation negative state: results support incorporation of serum FLC ratio in stringent CR definition [abstract]. *Blood*. 2008;112(11): Abstract 1692.
- Rosiñol L, Cibeira MT, Martínez J, et al. Thalidomide/dexamethasone vs Bortezomib (Velcade®)/thalidomide/dexamethasone (VTD) vs VBMCP/VBAD/Velcade® as induction regimens prior autologous stem cell transplantation (ASCT) in younger patients with multiple myeloma (MM) first results of a Prospective Phase III PETHEMA/Gem trial [abstract]. *Blood*. 2008;112(11): Abstract 654.
- Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. Superior complete response rate and progression-free survival after autologous transplantation with up-front Velcade-thalidomide-dexamethasone compared with thalidomide-dexamethasone in newly multiple myeloma [abstract]. *Blood*. 2008;112(11): Abstract 158.
- Harousseau JL, Mathiot C, Attal M, et al. Bortezomib/dexamethasone versus VAD as induction prior to autologous stem cell transplantation (ASCT) in previously untreated multiple myeloma (MM): updated data from IFM 2005/01 trial [abstract]. *J Clin Oncol*. 2008;26[suppl 15]: Abstract 8505.
- Pineda-Roman M, Zangari M, Haessler J, et al. Sustained complete remissions in multiple myeloma linked to bortezomib in total therapy 3: comparison with total therapy 2. *Br J Haematol*. 2008;140(6):625-634.
- Popat R, Oakervee HE, Hallam S, et al. Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) front-line treatment of multiple myeloma: updated results after long-term follow-up. *Br J Haematol*. 2008;141(4):512-516.
- Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomized controlled trial. *Lancet*. 2006;367(9513):825-831.
- Facon T, Mary JY, Hulin C, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 2007;370(9594):1209-1218.
- San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(9):906-917.
- Palumbo A, Falco P, Corradini P, et al. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA-Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol*. 2007;25(28):4459-4465.
- Lacy MQ, Gertz MA, Dispenzieri A, et al. Long-term results of response to therapy, time to progression, and survival with lenalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(10):1179-1184.

Acknowledgment

This work was supported in part by Instituto de Salud Carlos III (grants RD06/0020/0005, CM07/00108, and FIS08/0147).

Authorship

Contribution: C.F.d.L. and J.B. designed the research, collected and analyzed data, performed statistical analysis, and wrote and reviewed the paper; M.T.C., L.R., and M.R. treated the patients, collected data, and reviewed the paper; and M.E., J.I.A., X.F., and J.Y. performed the assays and reviewed and approved the paper.

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

Correspondence: Joan Bladé, Servei d'Hematologia, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; e-mail: jblade@clinic.ub.es.

Carta en relación al Trabajo 1

**FREE LIGHT CHAIN ASSAY AND STRINGENT COMPLETE REMISSION IN
MULTIPLE MYELOMA: MORE QUESTIONS THAN ANSWERS**

**Carlos Fernández de Larrea, María Teresa Cibeira, Montserrat Elena,
Juan Ignacio Aróstegui, Laura Rosiñol, Montserrat Rovira,
Xavier Filella, Jordi Yagüe, Joan Bladé**

En respuesta a:

**QUESTIONABLE ROLE OF FREE LIGHT CHAIN ASSAY RATIO
TO DETERMINE STRINGENT COMPLETE REMISSION
IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS**

**Nicolaus Kröger, Svetlana Asenova, Andreas Gerritzen,
Ulrike Bacher, Axel Zander**

Resumen Carta al Trabajo 1

Kröger *et al* responden al artículo precedente, con una serie de 52 pacientes con MM en RC, básicamente tras TPH alogénico de progenitores hematopoyéticos (45 pacientes). En ese caso, 51 de los pacientes (98%) alcanzaron una RC estricta, con normalización de las cadenas ligeras libres en suero. Más aún, en ninguno de los 13 pacientes con bandas oligoclonales se observó un cociente anormal de cadenas ligeras libres en suero. Sin embargo, diferencias metodológicas podrían explicar los distintos resultados:

1. En la serie de Kröger *et al*, la RC se alcanza tras TPH alogénico en el 87% de los casos, frente al 76,5% tras TPH autólogo en nuestra serie.

2. La determinación de las cadenas ligeras en suero se realizó en la serie de Kröger *et al* con un mínimo de 3 meses en RC estable y al menos 6 semanas tras la primera inmunofijación negativa. En nuestro caso, la duración mediana de la RC fue 5 años (rango de 1 a 23,2 años), con una mediana de tiempo de aparición de las bandas oligoclonales tras el TPH de 6 meses (rango de 2 a 53 meses).

Todo lo anterior plantea una serie de cuestiones aún no resueltas sobre la determinación de cadenas ligeras libres en suero en pacientes con MM en RC: ¿en qué momento es más informativa la determinación?, ¿varía la frecuencia de RC estricta según el tipo de tratamiento?, ¿Es diferente el significado de este grado de respuesta según se trate de tratamiento convencional, TPH autólogo u alogénico?, ¿cuál es el significado de un cociente anormal de cadenas ligeras en pacientes con bandas oligoclonales?, y finalmente ¿es la RC estricta un indicador pronóstico real?, y si la respuesta es afirmativa, ¿en qué población de pacientes?.

Correspondence

To the editor:

Questionable role of free light chain assay ratio to determine stringent complete remission in multiple myeloma patients

We read with interest the Brief Report by Fernandez de Larrera investigating the role of abnormal serum free light chain ratio in patients with complete remission.¹ The qualitative assay for free light chain has been reported to be sensitive and specific for detecting and monitoring diseases caused by monoclonal gammopathies, such as multiple myeloma.² More recently, the International Myeloma Working Group proposed uniform response criteria including a new definition of stringent complete remission (sCR). The definition of sCR requires absence of clonal cells in bone marrow by immunohistochemistry or immunofluorescence and normalization of free light chain ratio in serum.³ More recently, the International Myeloma Working Group also published guidelines for serum free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders.⁴ Here, it was recommended to be performed in all patients who achieved a complete remission with negative immunofixation a serum-free light chain assay to determine a "stringent CR." However, the authors also pointed out that there were no data yet to document that a complete response, with or without a free light chain ratio criterion, is prognostic for progression-free survival or overall survival.

In a small study monitoring sequential serum-free light chain assay in 26 patients with negative immunofixation, we observed that normalization of the free light chain ratio preceded the occurrence of immunofixation negativity by approximately 3 months, which is probably due to the shorter serum half-life in comparison with intact immunoglobulin.⁵

Here, we evaluate the value of free light chain assay to determine sCR by monitoring 52 patients with multiple myeloma who achieved complete remission between January 2003 and December 2008 according European Group for Blood and Marrow Transplantation criteria⁶ with negative immunofixation in serum and urine for the original monoclonal myeloma protein. Free light chain measurements were performed with the commercially available Freelite Kit (Binding Site). Because of the aforementioned shorter half-life of free light chain assay ratio,⁵ patients were included only if the complete remission remained stable for at least 3 months. The comparison between immunofixation and free light chain ratio was performed at least 6 weeks after immunofixation becomes negative for the first time. The patients had intact immunoglobulin (n = 47) or light chain immunoglobulin (n = 5) at time of diagnosis. The remission status was determined either after allogeneic (n = 45) or autologous (n = 3) stem cell transplantation or after conventional bortezomib- or lenalidomide-containing chemotherapy (n = 4).

These 52 patients achieved complete remission according to the European Group for Blood and Marrow Transplantation criteria with negative immunofixation for at least 3 months. Fifty-one of 52 patients (98%) had a normal free light chain κ/λ ratio. In contrast to the study of de Larrea, none of the patient with oligoclonal bands in immunofixation (n = 13) had abnormal free light chain κ/λ ratio. However, in a subgroup of patients (n = 10) who relapsed during follow-up from complete remission sequential

monitoring of immunofixation and free light assay was performed as recently described.⁵ In 9 of 10 patients a free light chain ratio became abnormal at a median of 90 days before immunofixation became positive. These results confirm that the free light chain assay ratio is, due to its shorter half-life, a useful marker for faster detection of remission or progression in myeloma patients, but these results do not support additional value of free light chain ratio to determine the depth of remission in immunofixation-negative patients. More sensitive methods such as immunophenotyping analysis by fluorescence-activated cell sorting or molecular primer should be used to determine depth of complete remission because these methods have shown relevant clinical impact.⁷⁻⁹

Nicolaus Kröger

Clinic for Stem Cell Transplantation, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

Svetlana Asenova

Clinic for Stem Cell Transplantation, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

Andreas Gerritzen

Medical Laboratory, Bremen, Germany

Ulrike Bacher

Clinic for Stem Cell Transplantation, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

Axel Zander

Clinic for Stem Cell Transplantation, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany

Contribution: N.K. designed the study, analyzed data, and wrote the letter; S.A. collected and analyzed data; A.G. performed free light assay; U.B. and A.Z. analyzed data; and all authors approved the letter.

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

Correspondence: Prof Dr med Nicolaus Kröger, Department for Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr 52, D-20246 Hamburg, Germany; e-mail: nkroeger@uke.uni-hamburg.de.

References

1. Fernandez de Larrera C, Cibeira MT, Elena M, et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood*. 2009;114(24):4954-4956.
2. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet*. 2003;361(9356):489-491.
3. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(9):1467-1473.
4. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009;23(2):215-224.
5. Mösbauer U, Ayuk F, Schieder H, et al. Monitoring serum free light chains in patients with multiple myeloma who achieved negative immunofixation after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2007;92(2):275-276.
6. Blade J, Samson D, Reece D, et al. Criteria for evaluation disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1115-1123.

- Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, et al. PETHEMA Study Group. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(16):2737-2744.
- Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, et al. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003;102(5):1927-1929.
- Kröger N, Badbaran A, Lioznov M, et al. Post-transplant immunotherapy with donor-lymphocyte infusion and novel agents to upgrade partial into complete and molecular remission in allografted patients with multiple myeloma. *Exp Hematol*. 2009;37(7):791-798.

Response

Free light chain assay and stringent complete remission in multiple myeloma: more questions than answers

We appreciated the comments by Kröger et al on our article and we have read with interest their experience with free light chain (FLC) measurements in 52 patients with multiple myeloma (MM) in complete remission (CR) after allogeneic stem cell transplantation (Allo-SCT; n = 45), autologous stem cell transplantation (ASCT; n = 3) or conventional bortezomib- or lenalidomide-based therapy (n = 4). The high rate of stringent CR (sCR), with 51 of 52 (98%) of the patients achieving a normal FLC κ/λ ratio, is surprising. Moreover, none of their 13 patients with oligoclonal bands had an abnormal FLC κ/λ ratio, which contrasts with our results.¹

The differences between the 2 studies may be explained by the nature of the treatments and the timing of light chain measurement. In the series by Kröger et al, 87% of the patients had achieved CR after Allo-SCT, whereas in our study 76.5% were in CR after ASCT. It is very likely that the immune reconstitution could be different and more delayed after the allogeneic procedure. Of note, in Kröger's study, the free light chains were measured in patients who had been in stable CR for a minimum of only 3 months and at least 6 weeks from the first negative immunofixation electrophoresis. On the contrary, in our series, median duration of the CR was 5 years (range, 1-23.2 years), and median time of oligoclonal band appearance after allogeneic or autologous SCT was 6 months (range, 2-53 months). It is conceivable, therefore, that in those patients with long-lasting responses after high-dose therapy/SCT the robust immune reconstitution would result in the presence of oligoclonal bands and an abnormal FLC ratio, due to a kappa light chain overproduction. In fact, there is a general thought that these oligoclonal bands are transient.² However, in our 14 patients the duration of oligoclonal bands ranged from 0.7 to 9.4 years and persisted in all of them except in the only one who relapsed, in keeping with a recent report by Mark et al.³

There are still many important unsolved issues concerning FLC measurements and sCR in MM. (1) At what time could the FLC assay be more informative (early or after a certain duration of the CR)? (2) Does the frequency of sCR vary depending on the type of treatment? (3) Is the meaning of sCR different after conventional chemotherapy, ASCT, or Allo-SCT? (4) What is the significance of an abnormal FLC ratio in patients with oligoclonal bands? (5) Is sCR of real prognostic value and, if so, in what population of patients?

Finally, we agree completely with Kröger et al that, with the current therapeutic approaches for MM as well as the availability of novel laboratory technologies, the achievement of serologic CR should no longer be the ultimate endpoint. The recent results on the prognostic impact of minimal residual disease studies by multiparameter flow cytometry⁴ and by molecular quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction⁵ are important steps for-

ward that can be crucial to determining for how long beyond serologic CR additional treatment is needed.

Carlos Fernández de Larrea

Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

María Teresa Cibeira

Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Montserrat Elena

Department of Biochemistry, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Juan Ignacio Arostegui

Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Laura Rosiñol

Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Montserrat Rovira

Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Xavier Filella

Department of Biochemistry, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Jordi Yagüe

Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Joan Bladé

Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain

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

Correspondence: Joan Bladé, MD, Servei d'Hematologia, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; e-mail: jblade@clinic.ub.es.

References

- Fernández de Larrea C, Cibeira MT, Elena M, et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood*. 2009;114(24):4954-4956.

- Zent CS, Wilson CS, Tricot G, et al. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 1998;91(9):3518-3523.
- Mark T, Jayabalan D, Coleman M, et al. Atypical serum immunofixation patterns frequently emerge in immunomodulatory therapy and are associated with a high degree of response in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2008;143(5):654-660.
- Paiva B, Vidrales MB, Cerveró J, et al. Multiparameter flow cytometric re-

mission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112(10):4017-4023.

- Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, et al. Correlation between clinical outcome and disease kinetics by quantitative PCR in myeloma patients following post-transplant consolidation with bortezomib, thalidomide and dexamethasone [abstract]. *Blood*. 2009;114(11):Abstract 960.

To the editor:

Role of GATA-1s in early hematopoiesis and differences between alternative splicing in human and murine GATA-1

We read with interest the description by Hoeller et al of an exon 2 GATA-1 mutation leading to severe transient myeloproliferative disease (TMD),¹ in which the authors speculated that the severe phenotype might reflect loss of both full-length (FL) GATA-1 and the shorter isoform, GATA-1s, due to the position of the mutation in codon 2. Although almost all GATA-1 mutations in children with Down syndrome are in exon 2²⁻⁴ and lead to loss of GATA-1FL, exon 2 mutations are also predicted to leave GATA-1s protein production unaffected,⁴ by translation of an alternatively spliced mRNA comprising exons 1/3/4/5/6.² In humans, alternative splicing producing an exon 1/2/3/4/5/6 mRNA for GATA-1FL and exon 1/3/4/5/6 splice variant for GATA-1s has been demonstrated in adult bone marrow CD34⁺ cells.² Using exon 1 and 3 primers, we have also found that both variants are consistently expressed in all normal cord blood and second-trimester fetal liver and bone marrow cells we have tested (n = 12; Figure 1A). It seems likely, therefore, that exon 2 mutations would still allow expression of GATA-1s mRNA, which may be difficult to detect at the protein level due to the relative insensitivity of commercial GATA-1 antibodies in immunohistochemical reactions. Interestingly, and by contrast, although mice produce the 2 Gata-1 isoforms by alterna-

tive translation of a single mRNA,⁵ Gata-1s transcripts have not been reported in murine tissues and, in our experience, exon 1 and 3 primers consistently amplify only the FL transcript in mice (Figure 1B) despite evidence of Gata-1s protein production (Figure 1C). Further investigation of the functional consequences of different GATA-1 mutations may shed further light on the enigmatic role of GATA-1s in early hematopoiesis and differences between alternative splicing in human and murine GATA-1.

Christina Halsey

Faculty of Medicine,
University of Glasgow,
Glasgow, United Kingdom

Oliver Tunstall

Department of Haematology,
Imperial College London,
London, United Kingdom

Brenda Gibson

Department of Paediatric Haematology,
Royal Hospital for Sick Children,
Glasgow, United Kingdom

Irene Roberts

Department of Haematology,
Imperial College London,
London, United Kingdom

Gerard Graham

Faculty of Medicine,
University of Glasgow,
Glasgow, United Kingdom

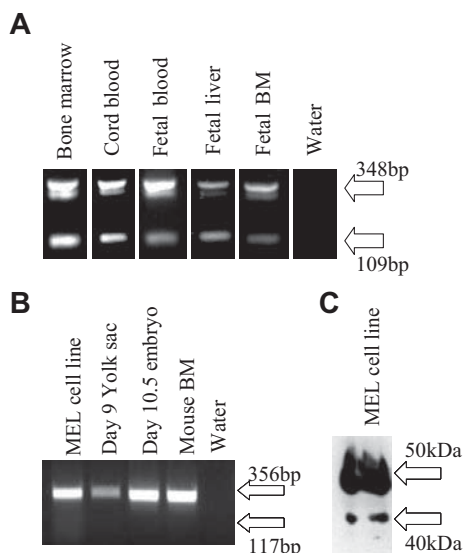


Figure 1. GATA-1 mRNA alternative splicing in human and murine tissues. (A) Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) of cDNA from human bone marrow, cord blood, and second-trimester (15 weeks) fetal blood, liver, and bone marrow, the expected size of the exon 1/2/3 splice variant (348 bp) and an exon 1/3 splice variant (109 bp) are marked. (B) RT-PCR of cDNA from murine hematopoietic tissues and the erythroleukemia cell line MEL. The expected size of an exon 1/2/3 splice variant (356 bp) and an exon 1/3 splice variant (117 bp) are marked. (C) Western blot of a MEL nuclear extract using M20 GATA-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology), the predicted size of GATA-1FL is 47 kDa and GATA-1s 40 kDa.

Acknowledgments: This work was supported by a Leukaemia Research Clinical Training Fellowship (C.H.) and a Kay Kendall Leukaemia Fund Junior Fellowship (O.T.). Approval was obtained from the Hammersmith and Queen Charlotte's Hospital Research Ethics Committee for these studies. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki.

Contribution: C.H. performed the research and wrote the paper; O.T. performed the research and analyzed the data; and B.G., I.R., and G.G. designed the research and analyzed the data.

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

Correspondence: Dr Christina Halsey, Division of Immunology, Infection and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow Biomedical Research Centre, 120 University PI, Glasgow, G12 8TA, United Kingdom; e-mail: c.halsey@clinmed.gla.ac.uk.

References

- Hoeller S, Bihl MP, Tzankov A, Kuehne T, Potthoff C, Bruder E. New GATA1 mutation in codon 2 leads to the earliest known premature stop codon in transient myeloproliferative disorder. *Blood*. 2009;114(17):3717-3718.
- Rainis L, Bercovich D, Strehl S, et al. Mutations in exon 2 of GATA1 are early

Trabajo 2

EMERGENCE OF OLIGOCLONAL BANDS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA IN COMPLETE REMISSION AFTER INDUCTION CHEMOTHERAPY: ASSOCIATION WITH THE USE OF NOVEL AGENTS

**Carlos Fernández de Larrea, Natalia Tovar, M^a Teresa Cibeira,
Juan I. Aróstegui, Laura Rosiñol, Montserrat Elena, Xavier Filella,
Jordi Yagüe, Joan Bladé**

Haematologica 2011; 96:171-173.

Resumen del trabajo 2

En pacientes con MM, la aparición de bandas oligoclonales se asocia a un pronóstico favorable tras un TPH autólogo de progenitores hematopoyéticos. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de inmunoglobulinas oligoclonales en 33 pacientes con MM en RC alcanzada con tratamiento de inducción, bien con agentes citotóxicos (18 pacientes, 54,5%) o bien con regímenes incorporando nuevos fármacos (15 pacientes, 45,4%). Once pacientes (33,3%) presentaron bandas oligoclonales en suero y/u orina, con una mediana de duración de 11,5 meses (rango 22 a 55,7 meses). Esta duración es menor que la observada tras TPH autólogo de progenitores hematopoyéticos. Cuatro de los pacientes (36,4%) tuvieron un patrón fluctuante de la inmunoglobulina oligoclonal durante el seguimiento, basado en cambio de isotipo de la cadena ligera o pesada. El isotipo predominante en la respuesta oligoclonal fue el IgG-kappa. Cinco pacientes con respuesta oligoclonal recayeron durante el seguimiento, coincidiendo en 4 de los casos con la desaparición de la inmunoglobulina oligoclonal, mientras que en el caso restante la banda oligoclonal desapareció seis meses antes de la recaída. En el grupo de pacientes tratado con nuevos agentes, la respuesta inmune oligoclonal se observó en el 60% (9 de los 15), frente a sólo 11,1% (2 de los 18 pacientes) que recibieron terapia con agentes citotóxicos. ($p=0,003$). Estos dos pacientes habían recibido ciclofosfamida y dexametasona como tratamiento de inducción. El presente trabajo constituye la primera observación que muestra una frecuencia diferente de respuesta humoral oligoclonal en pacientes en remisión completa tras tratamiento convencional con citotóxicos frente a regímenes de inducción que incorporan nuevos fármacos. Esta diferencia podría deberse a un mayor efecto antitumoral asociado al uso de estos nuevos agentes, a una reconstitución inmune más intensa, o a ambos fenómenos.

Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents

Carlos Fernández de Larrea,¹ Natalia Tovar,¹ M^a Teresa Cibeira,¹ Juan I. Aróstegui,² Laura Rosiñol,¹ Montserrat Elena,³ Xavier Filella,³ Jordi Yagüe,² and Joan Bladé¹

¹Departments of Hematology, ²Immunology and ³Biochemistry, Hospital Clínic, Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

The emergence of oligoclonal bands is associated with a favorable outcome after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. The aim of this study was to determine the prevalence of immunoglobulin oligoclonality in 33 patients with multiple myeloma in complete remission achieved with primary therapy with either cytotoxic agents (n=18, 54.5%) or new induction regimens incorporating novel drugs (n=15, 45.4%). Eleven patients (33.3%) developed oligoclonal bands. In the group treated with novel agents, this oligoclonal immune response was observed in 60% (9 of 15) of the patients *versus* only 11.1% (2 of 18) of those given cytotoxic therapy ($P=0.003$). This is the first report showing a different frequency of oligoclonal humoral response in patients in complete remission achieved after conventional cytotoxic therapy *versus* induction incorporating novel agents. This dif-

ference could be due to a higher antitumor effect associated with the use of novel drugs, a stronger immune reconstitution, or both.

Key words: myeloma, complete remission, oligoclonal band, chemotherapy.

Citation: Fernández de Larrea C, Tovar N, Cibeira M^aT, Aróstegui JI, Rosiñol L, Elena M, Filella X, Yagüe J, and Bladé J. Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. *Haematologica* 2011;96(1): 171-173. doi:10.3324/haematol.2010.030882

©2011 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

The emergence of an oligoclonal humoral response is a well-recognized event after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma (MM), which has been associated with a good prognosis. It is likely due to a more durable immune reconstitution.¹⁻³ This oligoclonal humoral response can appear as multiple oligoclonal bands in serum and/or urine immunofixation (IFE) resulting in the so-called atypical serum IFE patterns (ASIPs).⁴ Though initially described as transient, there is growing evidence to show that this oligoclonal humoral response can last for years.²⁻⁵ Its prevalence is highly variable, ranging from 10% to 73%.¹⁻³ The appearance of oligoclonal bands has also been reported after treatment with the novel immunomodulatory drug lenalidomide,⁴ and less is known concerning its potential relationship with conventional cytotoxic therapy or even with other novel therapeutic approaches. The aim of this study was to determine the prevalence of serum and/or urine IFE oligoclonal bands in two groups of patients with multiple myeloma in complete remission (CR) achieved either after primary therapy with cytotoxic agents or with new induction chemotherapy regimens incorporating novel drugs up-front.

Design and Methods

Thirty-three patients (15 male and 18 female, median age 59 years, range 25-89) with multiple myeloma in complete remission according to EBMT and IURC criteria^{6,7} achieved with different induction regimens were enrolled. The diagnosis of multiple myeloma was established according to the criteria of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force.⁸ Initial baseline demographics, clinical and laboratory data, and information concerning treatment and follow up were collected. An oligoclonal humoral response was defined as the presence of a serum and/or urine IFE monoclonal spike different from the original myeloma protein either in heavy and/or light chains as well as at IFE migration pattern. Statistical tests were performed with SPSS software 15.0 for Windows®, estimating 95% confidence interval (CI) by Wilson's test. This study was approved by the Hospital Clinic Ethics Board.

Results and Discussion

Eighteen patients (54.5%) received induction with conventional chemotherapy while 15 were initially treated with novel agents (45.5%). The conventional cytotoxic regimens in the first group were: VBCMP/VBAD (55.5%), cyclophos-

Funding: this work has been supported in part by grants RD06/0020/0005, CM07/00108 and FIS08/0147 from Instituto de Salud Carlos III; and "Josep Font" Grant from Hospital Clínic de Barcelona.

Manuscript received on July 19, 2010. Revised version arrived on September 10, 2010. Manuscript accepted on September 28, 2010.

Correspondence: Joan Bladé, Servei d'Hematologia, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Phone: +34.93.2275428.

Fax: +34.93.2275484. E-mail: jblade@clinic.ub.es

phamide and dexamethasone (11.1%), VAD (11.1%), VCMP/VBAD (11.1%), VBAD (5.6%) and VCAP (5.6%). In the second group, the induction regimen was based on combinations of glucocorticoids with bortezomib (33.3%), lenalidomide (26.7%), thalidomide (26.7%), or bortezomib plus thalidomide (13.3%).

In the overall series, 11 of the 33 patients (33.3%) developed an oligoclonal humoral immune response. These abnormal bands observed in the IFE pattern lasted from 2.2 to 55.7 months (median 11.5 months). This relatively short duration contrasts with that observed after ASCT in our previous report,⁵ where it lasted from 8 to 112 months. One explanation for this different duration could be that myeloablative treatment with high-dose melphalan followed by stem cell rescue probably results in higher tumor reduction resulting in a more powerful immune reconstitution than induction chemotherapy not followed by ASCT.

The high frequency of oligoclonal humoral response after only induction therapy was unexpected. In the ASCT context, 10% of the patients from the Arkansas group¹ developed this immunological phenomenon. In a recent report from our group,⁵ 41.2% of the patients developed oligoclonal bands after ASCT. Interestingly, in the present series, 5 patients with oligoclonal humoral response have already relapsed (45.5%). In 4 of them, relapse occurred at the same time as the disappearance of the previous oligoclonality, while in the remaining case the oligoclonality disappeared six months before relapse. Our previous experience with oligoclonal bands after ASCT showed that they persisted during follow up in all patients, except in one who relapsed soon after the disappearance of the IFE oligoclonality.⁵ These data are also consistent with the benign nature of this oligoclonal immune response as an indirect sign of immune reconstitution, and its disappearance is a hallmark of immediate or early relapse.

Four patients (36.4%) had a fluctuating oligoclonal pattern during their follow up on the basis of the different heavy and/or light chains combinations of IFE bands, while the remaining showed a single oligoclonal immunoglobulin. As in previous reports, a preponderance of IgG- κ oligoclonal immunoglobulin was observed.^{4,5} This isotype predominance is likely due to a selective

advantage of a B-cell population related to the recovery of impaired immunoglobulin production after a robust response to therapy.^{4,5} In the group of patients treated with cytotoxic agents, the presence of oligoclonal bands was observed in 2 of them (11.1%, 95% CI 3.1-32.8). These 2 patients had been treated with cyclophosphamide and dexamethasone. In contrast, in the group of patients treated with novel drugs, 9 of 15 (60%, 95% CI 35.75-80.18) developed oligoclonal bands in serum and/or urine (two-sided χ^2 test, $P=0.003$). Main characteristics of patients who developed oligoclonal bands as well as the treatment given are shown in Table 1.

With treatment with melphalan and prednisone the complete remission rate was less than 5%. The new regimens, MPT (melphalan, prednisone and thalidomide),^{9,10} MPV (melphalan, prednisone and bortezomib),¹¹ MPR (melphalan, prednisone and lenalidomide)¹² or lenalidomide/dexamethasone¹³ are showing unprecedented complete remission rates of 15%, 30%, 24% and 24%, respectively. With the progressive use of novel drugs the complete remission rate and consequently the proportion of patients who develop an oligoclonal immune response with oligoclonal bands will likely increase. In fact, in the BiRD study, Mark *et al.*⁵ reported that 33% of patients treated with clarithromycin, lenalidomide and dexamethasone developed ASIPs (atypical serum IFE patterns) consisting in the emergence of monoclonal and oligoclonal immunoglobulins unrelated to the original monoclonal protein. In our series, including patients treated with novel therapies such as thalidomide, lenalidomide and bortezomib, this phenomenon was observed in up to 60% of patients.

The mechanism associated with the emergence of oligoclonal bands and the prognostic significance of this phenomenon are still unknown. Molecular studies by semi-nested ASO-RT-PCR and DNA sequencing immunoglobulin variable genes have demonstrated a non-clonal related origin of plasma cells in multiple myeloma patients in complete remission with oligoclonal bands.¹⁴ In spite of the value of an oligoclonal immune response after ASCT,¹ in terms of prolonged event free survival and overall survival, the prognostic impact of the emergence of IFE oligoclonality after induction has not been established. A signif-

Table 1. Characteristics of patients with oligoclonal bands.

Patient Number	Age (years)	Sex	Primary CT	ASCT	Original M-spike	Primary oligoclonal band	Other oligoclonal band	Oligoclonal band duration (months)
1	79	M	TD	No	IgA- κ	IgG- λ	-	2.34
2	54	F	BD	Yes	IgA- λ	IgG- κ	-	4.41
3	72	F	CD	No	IgD- λ	IgG- κ	IgG- λ	9.8+
4	59	M	CD	No	IgA- λ	IgG- κ	IgM- κ	2.2
5	64	F	TD	No	IgG- λ	IgG- κ	-	11.5+
6	67	M	B	No	κ	IgG- κ	-	8.1+
7	47	M	M2/B	No	κ	IgM- λ	-	14.9+
8	54	F	BTM	Yes	IgM- λ	IgG- κ	-	17.6+
9	61	F	TD	No	IgG- λ	IgG- κ	IgM- λ	55.3
10	51	F	BD	No	IgD- λ	IgG- κ	-	12.7+
11	76	M	LD	No	IgA- λ	IgG- λ	λ	13.9

CT: chemotherapy; ASCT: autologous stem cell transplantation; T: thalidomide; D: dexamethasone; B: bortezomib; C: cyclophosphamide; M2: vincristine, BCNU, cyclophosphamide, melphalan and prednisone alternating with vincristine, BCNU, doxorubicin and dexamethasone; L: lenalidomide.

icant impact on the short-term outcome in the BiRD study with the new drug lenalidomide in patients who developed ASIPS (71% vs. 23%) is of interest, but long-term benefits have not yet been reported.

In summary, this is the first report showing a higher frequency of oligoclonal humoral immune response in patients with multiple myeloma in complete remission after induction therapy incorporating novel agents versus those who were treated with conventional cytotoxic therapy. The observed difference in patients receiving novel drugs could be likely due to a higher tumor reduction, a stronger immune reconstitution, or both. The mechanisms facilitating the emergence of immunoglobulin oligoclonal-

ity as well as its prognostic significance after induction therapy, particularly when using new drugs, deserve further investigation.

Authorship and Disclosures

The information provided by the authors about contributions from persons listed as authors and in acknowledgments is available with the full text of this paper at www.haematologica.org.

Financial and other disclosures provided by the authors using the ICMJE (www.icmje.org) Uniform Format for Disclosure of Competing Interests are also available at www.haematologica.org.

References

- Zent CS, Wilson CS, Tricot G, Jagannath S, Siegel D, Desikan KR, et al. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 1998;91(9):3518-23.
- Hovenga S, de Wolf JT, Guikema JE, Klip H, Smit JW, Smit Sibinga CT, et al. Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma after VAD and EDAP courses: a high incidence of oligoclonal serum Igs post transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(7):723-8.
- Hall SL, Tate J, Gill D, Mollee P. Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Clin Biochem Rev*. 2009;30(3):113-8.
- Mark T, Jayabalan D, Coleman M, Pearse RN, Wang YL, Lent R, et al. Atypical serum immunofixation patterns frequently emerge in immunomodulatory therapy and are associated with a high degree of response in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2008;143(5):654-60.
- Fernandez de Larrea C, Cibeira MT, Elena M, Arostegui JI, Rosiñol L, Rovira M, et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood*. 2009;114(24):4954-6.
- Bladé J, Samson D, Reece D, Apperley J, Björkstrand B, Gahrton G, et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1115-23.
- Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(9):1467-73.
- Proposed guidelines for protocol studies. II. Plasma cell myeloma. Prepared by a Committee of the Chronic Leukemia--Myeloma Task Force, National Cancer Institute. *Cancer Chemother Rep* 3. 1968;1(1):17-39.
- Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, Merla E, Capparella V, Callea V, et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomized controlled trial. *Lancet*. 2006;367(9513):825-31.
- Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 2007;370(9594):1209-18.
- San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(9):906-17.
- Palumbo A, Falco P, Corradini P, Falcone A, Di Raimondo F, Giuliani N, et al. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA—Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol*. 2007;25(28):4459-65.
- Lacy MQ, Gertz MA, Dispenzieri A, Hayman SR, Geyer S, Kabat B, et al. Long-term results of response to therapy, time to progression, and survival with lenalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(10):1179-84.
- Guikema JE, Vellenga E, Veeneman JM, et al. Multiple myeloma related cells in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 1999;104(4):748-54.

Trabajo 3

**MULTIPLE MYELOMA IN SEROLOGICAL COMPLETE REMISSION
AFTER AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION:
IMPACT OF BONE MARROW PLASMA CELL ASSESSMENT BY
CONVENTIONAL MORPHOLOGY ON DISEASE PROGRESSION**

**Carlos Fernández de Larrea, Natalia Tovar, María Rozman, Laura Rosiñol,
Juan Ignacio Aróstegui, María Teresa Cibeira, Montserrat Rovira,
Jordi Yagüe, and Joan Bladé**

Biology of Bone and Marrow Transplantation 2011 [[Epub ahead of print](#)]

Resumen del trabajo 3

La definición actual de remisión completa en el MM requiere la inmunofijación negativa en suero y orina, y menos de 5% de células plasmáticas en médula ósea. El objetivo de este estudio fue determinar el valor del recuento de las células plasmáticas en médula ósea, realizado por microscopía óptica convencional, en pacientes con MM en remisión completa serológica tras TPH autólogo de progenitores hematopoyéticos. Se estudiaron 35 pacientes con una mediana de seguimiento post-trasplante de 7,3 años. La mediana de células plasmáticas en médula ósea fue 0,8% (rango 0,1% a 5,8%). Sólo en dos pacientes se observó más del 3% de células plasmáticas. El porcentaje de células plasmáticas en médula ósea fue predictor de progresión en un modelo multivariable (cociente de riesgos instantáneos 2,02; $p=0,009$). Los pacientes con más de 1,5% de células plasmáticas en médula ósea tras el trasplante tuvieron un riesgo significativamente mayor de progresión ($p=0,016$) y una tendencia a una SG más corta ($p=0,195$). Estos resultados sobre el valor pronóstico de esta determinación concuerdan con los referidos recientemente por el grupo de la Clínica Mayo, pero con un dintel mucho menor en nuestra serie (1,5% versus 5%). En conclusión, la morfología convencional de médula ósea es una herramienta útil, económica y rápida como estrategia inicial de la evaluación de la masa tumoral residual en pacientes con MM en remisión completa tras TPH autólogo, y constituye un fuerte predictor de la progresión de la enfermedad post-trasplante.

Multiple Myeloma in Serologic Complete Remission after Autologous Stem Cell Transplantation: Impact of Bone Marrow Plasma Cell Assessment by Conventional Morphology on Disease Progression

Carlos Fernández de Larrea,¹ Natalia Tovar,¹ María Rozman,² Laura Rosiñol,¹
 Juan Ignacio Aróstegui,³ María Teresa Cibeira,¹ Montserrat Rovira,¹
 Jordi Yagüe,³ Joan Bladé¹

[Q1]

The current definition of complete remission (CR) in multiple myeloma (MM) requires a negative serum and urine immunofixation (IFE) and <5% bone marrow plasma cells (BMPCs). The aim of this study was to determine the value of BMPCs count by standard microscopic evaluation in patients with MM in serologic CR after autologous stem cell transplantation (ASCT). Thirty-five patients with a median follow-up after ASCT of 7.3 years were studied. The percentage of BMPCs was an independent predictor of progression in multivariate model (hazard ratio 2.02, $P = .009$). Patients with >1.5% BMPCs (median: 0.8%) after ASCT had an increased risk of progression ($P = .016$) and a trend toward a shorter survival ($P = .195$). In conclusion, conventional morphology of bone marrow is a useful and rapid tool as a first step to assess the residual tumor mass in patients with MM in CR after ASCT, and it constitutes a strong predictor for disease progression.

Biol Blood Marrow Transplant ■: 1-4 (2011) © 2011 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS: Myeloma, Complete remission, Plasma cell, Bone marrow aspirate, Prognosis, Stem cell transplantation

INTRODUCTION

The achievement of complete remission (CR) is the crucial step for a long-lasting response and prolonged survival after autologous stem cell transplantation (ASCT) in patients with multiple myeloma (MM) [1-3]. The European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) criteria for CR include the negativity of serum and urine immunofixation (IFE) and <5% of bone marrow plasma cells (BMPCs) [4]. Additionally, the International Myeloma Working Group (IMWG) has even proposed a stringent CR category, which also requires to rule out the clonal nature of the BMPCs [5]. However, few studies have addressed this issue in patients with MM and negative

IFE [6]. Despite the EBMT and IMWG recommendations, there have been suggestions to eliminate the bone marrow examination from the clinical practice in patients with negative IFE, arguing that the 5% limit is arbitrary, the uncertainty on its prognostic value and that the procedure is uncomfortable for patients [6]. The aim of the present study was to determine the impact of plasma cell count in the bone marrow aspirate estimated by conventional morphology on the long-term outcome of patients with MM with negative IFE after ASCT.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-five patients (16 M/19 F; median age at ASCT 55 years, range: 26-68) with symptomatic MM who underwent ASCT from March 31, 1994 to August 29, 2008, with available bone marrow aspirates and adequate cellularity were included in the study. All patients had achieved a negative serum and urine IFE after high-dose therapy with melphalan-based regimens (melphalan 200 mg/m², melphalan 140 mg/m² plus total-body irradiation [TBI] or melphalan 140 mg/m² plus busulfan 12 mg/kg) (Table 1).

Bone marrow aspiration was performed when negative serum and urine IFE was achieved and at least 3

From the ¹Department of Hematology; ²Hematopathology Unit; and ³Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 4.

Correspondence and reprint requests: Joan Bladé, MD, Servei d'Hematologia, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: jblade@clinic.ub.es).

Received August 12, 2010; accepted December 22, 2010

© 2011 American Society for Blood and Marrow Transplantation 1083-8791/\$36.00

doi:10.1016/j.bbmt.2010.12.707

Table 1. Patient Characteristics

	Value
Median age, years. (range)	55 (26-68)
Male/female, no.	16/19
M-protein type (%)	
IgG	42.9
IgA	22.9
Light chain only	25.7
IgD	5.7
IgM	2.9
Light-chain type (%)	
κ	57.1
λ	42.9
Durie-Salmon stage at diagnostic (%)*	
I	11.8
II	38.2
III	50.0
Initial chemotherapy (%)†	
VMCP/VBAP or VBMCP/VBAD	60.0
Other	40.0
HDT regimen	
Mel-200	71.4
BU/MEL	17.2
Mel-140/TBI	11.4

TBI indicates total-body irradiation; V(B)MCP, vincristine; (BCNU), melphalan, cyclophosphamide, prednisone; VBAD(P), vincristine, BCNU doxorubicin, dexamethasone (prednisone); HDT, high-dose therapy; Mel-200, melphalan 200 mg/m²; BU/MEL, melphalan 140 mg/m² plus busulphan 12 mg/kg; Mel-140/TBI, melphalan 140 mg/m² plus total-body irradiation.

*Durie-Salmon stage was available in 34 patients.

†One patient did not receive induction chemotherapy because of associated primary amyloidosis AL.

months from ASCT (median 3.24 months, range: 2-11). The analysis was based on microscopic revision of May-Grünwald-Giemsa stained bone marrow smears performed according to standard procedures. BMPC percentage was calculated independently by 2 observers (C.F.d.L. or N.T., and the senior cytologist M.R.) counting 500 bone marrow total nucleated cells in random areas from 2 different slides (1000 cells on each patient). The evaluation was repeated in 7 patients (20%) because of a discordance $\geq 0.5\%$ BMPCs between the 2 observers. In all cases, a new independent revision of 500 cells by each observer resulted in a concordance with $<0.5\%$ difference. Baseline demographics, clinical and laboratory data, as well as induction treatment were collected from all patients. Progression-free survival (PFS) was defined as survival from ASCT until relapse or dead from any cause. Overall survival (OS) was calculated from the time of ASCT. IFE was performed every 6 months in patients in CR after ASCT. The median follow-up of the series was 7.3 years and no patient was lost to follow-up.

RESULTS AND DISCUSSION

The initial clinical and laboratory findings as well as the induction chemotherapy and the high-dose regimen are shown in Table 1. All 35 patients had

available bone marrow aspirates with adequate cellularity. Median BMPCs percentage was 0.8 (range: 0.1-5.8). Only 2 patients had $>3\%$ BMPCs. These results are in contrast with a recent report from the Mayo Clinic group, where 14% of the patients with MM and negative IFE had 5% or more BMPCs [6]. The discrepancy between our results and those reported by the Mayo group could be explained by several reasons. First, the study population in the Mayo report was heterogeneous. Thus, 55% of the patients had achieved negative IFE after ASCT whereas the remaining 45% were in CR after conventional chemotherapy. Additionally, the BMPCs percentages were not analyzed separately according to the treatment administered. In contrast, all our patients were in CR after ASCT. In fact, the extremely low percentage of BMPCs in our patients in CR is surprising, and it is likely related to the myeloablative high dose treatment with its possible effect on the myeloma stem cell. Second, the estimation of BMPCs in the Mayo study was not based on a systematic count by independent observers on a large number of cells. Third, the estimation of BMPCs on bone marrow aspirate and biopsy in the Mayo report versus the assessment only in bone marrow aspiration in the present study, which could have resulted in underestimation of the proportion of BMPCs in our series.

In univariate Cox-model regression analysis, the number of BMPCs showed a significant correlation with PFS ($P = .021$) with no significant impact on OS ($P = .92$). This statistical significance on PFS was retained in the multivariate analysis, when baseline prognostic factors such as age, hemoglobin level, serum creatinine, $\beta 2$ -microglobulin, Durie-Salmon stage, or conditioning regimen were added to the model (hazard ratio [HR] 2.02, $P = .009$). For Kaplan-Meier survival analysis [7], patients were divided according to BMPC percentage in 3 groups (group 1: $<1\%$, group 2: between 1% and 2%, and group 3: $>2\%$). The PFS was significantly longer in the 2 first groups compared with group 3 (log rank test, $P = .01$), with no significant difference in OS. To establish the best predictive cutoff for progression and survival, a receptor-operator curve (ROC) analysis was developed [8,9]. It showed the value of 1.5% BMPCs, with a sensitivity of 53%, specificity of 90%, and area under the curve (AUC) of 0.66 for predicting progression. Ten patients had $>1.5\%$ BMPC, and 25 $\leq 1.5\%$ BMPC. Median PFS was 8.5 years (confidence interval [CI] 95% 2.6-14.3) and was not reached in patients with $\leq 1.5\%$ BMPCs versus 3.1 years in patients with $>1.5\%$ BMPCs, with a hazard ratio probability to progression of 3.02 (CI 95% 1.18-9.71) ($P = .016$) in the group with $>1.5\%$ of BMPCs (Figure 1). Of interest, the median BMPC count was similar in patients who received induction with cytotoxic drugs versus novel drugs (1.16% versus 1.27%, $P = .8$) and the proportion of patients with

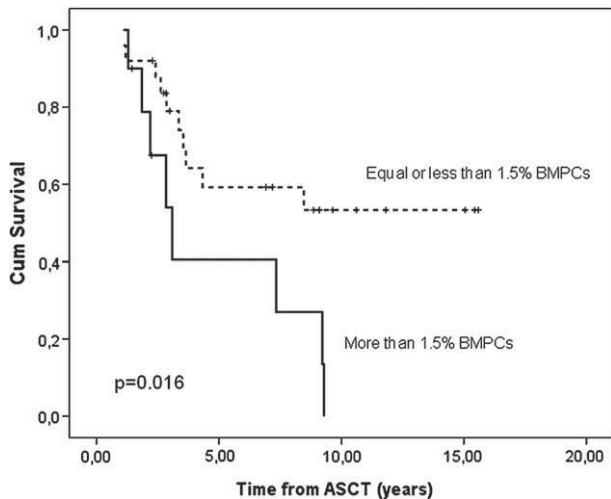


Figure 1. Progression-free survival (PFS) in patients with MM with negative immunofixation electrophoresis after ASCT, according to number of bone marrow plasma cells (BMPCs).

>1.5% BMPCs was not significantly different (24% versus 33%, $P = .67$). PFS was also similar with the 2 induction groups ($P = .36$). Median OS was not reached in patients with $\leq 1.5\%$ compared with a median of 9.7 years in those with more than 1.5% BMPCs ($P = .195$) (Figure 2). The lack of influence of the proportion of BMPCs on OS could be explained by the impact of rescue regimens after relapse and also for the small number of patients included in our study. These results on the prognostic value of BMPCs in patients in CR are in agreement with those reported in the Mayo Clinic study [6], but with a much lower BMPC cutoff in our series (1.5% instead of 5%). Molecular studies performed on small series of patients have shown that the level of residual clonal plasma cells correlate with long-term outcome after hematopoietic stem cell transplantation [10-12]. In addition, 4 studies have

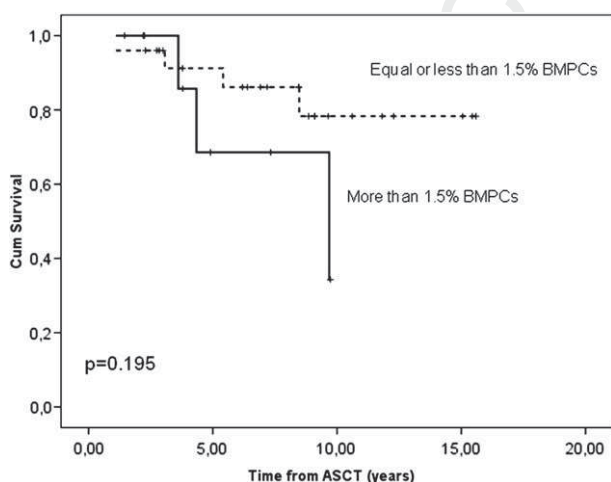


Figure 2. Overall survival (OS) in patients with MM with negative immunofixation electrophoresis after ASCT, according to number of bone marrow plasma cells (BMPCs).

shown that minimal residual disease (MRD) defined by multiparameter flow cytometry (MFC) is more sensitive than IFE [13-16]. In the largest of these studies, MRD detected by MFC emerged as the most relevant prognostic factor [16]. Of note, in the study by Paiva et al. [16], the median percentage of total BMPCs seen by immunophenotyping was as low as 0.26%, a figure that is equivalent (about one-third) to the 0.8% observed in the present study by conventional bone marrow examination, explained by the different distribution of BM cells in samples for both techniques [17]. Interestingly, our results on PFS (median not reached versus 37 months) and OS (median not reached versus 116 months) with the BMPCs cutoff at 1.5% are very close to those reported by Paiva et al. [16], based on the absence or presence of MRD by MFC with median PFS of 71 versus 37 months and median OS not reached versus 89 months. It is likely that serologic CR with very low percentage of BMPCs (ie, $\leq 1.5\%$) is equivalent to negative MRD by MFC or molecular remission. In fact, all our 8 patients in continued CR between 9 and 16 years beyond ASCT (“operational cures” [18,19]) are in the group with $\leq 1.5\%$ BMPCs, whereas all patients in the group with $>1.5\%$ BMPC have relapsed within the first 9 years from ASCT (Figure 1). Needless to say, the immunophenotypic and, particularly, molecular remission represent an upgraded level of response than the IFE negative CR and must be the ultimate goal of myeloma therapy.

In summary, our results show that the percentage of BMPCs in patients with MM in CR after ASCT is a strong predictor of progression. Our observation is in line with recent reports on the prognostic value of MRD assessment either by MFC or molecular studies. Bone marrow morphology examination is an easy, inexpensive, and nontime-consuming test, and it should be the first step in the estimation of the residual tumor mass in patients with MM and negative immunofixation after ASCT.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported in part by grants RD06/0020/0005, CM07/00108, and FIS08/0147 from Instituto de Salud Carlos III; and “Josep Font” Grant from Hospital Clínic de Barcelona.

AUTHORSHIP STATEMENT

C.F.L. and J.B. designed the research, collected and analyzed data, performed statistical analysis, wrote and reviewed the article. C.F.L., N.T., and M.R. performed the bone marrow plasma cell counts. N.T. and M.R. collected data and reviewed the article. M.T.C., L.R., and M.R. treated the patients, collected data, and reviewed the article. J.I.A. and J.Y. performed the

immunofixation assays and reviewed. All the authors approved the final version of the manuscript.

Financial disclosure: No relevant conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, et al. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol*. 2008;26:5775-5782.
2. Wang M, Delasalle K, Feng L, et al. CR represents an early index of potential long survival in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:498-504.
3. van de Velde HJ, Liu X, Chen G, Cakana A, Deraedt W, Bayssas M. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica*. 2007;92:1399-1406.
4. Bladé J, Samson D, Reece D, et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol*. 1998;102:1115-1123.
5. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20:1467-1473.
6. Chee CE, Kumar S, Larson D, et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2009;114:2617-2618.
7. Bland JM, Altman DG. Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ*. 1998;317:1572.
8. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143:29-36.
9. Nüchel H, Rebmann V, Dürig J, Dührsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105:1694-1698.
10. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90:1365-1372.
11. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, et al. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2000;8:930-934.
12. Ladetto M, Pagliano G, et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28:2077-2084.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró 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.
17. Paiva B, Vidriales MB, Pérez 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.
18. Barlogie B, Tricot GJ, van Rhee F, et al. Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2006;135:158-164.
19. Rovira M, Rosiñol L, Fernández-Avilés F, et al. Is there a curative potential of autologous stem cell transplantation in multiple myeloma? Long-term results from a single-centre series [abstract]. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43:S147. Abstract no. P592.

V. DISCUSIÓN

El mieloma múltiple es una proliferación clonal de células plasmáticas en la médula ósea, caracterizada por un alto grado de resistencia al tratamiento. De hecho, la RC raramente se alcanza con el uso de quimioterapia convencional. Durante muchos años, la estabilización de la masa tumoral ha sido el factor pronóstico más importante que el grado de disminución tumoral (Bladé *et al*, 1998b). Más recientemente, con la administración de dosis elevadas de quimioterapia seguidas de TPH autólogo se han logrado una mayor disminución del tumor y se ha demostrado que existe una correlación significativa entre dicha disminución y la supervivencia de los pacientes. Esto llevó a la definición de RC por el EBMT, dada por una inmunofijación negativa en suero y orina, junto a la ausencia de un incremento del porcentaje de células plasmáticas en médula ósea. Hace unos pocos años, el IMWG expandió los criterios de CR del EBMT, añadiendo la categoría de RC “estricta”, definida por una inmunofijación negativa en suero y orina, con un cociente de cadenas ligeras libres en suero normal, junto a la ausencia de células plasmáticas clonales en médula ósea por inmunofenotipo o inmunohistoquímica (Durie *et al*, 2006). El IMWG también introdujo el concepto de MBRP ($\geq 90\%$ del componente monoclonal) como una categoría separada de la RP ($\geq 50\%$ de disminución de la proteína monoclonal). De otro lado, el hecho de alcanzar una enfermedad mínima residual negativa en médula ósea por citometría de flujo multiparamétrica (Paiva *et al*, 2009) o por estudios moleculares (Ladetto *et al*, 2010) se ha mostrado crítica para una remisión duradera y una supervivencia prolongada. De hecho, hasta un tercio de los pacientes que alcanzan la RC tras un TPH autólogo continúan en RC más allá de 10 años desde el trasplante, representando las llamadas “curaciones operacionales” o “*cure fraction*” (Bladé *et al*, 2010b).

La determinación de cadenas ligeras libres en suero podría, teóricamente, permitir la identificación de pacientes con menor riesgo de progresión. La llamada RC estricta requeriría, por tanto, un cociente FLC normal (entre 0,26 y 1,65), junto a la inmunofijación

sérica y urinaria negativas y la presencia de menos de 5% de células plasmáticas clonales en médula ósea (Durie *et al*, 2006). La experiencia sobre el valor pronóstico de la RC estricta es todavía limitado (Kumar *et al*, 2009). A este respecto, el primer trabajo de la presente tesis doctoral (Fernández de Larrea *et al*, 2009) demuestra que 11 de 34 pacientes (32,4%) en RC tras TPH presentaban un cociente kappa/lambda de cadenas ligeras en suero anormal. En todos los casos, dicho cociente kappa/lambda se encontraba por encima del valor normal, reflejando un exceso relativo de producción de la cadena kappa. La observación más importante de este trabajo radica en que dicho cociente anómalo se asoció fundamentalmente a la presencia de bandas oligoclonales en suero y/u orina (72,7% frente a 26%), una situación frecuente tras el TPH. Cuatro hechos adicionales caracterizaron la descripción de estas bandas oligoclonales y difirieron de publicaciones previas: su prevalencia, la duración de las mismas, la discrepancia con los valores de cociente de cadenas ligeras, y la alternancia de isotipo. Este fenómeno inmune fue tan frecuente como en el 41,2% de los casos, en comparación a series anteriores que lo cifraban en un rango tan amplio como entre el 10% y el 73% tras TPH autólogo (Zent *et al*, 1998; Hovenga *et al*, 2000; Hall *et al*, 2009). El tipo más frecuente de isotipo fue el IgG-kappa, siendo de forma característica fluctuante entre más de un isotipo durante la evolución en más de la mitad de los pacientes (57,1%). Los cocientes anómalos siempre fueron altos, independientemente del isotipo de la banda oligoclonal. Esta discordancia entre el isotipo en la inmunofijación y la determinación de cadenas ligeras ya ha sido descrito en otras series (Singhal *et al*, 2009), y probablemente refleje más el grado de reconstitución inmune que un indicativo de la clonalidad de cadenas ligeras como enfermedad mínima residual. De hecho, la mediana del cociente fue más alto en los pacientes con bandas oligoclonales que en aquellos con inmunofijación completamente negativa (2,55 frente a 0,87). Por último, la duración de las bandas fue muy prolongada (rango entre 0,7 y 9,4 años), persistiendo en todos los pacientes, excepto en uno que recayó. Esta duración prolongada discrepa de la duración más cortas tras TPH autólogo

referida en la serie de Arkansas, donde la mediana fue de tan solo 7 meses (Zent *et al*, 1998). La aparición de este fenómeno indica la necesidad de efectuar estudios de inmunología y biología molecular para dilucidar su origen y significado. En nuestra serie, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de CD4 de acuerdo a la presencia de bandas oligoclonales y cocientes anómalos de cadenas ligeras. Previamente ya ha sido demostrado por ASO-RT-PCR y secuenciación del DNA del gen de región variable de las inmunoglobulinas que las células plasmáticas productoras de las bandas oligoclonales no tienen relación clonal con la célula plasmática maligna en pacientes con MM en RC (Guikema *et al*, 1999). El reconocimiento de estos patrones inmunolectroforéticos como factores de buen pronóstico, la importancia de su reconocimiento en la inmunofijación en pacientes en RC (con el diagnóstico diferencial con los grados de respuesta casi-RC o MBRP) y el hecho de que su desaparición precede o coincide con la recaída serológica de la banda original, tienen un gran interés clínico.

Estos resultados arrojan un conjunto de dudas sobre la RC estricta y su utilidad tras TPH. Los criterios del IMWG, tal y como están definidos actualmente, no distinguen entre pacientes con o sin bandas oligoclonales. Nuestros resultados indican que se debe tomar en consideración la presencia de una respuesta humoral oligoclonal en la definición de RC estricta.

El impacto de dichos conceptos dio origen a que el grupo alemán comunicara (Kröger *et al*, 2010) su experiencia en cuanto a prevalencia de bandas oligoclonales y RC estricta en una serie de 52 pacientes con MM en RC, básicamente tras TPH alogénico (45 pacientes). En ese estudio, 51 de los pacientes (98%) alcanzaron una RC estricta, con normalización de las cadenas ligeras libres en suero. En contraste con nuestra observación, en este caso ninguno de los 13 pacientes con bandas oligoclonales presentaron un cociente anormal de cadenas ligeras libres en suero. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las

poblaciones de pacientes son diferentes, ya que un 87% de los casos alcanzando la RC tras TPH alogénico, frente al 76,5% tras TPH autólogo de progenitores hematopoyéticos en nuestra serie. El momento de la determinación también es distinto. Así, en la serie de Kröger *et al*, la medición se realizó sólo con un mínimo de 3 meses en RC estable y al menos 6 semanas tras la primera inmunofijación negativa. En nuestro caso, la duración mediana de la RC fue 5 años (rango de 1 a 23,2 años), con una mediana de tiempo de aparición de las bandas oligoclonales tras el TPH de 6 meses (rango de 2 a 53 meses). A mayor abundamiento, la reconstitución inmune es más retardada en el caso de TPH alogénico que en el autólogo, por lo que la aparición de las bandas oligoclonales podrían tener tiempos diferentes según el distinto escenario.

Como un paso más nos propusimos investigar la presencia de bandas oligoclonales en pacientes en RC, que no hubiesen sido sometidos a tratamiento mieloablativo, sino que dicha respuesta fuese alcanzada con tratamientos “convencionales” tipo citostáticos y corticoides, o con los denominados “nuevos” fármacos (talidomida, bortezomib y lenalidomida, con o sin corticoides) (Fernández de Larrea *et al*, 2011a). Para ello se valoraron pacientes en RC tras tratamiento con regímenes convencionales con citostáticos y corticoides o con regímenes que incorporaban nuevos fármacos (talidomida, lenalidomida, bortezomib). En la serie global un tercio de los pacientes presentaron bandas oligoclonales, con una mediana de duración de casi un año. Estos datos contrastan tanto en prevalencia como en duración, obteniendo resultados intermedios con la que habíamos observado en nuestra serie de pacientes sometidos a TPH autólogo (Fernández de Larrea *et al*, 2009) con un 41% de prevalencia, con unos extremos que iban de 8 y 112 meses de duración, y los del grupo de Arkansas (Zent *et al*, 1998) tras TPH autólogo (10% de prevalencia, 7 meses de mediana de duración). La explicación podría encontrarse en que las altas dosis de melfalán seguidas de rescate con progenitores hematopoyéticos probablemente conllevan una disminución tumoral más profunda, con una reconstitución

inmune posterior más intensa. Trabajos previos, como el estudio BiRD (Mark *et al*, 2008) mostraban que un 33% de los pacientes tratados con claritromicina, lenalidomida y dexametasona presentaron patrones anómalos de inmunofijación, consistentes en la aparición de inmunoglobulinas mono- u oligoclonales no relacionadas a la proteína monoclonal original. Estos datos se acercan a los obtenidos en nuestra serie, aunque los tratamientos recibidos hayan sido más heterogéneos.

Cabe destacar que en cuatro de nuestros pacientes con respuesta humoral oligoclonal, la recaída coincidió con la desaparición del componente oligoclonal, mientras que en otro paciente la banda oligoclonal había desaparecido seis meses antes de constatarse la recaída. En base a estos datos, tanto en el marco del TPH como tras regímenes no mieloablativos, podemos afirmar que la respuesta inmune oligoclonal es un fenómeno benigno asociado a un pronóstico favorable, exclusivo de pacientes en RC y duradero, y que su desaparición constituye el presagio de la recaída y posterior progresión serológica y clínica. El isotipo más común fue el IgG- κ , similar al ya referido en otros trabajos, y que probablemente sea el resultado de la ventaja selectiva de la población B normal tras una respuesta inmune robusta. Se observó una alternancia de isotipo durante el seguimiento hasta en un tercio de los pacientes, frente a más de 50% observada tras TPH.

De notable interés fue la observación de que los pacientes en los que la RC se había conseguido con regímenes que incluyen nuevos fármacos presentaron una frecuencia de bandas oligoclonales significativamente mayor que los que habían alcanzado la RC con quimioterapia convencional (60% frente a 11,1%). Los dos pacientes del segundo grupo habían sido tratados exclusivamente con ciclofosfamida y dexametasona. En el primer caso, las combinaciones incluían bortezomib solo, o bien asociado a dexametasona o a poliquimioterapia (M2/VBAD) y talidomida o lenalidomida con dexametasona. Con el tratamiento con melfalán y prednisona se producen menos del 5% de RC, lo que junto a la

baja incidencia de bandas oligoclonales, hacen de este fenómeno una rareza. Sin embargo, los nuevos regímenes tales como MPT (melfalán, prednisona y talidomida) (Palumbo *et al*, 2006; Facon *et al*, 2007), MPV (melfalán, prednisona y bortezomib) (San Miguel *et al*, 2008b), MPR (melfalán, prednisona y lenalidomida) (Palumbo *et al*, 2007), o lenalidomida con dexametasona (Lacy *et al*, 2007) dan lugar a una tasa de CR sin precedentes (15%, 30%, 24% y 24%, respectivamente). Con el uso progresivo de nuevos fármacos y nuevas asociaciones, es previsible que la tasa de RC y, en consecuencia la proporción de pacientes que presentan bandas oligoclonales, vaya en aumento. Dicho fenómeno cobra por tanto importancia en el seguimiento, valoración de respuesta y pronóstico de los pacientes en RC tras esquemas no mieloablativos. A este respecto, y pese al valor de la respuesta oligoclonal en pacientes tras TPH autólogo en términos de SG y SLE más prolongada (Zent *et al*, 1998), el impacto preciso de este fenómeno inmune tras tratamientos de inducción no ha sido establecido. La única observación ha sido un impacto favorable a corto plazo en el estudio BiRD en pacientes tratados con lenalidomida (Mark *et al*, 2008). Sin embargo, los beneficios a largo plazo aún no han sido referidos.

Por último, se exploró el impacto pronóstico de la proporción de células plasmáticas en médula ósea en el momento de alcanzar la RC (Fernández de Larrea *et al*, 2011b). En este caso, en 35 pacientes en RC tras TPH autólogo, el porcentaje de CP en médula ósea fue del 0,8%, con sólo 2 pacientes con más de 3% y ninguno con más de 5%. Estos resultados contrastan una publicación previa de la Clínica Mayo (Chee *et al*, 2009), en la cual hasta un 14% de los pacientes con inmunofijación negativa tenían más del 5% de CP en médula ósea, y por tanto no cumpliendo los criterios de RC de acuerdo con lo exigido por el EBMT (Bladé *et al*, 1998b). Esta discrepancia podría ser debida a diferencias metodológicas y poblacionales. En primer lugar, la población de la Clínica Mayo era heterogénea, con hasta un 45% de los pacientes en RC tras tratamiento no mieloablativo. El porcentaje de células plasmáticas tan extremadamente bajo en nuestra serie es

sorprendente, y probablemente está relacionado con las altas dosis de melfalán y su posible efecto sobre la célula madre mielomatosa. En segundo lugar, el análisis del grupo de la Clínica Mayo no se basó en una revisión sistemática por observadores independientes de un gran número de células. En nuestro caso, dos observadores evaluaron 1000 células, realizando una reevaluación en el caso de que existieran mínimas discrepancias. Finalmente, nuestra estimación fue basada exclusivamente en recuentos del aspirado medular, mientras que en la Clínica Mayo también consideraron la biopsia medular, lo cual podría haber subestimado el porcentaje en nuestro estudio por el efecto dilucional en el caso del aspirado.

En nuestro estudio, el número de células plasmáticas residuales en médula ósea mostró una correlación con la SLP, manteniéndose la significación estadística en un modelo multivariable. Para estimar un punto de corte adecuado, ya que el del 5% de los criterios del EBMT y de la Clínica Mayo no separaría nuestra población, se estimó una curva ROC (*“Receiver Operating Characteristic”*) para progresión o no de los pacientes, mostrando la misma que un número tan bajo como 1,5% de células plasmáticas podría ser el más adecuado. Así, la mediana hasta la progresión no se había alcanzado en los pacientes con porcentajes inferiores al 1,5% frente a 3 años en el grupo que lo superaba, siendo el riesgo relativo de 3,02. Tratando de explicar otros factores de confusión, no se encontraron diferencias entre el empleo de nuevos fármacos o no en la inducción previa al TPH autólogo. Con respecto a la SG, sólo pudimos demostrar una tendencia con respecto al porcentaje de células plasmáticas residuales. Esta relativa falta de influencia de la proporción de células plasmáticas en médula ósea se podría explicar por el pequeño número de pacientes, o bien por el efecto de los regímenes de rescate en el momento de la recaída post-trasplante. De hecho, nuestros resultados constituyen una confirmación de la observación del grupo de la Clínica Mayo (Chee *et al*, 2009), pero con un punto de corte muy inferior.

Diversos estudios moleculares llevados a cabo en pequeños grupos de pacientes muestran que la EMR se correlaciona el pronóstico a largo plazo tras el TPH (Sarasquete *et al*, 2005; Martinelli *et al*, 2000b; Ladetto *et al*, 2010). Adicionalmente, 4 estudios confirman que la EMR medida por citometría de flujo multiparamétrica es más sensible que la inmunofijación (San Miguel *et al*, 2002; Rawstron *et al*, 2002; Liu *et al*, 2008; Paiva *et al*, 2008). En el estudio de Paiva *et al*, en el que se incluye un considerable número de pacientes, la determinación de EMR por inmunofenotipo constituye el factor pronóstico más relevante. Se puede deducir, además, que en dicho estudio el porcentaje de células plasmáticas residuales por citometría (0,26%) es equivalente al 0,8% observado en nuestro estudio por microscopía óptica convencional. Ello se debe a la distribución de las células plasmáticas en las dos técnicas, con efecto de dilución en las muestras mayor para las muestras de citometría, representando alrededor de un tercio de la proporción observada en el recuento convencional (Paiva *et al*, 2009). Más aún, nuestros resultados en SLP y de SG con el punto de corte de 1,5% son muy cercanos a los observados cuando la enfermedad mínima residual se mide por citometría. Probablemente, pacientes con RC serológica y muy bajos porcentajes de CP en médula ósea por morfología se corresponden con los que tienen enfermedad mínima residual medida por otras técnicas. De hecho, los 8 pacientes en RC continua entre 9 y 16 años de seguimiento tras TPH autólogo, es decir, operativamente “curados” (Barlogie *et al*, 2006b; Rovira *et al*, 2009) se hallan en el grupo de menos de 1,5%, mientras todos los pacientes en el grupo de más de 1,5% habían recaído dentro de los primeros 9 años de seguimiento. Este hallazgo de ningún modo indica que los estudios por inmunofenotipo y por biología molecular dejen de representar un gran avance en el conocimiento de la profundidad de la RC. Sin embargo, el examen de la médula ósea por microscopía óptica en pacientes en RC tras TPH autólogo constituye una herramienta sencilla, barata y rápida, y debería considerarse como el primer paso para la estimación de la masa tumoral residual en pacientes con inmunofijación negativa.

VI. CONCLUSIONES

1. La presencia de bandas oligoclonales en pacientes con MM en remisión completa tras TPH autólogo se correlaciona con un cociente anómalo de cadenas ligeras libres.
2. Dado el significado favorable atribuido a la presencia de esta respuesta inmune oligoclonal, el valor pronóstico real de la definición de RC estricta es al menos cuestionable.
3. Dichas bandas oligoclonales se presentan también en pacientes con MM en RC tras tratamiento de inducción no mieloablativo, siendo mucho mayor su prevalencia cuando se emplean nuevos fármacos en comparación con los regímenes que solo incluyen fármacos citotóxicos convencionales.
4. La evaluación morfológica de la médula ósea sigue siendo un requisito indispensable en pacientes con remisión completa serológica. La proporción de células plasmáticas en el aspirado medular, pese a ser muy bajo (mediana de 0,8%), constituye una primera aproximación al valor de enfermedad mínima residual, conllevando un significado pronóstico en cuanto al tiempo a la progresión de la enfermedad tras el TPH autólogo.

VII. BIBLIOGRAFIA

Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ Jr, Wilson HE. Treatment for multiple myeloma: combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 1969; 208: 1680-1685.

Alexanian R, Dimopoulos MA, Hester J, Delasalle K, Champlin R. Early myeloablative therapy for multiple myeloma. *Blood* 1994; 84: 4278-4282.

Alexanian R, Weber D, Giralt S, Dimopoulos M, Delasalle K, Smith T, Champlin R. Impact of complete remission with intensive therapy in patients with responsive multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1037-1043.

Alexanian R, Weber D, Giralt S, Delasalle K. Consolidation therapy of multiple myeloma with thalidomide-dexamethasone after intensive chemotherapy. *Ann Oncol* 2002; 13: 1116-1119.

Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, Spencer JA, Kimlinger T, Ghobrial JM, Jia X, Lu G, Timm M, Kumar A, Côté D, Veilleux I, Hedin KE, Roodman GD, Witzig TE, Kung AL, Hideshima T, Anderson KC, Lin CP, Ghobrial IM. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 2007; 109: 2708-2717.

Alyea E, Weller E, Schlossman R, Canning C, Mauch P, Ng A, Fisher D, Gribben J, Freeman A, Parikh B, Richardson P, Soiffer R, Ritz J, Anderson KC. Outcome after autologous and allogeneic stem cell transplantation for patients with multiple myeloma: impact of graft-versus-myeloma effect. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32:1145-1151.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 1996; 335: 91-97.

Attal M, Harousseau JL, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet JG, Monconduit M, Hulin C, Caillot D, Bouabdallah R, Voillat L, Sotto JJ, Grosbois B, Bataille R. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 349: 2495-2502.

Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, Doyen C, Hulin C, Benboubker L, Yakoub Agha I, Bourhis JH, Garderet L, Pegourie B, Dumontet C, Renaud M, Voillat L, Berthou C, Marit G, Monconduit M, Caillot D, Grobois B, Avet-Loiseau H, Moreau P, Facon T. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006; 108: 3289-3294.

Attal M, Cristini C, Marit G, Caillot D, Facon T, Hulin C, Moreau P, Mathiot P, Avet-Loiseau H, Harousseau JL. Lenalidomide maintenance after transplantation for myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: Abstract 8018.

Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 625-635.

Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, Attal M, Marit G, Mathiot C, Facon T, Moreau P, Anderson KC, Champion L, Munshi NC, Minvielle S. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4585-4590.

Avet-Loiseau H, Malard F, Champion L, Magrangeas F, Sebban C, Lioure B, Decaux O, Lamy T, Legros L, Fuzibet JG, Michallet M, Corront B, Lenain P, Hulin C, Mathiot C, Attal M, Facon T, Harousseau JL, Minvielle S, Moreau P. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood* 2010 Oct 20. [Epub ahead of print]

Barlogie B, Smith L, Alexanian R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med* 1984; 310: 1353-1356.

Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, McCoy J, Moore DF Jr, Dakhil SR, Lanier KS, Chapman RA, Cromer JN, Salmon SE, Durie B, Crowley JC. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol* 2006a; 24: 929-936.

Barlogie B, Tricot GJ, van Rhee F, Angtuaco E, Walker R, Epstein J, Shaughnessy JD, Jagannath S, Bolejack V, Gurley J, Hoering A, Vesole D, Desikan R, Siegel D, Mehta

J, Singhal S, Munshi NC, Dhodapkar M, Jenkins B, Attal M, Harousseau JL, Crowley J. Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2006b; 135: 158-164.

Barlogie B, Anaissie E, van Rhee F, Haessler J, Hollmig K, Pineda-Roman M, Cottler-Fox M, Mohiuddin A, Alsayed Y, Tricot G, Bolejack V, Zangari M, Epstein J, Petty N, Steward D, Jenkins B, Gurley J, Sullivan E, Crowley J, Shaughnessy JD Jr. Incorporating bortezomib into upfront treatment in multiple myeloma: early results of total therapy 3. *Br J Haematol* 2007; 138: 176-185.

Barlogie B, Anaissie E, Haessler J, van Rhee F, Pineda-Roman M, Hollmig K, Alsayed Y, Epstein J, Shaughnessy JD Jr, Crowley J. Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma. *Cancer* 2008; 113: 355-359.

Baz R, Alemany C, Green R, Hussein MA. Prevalence of vitamin B12 deficiency in patients with plasma cell dyscrasias: a retrospective review. *Cancer* 2004; 101: 790-795.

Bensinger W. Stem-cell transplantation for multiple myeloma in the era of novel drugs. *J Clin Oncol* 2008; 26:480-492.

Berenson JR, Crowley JJ, Grogan TM, Zangmeister J, Briggs AD, Mills GM, Barlogie B, Salmon SE. Maintenance therapy with alternate-day prednisone improves survival in multiple myeloma patients. *Blood* 2002; 99: 3163-3168.

Bergsagel DE, Sprague CC, Austin C, Griffith KM. Evaluation of new chemotherapeutic agents in the treatment of multiple myeloma. IV. L-phenylamine mustard (NSC-8806). *Cancer Chemotherapy Reports* 1962; 21: 87.

Bergsagel PL, Kuehl WM. The molecular biology of multiple myeloma. In: *Myeloma: Biology and Management*. 3rd ed. Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA, Anderson KC, Eds. Saunders, Philadelphia 2004; pp:35-58.

Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenetic event in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106: 296-303.

Bladé J, Rozman C, Montserrat E, Cervantes F, Feliu E, Grañena A, Marín P, Nomdedeu B. Treatment of resistant multiple myeloma with vincristine, BCNU, doxorubicin and prednisone (VBAP). *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1193-1197.

Bladé J, San Miguel J, Sanz-Sanz MA, Alcalá A, Hernández JM, Martínez M, García-Conde J, Moro J, Ortega F, Fontanillas M. Treatment of melphalan-resistant multiple myeloma with vincristine; BCNU, doxorubicin, and high-dose dexamethasone (VBAD). *Eur J Cancer* 1992; 29A: 57-60.

Bladé J, San Miguel JF, Alcalá A, Maldonado J, Sanz MA, García-Conde J, Moro MJ, Alonso C, Besalduch J, Zubizarreta A. Alternating combination VCMP/VBAP chemotherapy versus melphalan/prednisone in the treatment of multiple myeloma: a randomized multicentric study of 487 patients. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1165-1171.

Bladé J, Lust JA, Kyle RA. IgD multiple myeloma: presenting features, response to therapy and survival in a series de 53 patients. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2398-2404.

Bladé J. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol* 1996a; 93: 345-351.

Bladé J, Kyle RA, Greipp PR. Multiple myeloma in patients younger than 40 years. Report of 10 cases and review of the literature. *Arch Intern Med* 1996b; 156: 1463-1468.

Bladé J, Fernández-Llama P, Bosch F, Montolíu J, Lens XM, Montoto S, Cases A, Darnell A, Rozman C, Montserrat E. Renal failure in multiple myeloma. Presenting features and predictors of outcome in 94 patients from a single institution. *Arch Intern Med* 1998a; 158:1889-1893.

Bladé J, Samson D, Reece D, Apperley J, Björkstrand B, Gahrton G, Gertz M, Giralt S, Jagannath S, Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high dose therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1998b; 102: 1115-1123.

Bladé J, Esteve J, Rives S, Martínez C, Rovira M, Urbano-Ispizua A, Marin P, Carreras E, Montserrat E. High-dose therapy autotransplantation / intensification vs continued standard chemotherapy in multiple myeloma in first remission. Results of a non-randomized study from a single institution. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 845-849.

Bladé J, San Miguel JF, Fontanillas M, Esteve J, Maldonado J, Alcalá A, Brunet S, García-Conde J, Besalduch J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Conde E, Font L, Gardella S, Carnero M, Carbonell F, Martí JM, Hernández-Martín J, Ortega F, Besses C, Ribera JM, Trujillo J, Escudero ML, Rozman C, Estapé J, Montserrat E. Increased conventional chemotherapy does not improve survival in multiple myeloma: long-term results of two PETHEMA trials including 914 patients. *Hematol J* 2001a; 2: 272-278.

Bladé J, Perales M, Rosiñol L, Tuset M, Montoto S, Esteve J, Cobo F, Villela L, Rafel M, Nomdedeu B, Montserrat E. Thalidomide in multiple myeloma: lack of response of soft-tissue plasmacytomas. *Br J Haematol* 2001b; 113: 422-424.

Bladé J, Rosiñol L, Sureda A, Ribera JM, Díaz-Mediavilla J, García-Laraña J, Mateos MV, Palomera L, Fernández-Calvo J, Martí JM, Giraldo P, Carbonell F, Callís M, Trujillo J, Gardella S, Moro MJ, Barez A, Soler A, Font L, Fontanillas M, San Miguel J. High-dose therapy intensification versus continued standard chemotherapy in multiple myeloma: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish Cooperative Group PETHEMA. *Blood* 2005; 106: 3755-3759.

Bladé J. Clinical practice. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 355: 2765-2770.

Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, Fernández de Larrea C. Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2008a; 22:1651-1657.

Bladé J, Rosiñol L. Advances in therapy of multiple myeloma. *Curr Opin Oncol* 2008b; 20: 697-704.

Bladé J, Cibeira MT, Fernández de Larrea C, Rosiñol L. Multiple myeloma. *Ann Oncol*. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii313-vii319.

Bladé J, Dimopoulos M, Rosiñol L, Rajkumar SV, Kyle RA. Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations. *J Clin Oncol* 2010a; 28: 690-697.

Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, Rovira M, Carreras E. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 2010b; 115: 3655-3663.

Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003; 361: 489-491.

Brener H, Gondos A, Pulte D. Recent major improvement in long-term survival in younger patients with multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 2521-2556.

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.

Bruno B, Rotta M, Patriarca F, Mordini N, Allione B, Carnevale-Schianca F, Giaccone L, Sorasio R, Omedè P, Baldi I, Bringhen S, Massaia M, Aglietta M, Levis A, Gallamini A, Fanin R, Palumbo A, Storb R, Ciccone G, Boccadoro M. A comparison of allografting with autografting in newly diagnosed myeloma. *N Engl J Med* 2007; 356: 1110-1120.

Bruno B, Rotta M, Patriarca F, Mattei D, Allione B, Carnevale-Schianca F, Sorasio R, Rambaldi A, Casini M, Parma M, Bavaro P, Onida F, Busca A, Castagna L, Benedetti E, Iori AP, Giaccone L, Palumbo A, Corradini P, Fanin R, Maloney D, Storb R, Baldi I, Ricardi U, Boccadoro M. Nonmyeloablative allografting for newly diagnosed multiple myeloma: the experience of the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo. *Blood* 2009; 113: 3375-3382.

Callander NS, Roodman GD. Myeloma bone disease. *Semin Hematol* 2001; 38: 276-285.

Cavo M, Zamagni E, Tosi P, Tacchetti P, Cellini C, Cangini D, de Vivo A, Testoni N, Nicci C, Terragna C, Grafone T, Perrone G, Ceccolini M, Tura S, Baccarani M.

Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2006; 108: 35-39.

Cavo M, Tosi P, Zamagni E, Cellini C, Tacchetti P, Patriarca F, Di Raimondo F, Volpe E, Ronconi S, Cangini D, Narni F, Carubelli A, Masini L, Catalano L, Fiacchini M, de Vivo A, Gozzetti A, Lazzaro A, Tura S, Baccarani M.. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2434-2441.

Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, Petrucci MT, Pantani L, Galli M, Di Raimondo F, Crippa C, Zamagni E, Palumbo A, Offidani M, Corradini P, Narni F, Spadano A, Pescosta N, Deliliers GL, Ledda A, Cellini C, Caravita T, Tosi P, Baccarani M; GIMEMA Italian Myeloma Network. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet* 2010; 376: 2075-2085.

Chee CE, Kumar S, Larson DR, Kyle RA, Dispenzieri A, Gertz MA, Colby CL, Rajkumar SV. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood* 2009; 114: 2617-2618.

Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ. High dose therapy with haematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma: The MRC Myeloma VII randomized study. *N Engl J Med* 2003; 348:1875-1883.

Chronic Leukemia--Myeloma Task Force, National Cancer Institute. Proposed guidelines for protocol studies. II. Plasma cell myeloma. *Cancer Chemother Rep* 3 1968; 1: 17-39.

Cibeira MT, Rosiñol L, Ramiro L, Esteve J, Torrebadell M, Bladé J. Long-term results of thalidomide in refractory and relapsed multiple myeloma with emphasis on response duration. *Eur J Haematol* 2006; 77: 486-492.

Cibeira MT, Rozman M, Segarra M, Lozano E, Rosiñol L, Cid MC, Filella X, Bladé J. Bone marrow angiogenesis and angiogenic factors in multiple myeloma treated with novel agents. *Cytokine* 2008; 41:244-253.

Cook G, Dumbar M, Franklin IM. The role of adhesion molecules in multiple myeloma. *Acta Haematol* 1997; 97:81-89.

Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo A, Van Lint MT, Bacigalupo A, Santoro A, Musso M, Majolino I, Boccadoro M, Pileri A. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol* 1999; 17: 208-215.

Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, Martinelli G, Terragna C, Majolino I, Valagussa P, Boccadoro M, Samson D, Bacigalupo A, Russell N, Montefusco V, Voena C, Gahrton G. Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 1927-1929.

Costes V, Portier M, Lu ZY, Rossi JF, Bataille R, Klein B. Interleukin-1 in multiple myeloma: producer cells and their role in the control of IL-6 production. *Br J Haematol* 1998; 103: 1152-1160.

Crawley C, Lalancette M, Szydlo R, Gilleece M, Peggs K, Mackinnon S, Juliusson G, Ahlberg L, Nagler A, Shimoni A, Sureda A, Boiron JM, Einsele H, Chopra R, Carella A, Cavenagh J, Gratwohl A, Garban F, Zander A, Björkstrand B, Niederwieser D, Gahrton G, Apperley JF. Outcomes of reduced-intensity allogeneic transplantation for multiple myeloma: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. *Blood* 2005; 105: 4532-4539.

Crawley C, Lacobelli S, Björkstrand, Apperley JF, Niederwieser D, Gahrton G. Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning. *Blood* 2007; 109: 3588-3594.

Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95: 2630-2636.

Davies FE, Dring AM, Li C, Rawstron AC, Shamma MA, O'Connor SM, Fenton JA, Hideshima T, Chauhan D, Tai IT, Robinson E, Auclair D, Rees K, Gonzalez D, Ashcroft AJ, Dasgupta R, Mitsiades C, Mitsiades N, Chen LB, Wong WH, Munshi NC, Morgan GJ, Anderson KC. Insights on the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood* 2003; 102: 4504-4511.

de la Rubia J, Bladé J, Lahuerta JJ, Ribera JM, Martínez R, Alegre A, García-Laraña J, Fernández P, Sureda A, de Arriba F, Carrera D, Besalduch J, García Boyero R, Palomera Bernal L, Hernández MT, García PR, Pérez-Calvo J, Alcalá A, Casado LF, San Miguel J. Effect of chemotherapy with alkylating agents on the yield of CD34+ cells in patients with multiple myeloma. Results of the Spanish Myeloma Group (GEM) Study. *Haematologica* 2006; 91: 621-627.

de Tute RM, Jack AS, Child JA, Morgan GJ, Owen RG, Rawstron AC. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia* 2007; 21: 2046-2049.

Devesa SS. Descriptive epidemiology of multiple myeloma. In: Obrams GI, Poter M, editors. *Epidemiology and Biology of Multiple Myeloma*. Berlin: Springer Verlag, 1991: pp:3-12.

Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, Prince HM, Harousseau JL, Dmoszynska A, San Miguel J, Hellmann A, Facon T, Foà R, Corso A, Masliak Z, Olesnyckyj M, Yu Z, Patin J, Zeldis JB, Knight RD. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; 357: 2123-2132.

Dingli D, Kyle RA, Rajkumar SV, Nowakowski GS, Larson DR, Bida JP, Gertz MA, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Dispenzieri A, Katzmann JA. Immunoglobulin free light chains and solitary plasmacytoma of bone. *Blood* 2006; 108: 1979-1983.

Dingli D, Pacheco JM, Dispenzieri A, Hayman SR, Kumar SK, Lacy MQ, Gastineau DA, Gertz MA. Serum M-spike and transplant outcome in patients with multiple myeloma. *Cancer Sci* 2007; 98: 1035-1040.

Dispenzieri A, Lacy MQ, Katzmann JA, Rajkumar SV, Abraham RS, Hayman SR, Kumar SK, Clark R, Kyle RA, Litzow MR, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IM, Porrata LF, Elliott MA, Johnston PB, Greipp PR, Witzig TE, Zeldenrust SR, Russell SJ, Gastineau D, Gertz MA. Absolute values of immunoglobulin free light chains are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107: 3378-3383.

Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, Clark RJ, Melton LJ 3rd, Gertz MA, Kumar SK, Fonseca R, Jelinek DF, Rajkumar SV. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 785-789.

Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Einsele H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BG. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23: 215-224.

Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36: 842-854.

Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, Ludwig H, Gahrton G, Beksac M, Crowley J, Belch A, Boccadoro M, Cavo M, Turesson I, Joshua D, Vesole D, Kyle R, Alexanian R, Tricot G, Attal M, Merlini G, Powles R, Richardson P, Shimizu K, Tosi P, Morgan G,

Rajkumar SV. International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20:1467-1473.

Eriksson M. Rheumatoid arthritis as a risk factor for multiple myeloma: a case-control study. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 259-263.

Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, Renaud M, Harousseau JL, Guillemin G, Chateaux C, Dab O, Voillat L, Maisonneuve H, Troncy J, Dorvaux V, Monconduit M, Martin C, Casassus P, Jaubert J, Jardel H, Doyen C, Kolb B, Anglaret B, Grosbois B, Yakoub-Agha I, Mathiot C, Avet-Loiseau H. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 2007; 370: 1209-1218.

Ferland JP, Ravaud P, Chevret S, Divine M, Leblond V, Belanger C, Macro M, Pertuiset E, Dreyfus F, Mariette X, Boccacio C, Brouet JC. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998; 92: 3131-3136.

Ferland JP, Katsahian S, Divine M, Leblond V, Dreyfus F, Macro M, Arnulf B, Royer B, Mariette X, Pertuiset E, Belanger C, Janvier M, Chevret S, Brouet JC, Ravaud P. High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Myelome-Autogreffe. *J Clin Oncol* 2005a; 23: 9227-9233.

Ferland JP. High-dose therapy supported with autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma: long-term follow-up of prospective studies of the MAG group. *Haematologica* 2005b; 90: Abstract 40.

Fernández de Larrea C, Cibeira MT, Elena M, Arostegui JI, Rosiñol L, Rovira M, Filella X, Yagüe J, Bladé J. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood* 2009; 114: 4954-4956.

Fernández de Larrea C, Tovar N, Cibeira MT, Aróstegui JI, Rosiñol L, Elena M, Filella X, Yagüe J, Bladé J. Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. *Haematologica* 2011a; 96: 171-173.

Fernández de Larrea C, Tovar N, Rozman M, Rosiñol L, Aróstegui JI, Cibeira MT, Rovira M, Yagüe J, Bladé J. Multiple Myeloma in Serologic Complete Remission after Autologous Stem Cell Transplantation: Impact of Bone Marrow Plasma Cell Assessment by Conventional Morphology on Disease Progression. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011b Jan 6. [Epub ahead of print]

Fonseca R. Cytogenetics in multiple myeloma. In: *Myeloma: Biology and Management*. 3rd ed. Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA, Anderson KC, Eds. Saunders, Philadelphia 2004; pp:67-81.

Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009; 23: 2210-2221.

Gahrton G, Svensson H, Cavo M, Apperly J, Bacigalupo A, Björkstrand B, Bladé J, Cornelissen J, de Laurenzi A, Facon T, Ljungman P, Michallet M, Niederwieser D, Powles R, Reiffers J, Russell NH, Samson D, Schaefer UW, Schattenberg A, Tura S, Verdonck LF, Vernant JP, Willemze R, Volin L. Progress in allogenic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983-93 and 1994-98 at EBMT centres. *Br J Haematol* 2001; 113: 209-216.

Garban F, Attal M, Michallet M, Hulin C, Bourhis JH, Yakoub-Agha I, Lamy T, Marit G, Maloisel F, Berthou C, Dib M, Caillot D, Deprijck B, Ketterer N, Harousseau JL, Sotto JJ, Moreau P. Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma. *Blood* 2006; 107: 3474-3480.

Gay F, Larocca A, Wijermans P, Cavallo F, Rossi D, Schaafsma R, Genuardi M, Romano A, Liberati AM, Siniscalchi A, Petrucci MT, Nozzoli C, Patriarca F, Offidani M,

Ria R, Omedè P, Bruno B, Passera R, Musto P, Boccadoro M, Sonneveld P, Palumbo A. Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood* 2011; 117: 3025-3031.

Gerritsen EJA, Van Tol MJD, Lankester AC, van der Weijden-Ragas CPM, Jol-van der Zijde CM, Ouderman-Gruber NJ, Radl J, Vossen JM. Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation. *Blood* 1993; 82: 3493-3502.

González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, van Dongen JJ, San Miguel JF, Morgan GJ. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2007; 110: 3112-3121.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3412-3420.

Guikema JE, Vellenga E, Veeneman JM, Hovenga S, Bakkus MH, Klip H, Bos NA. Multiple myeloma related cells in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1999; 104: 748-754.

Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic implications. *Leukemia* 2001; 15: 1950-1961.

Gutiérrez NC, Castellanos MV, Martín ML, Mateos MV, Hernández JM, Fernández M, Carrera D, Rosiñol L, Ribera JM, Ojanguren JM, Palomera L, Gardella S, Escoda L, Hernández-Boluda JC, Bello JL, de la Rubia J, Lahuerta JJ, San Miguel JF. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2007; 21: 143-150.

Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona FV, Fermiñán E, Martín-Jiménez P, Chillón C, Risueño A, Hernández JM, García-Sanz R, González M, San Miguel JF. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 2010; 24: 629-637.

Hall SL, Tate J, Gill D, Mollee P. Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 113-118.

Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91: 3-21.

Han JH, Choi SJ, Kurihara N, Koide M, Oba Y, Roodman GD. Macrophage inflammatory protein-1 α is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor κ B ligand. *Blood* 2001; 97: 3349-3353.

Harding S, Provot F, Beuscart JB, Cook M, Bradwell AR, Stringer S, White D, Cockwell P, Hutchison CA. Aggregated serum free light chains may prevent adequate removal by high cut-off haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 1438.

Harousseau JL, Attal M, Leleu X, Troncy J, Pegourie B, Stoppa AM, Hulin C, Benboubker L, Fuzibet JG, Renaud M, Moreau P, Avet-Loiseau H. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 2006; 91: 1498-1505.

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

Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H, Marit G, Caillot D, Mohty M, Lenain P, Hulin C, Facon T, Casassus P, Michallet M, Maisonneuve H, Benboubker L, Maloisel F, Petillon MO, Webb I, Mathiot C, Moreau P. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4621-4629.

Herrington LJ, Weiss NS, Olshan AF. Epidemiology of myeloma. In: Myeloma: Biology and Management. 3rd ed. Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA, Anderson KC, Eds. Saunders, Philadelphia 2004; pp:117-157.

Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Podar K, Akiyama M, Gupta D, Richardson P, Munshi N, Anderson KC. The biological sequelae of stromal cell- derived factor-1alpha in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 539-544.

Hoering A, Crowley J, Shaughnessy JD Jr, Hollmig K, Alsayed Y, Szymonifka J, Waheed S, Nair B, van Rhee F, Anaissie E, Barlogie B. Complete remission in multiple myeloma examined as time-dependent variable in terms of both onset and duration in Total Therapy protocols. *Blood* 2009; 114: 1299-1305.

Hovenga S, de Wolf JT, Guikema JE, Klip H, Smit JW, Smit Sibinga CT, Bos NA, Vellenga E. Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma after VAD and EDAP courses: a high incidence of oligoclonal serum Igs post transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 723-728.

Hulin C, Facon T, Rodon P, Pegourie B, Benboubker L, Doyen C, Dib M, Guillerme G, Salles B, Eschard JP, Lenain P, Casassus P, Azaïs I, Decaux O, Garderet L, Mathiot C, Fontan J, Lafon I, Virion JM, Moreau P. Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3664-3670.

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.

International Myeloma Working Group. 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.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249.

Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, Larson DR, Snyder MR, Lust JA, Rajkumar SV, Dispenzieri A. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009; 55: 1517-1522.

Koreth J, Cutler CS, Djulbegovic B, Behl R, Schlossman RL, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC, Soiffer RJ, Alyea EP 3rd. High-dose therapy with single autologous transplantation versus chemotherapy for newly diagnosed multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 183-196.

Kröger N, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Sayer HG, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Tögel F, Wittkowsky G, Kuse R, Zander AR. Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood* 2002a; 100: 755-760.

Kröger N, Sayer HG, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Nagler A, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Ayuk F, Wittkowsky G, Schmitz N, Zander AR. Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood* 2002b; 100: 3919-3924.

Kröger N, Asenova S, Gerritzen A, Bacher U, Zander A. Questionable role of free light chain assay ratio to determine stringent complete remission in multiple myeloma patients. *Blood* 2010; 115: 3413-3414.

Kumar A, Kharfan-Dabaja MA, Glasmacher A, Djulbegovic B. Tandem versus single autologous hematopoietic cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 100-106.

Kumar S, Witzig TE, Greipp PR, Rajkumar SV. Bone marrow angiogenesis and circulating plasma cells in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003; 122: 272-274.

Kumar S, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Wellik LA, Fonseca R, Lust JA, Witzig TE, Kyle RA, Greipp PR, Rajkumar SV. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 235-239.

Kumar S, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008a; 111: 2516-2520.

Kumar S, Dispenzieri A, Larson D, Colby C, Kyle R, Gertz M, and Rajkumar SV. Normalization of the serum free light chain (FLC) ratio is associated with superior overall survival among myeloma patients achieving immunofixation negative state: results support incorporation of serum FLC ratio in stringent CR definition. *Blood* 2008b; 112: Abstract 1692.

Kumar S, Dispenzieri A, Katzmann JA, Larson DR, Colby CL, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Leung N, Zeldenrust SR, Ramirez-Alvarado M, Clark RJ, Kyle RA, Rajkumar SV, Gertz MA. Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features. *Blood* 2010a; 116: 5126-5129.

Kumar S, Zhang L, Dispenzieri A, Van Wier S, Katzmann JA, Snyder M, Blood E, DeGoey R, Henderson K, Kyle RA, Bradwell AR, Greipp PR, Rajkumar SV, Fonseca R. Relationship between elevated immunoglobulin free light chain and the presence of IgH translocations in multiple myeloma. *Leukemia* 2010b; 24: 1498-1505.

Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 21-33.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer* 2004; 101: 2667-2674.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, Dispenzieri A, Katzmann JA, Melton LJ 3rd. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354: 1362-1369.

Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 2962-2972.

Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N, Sachanas S, Tzenou T, Papadogiannis A, Galanis Z, Kalpadakis C, Dimou M, Kyriakou E, Angelopoulou MK, Dimopoulou MN, Siakantaris MP, Dimitriadou EM, Kokoris SI, Panayiotidis P, Pangalis GA. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007; 137: 240-243.

Lacy MQ, Donovan KA, Heimbach JK, Ahman GJ, Lust JA. Comparison of interleukin-1-beta expression by in situ hybridization in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Blood* 1999; 93: 300-305.

Lacy MQ, Gertz MA, Dispenzieri A, Hayman SR, Geyer S, Kabat B, Zeldenrust SR, Kumar S, Greipp PR, Fonseca R, Lust JA, Russell SJ, Kyle RA, Witzig TE, Bergsagel PL, Stewart AK, Rajkumar SV. Long-term results of response to therapy, time to progression, and survival with lenalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed myeloma. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 1179-1184.

Ladetto M, Donovan JW, Harig S, Trojan A, Poor C, Schlossnan R, Anderson KC, Gribben JG. 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.

Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L, Crippa C, De Rosa L, Pregno P, Grasso M, Liberati AM, Caravita T, Pisani F, Guglielmelli T, Callea V, Musto P, Cangialosi C, Passera R, Boccadoro M, Palumbo A. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2077-2784.

Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, Rosiñol L, Sureda A, de la Rubia J, García-Laraña J, Martínez-Martínez R, Hernández-García MT, Carrera D, Besalduch J, de Arriba F, Ribera JM, Escoda L, Hernández-Ruiz B, García-Frade J, Rivas-González C, Alegre A, Bladé J, San Miguel JF. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5775-5782.

Landgren O, Gridley G, Turesson I, Caporaso NE, Goldin LR, Baris D, Fears TR, Hoover RN, Linet MS. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* 2006a; 107: 904-906.

Landgren O, Linet MS, McMaster ML, Gridley G, Hemminki K, Goldin LR. Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer* 2006b; 118: 3095-3098.

Landgren O, Zhang Y, Zahm SH, Inskip P, Zheng T, Baris D. Risk of multiple myeloma following medication use and medical conditions: a case-control study in Connecticut women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006c; 15: 2342-2347.

Landgren O, Katzmann JA, Hsing AW, Pfeiffer RM, Kyle RA, Yeboah ED, Biritwum RB, Tettey Y, Adjei AA, Larson DR, Dispenzieri A, Melton LJ 3rd, Goldin LR, McMaster ML, Caporaso NE, Rajkumar SV. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance among men in Ghana. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 1468-1473.

Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009a; 113: 5412-5417.

Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, Beane Freeman LE, Cerhan JR, Katzmann JA, Rajkumar SV, Alavanja MC. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood* 2009b; 113: 6386-6391.

Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR, Caporaso NE, Blimark C, Mellqvist UH, Wahlin A, Bjorkholm M, Turesson I. Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders among 14621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. *Blood* 2009c; 114: 791-795.

Landgren O, Rajkumar SV, Pfeiffer RM, Kyle RA, Katzmann JA, Dispenzieri A, Cai Q, Goldin LR, Caporaso NE, Fraumeni JF, Blot WJ, Signorello LB. Obesity is associated with an increased risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance among black and white women. *Blood* 2010; 116: 1056-1059.

Leleu XP, Xie W, Bagshaw M, Banwait R, Leduc R, Roper N, Weller E, Ghobrial IM. The Role of Serum Immunoglobulin Free Light Chain (sFLC) in response and progression in Waldenstrom Macroglobulinemia (WM). *Clin Cancer Res* 2011 Mar 17. [Epub ahead of print]

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379.

Liu H, Yuan C, Heinerich J, Braylan R, Chang M, Wingard J, Moreb J. 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.

Lodé L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wuillème S, Richebourg S, Magrangeas F, Ifrah N, Champion L, Traullé C, Guilhot F, Caillot D, Marit G, Mathiot C, Facon T, Attal M, Harousseau JL, Moreau P, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* 2010; 95: 1973-1976.

Lokhorst HM, Segeren CM, Verdonck LF, van der Holt B, Raymakers R, van Oers MH, Barge RM, Schouten HC, Westveer PH, Steijaert MM, Cornelissen JJ, Sonneveld P. Partially T-cell-depleted allogeneic stem-cell transplantation for first-line treatment of multiple myeloma: a prospective evaluation of patients treated in the phase III study HOVON 24 MM. *J Clin Oncol* 2003; 21:1728-1733.

Lokhorst HM, Schmidt-Wolf I, Sonneveld P, van der Holt B, Martin H, Barge R, Bertsch U, Schlenzka J, Bos GM, Croockewit S, Zweegman S, Breitzkreutz I, Joosten P, Scheid C, van Marwijk-Kooy M, Salwender HJ, van Oers MH, Schaafsma R, Naumann R, Sinnige H, Blau I, Delforge M, de Weerd O, Wijermans P, Wittebol S, Duersen U, Vellenga E, Goldschmidt H. Thalidomide in induction treatment increases the very good partial response rate before and after high-dose therapy in previously untreated multiple myeloma. *Haematologica* 2008; 93:124-127.

Loth TS, Perrotta AL, Lima J, Whiteaker RS, Robinson A. Genetic aspects of familial multiple myeloma. *Mil Med* 1991; 156: 430-433.

Ludwig H, Hajek R, Tóthová E, Drach J, Adam Z, Labar B, Egyed M, Spicka I, Gisslinger H, Greil R, Kuhn I, Zojer N, Hinke A. Thalidomide-dexamethasone compared to melphalan-prednisolone in elderly patients with multiple myeloma. *Blood* 2009; 113: 3435-3442.

Ludwig H, Bolejack V, Crowley J, Bladé J, Miguel JS, Kyle RA, Rajkumar SV, Shimizu K, Turesson I, Westin J, Sonneveld P, Cavo M, Boccadoro M, Palumbo A, Tosi P, Harousseau JL, Attal M, Barlogie B, Stewart AK, Durie B. Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1599-1605.

McCarthy PL, Owzar K, Anderson KC, Hofmeister CC, Hassoun H, Hurd DD, Stadtmauer EA, Giralt S, Hars V, Linker CA. Phase III intergroup study of lenalidomide versus placebo maintenance therapy following single autologous stem cell transplant (ASCT) for multiple myeloma (MM):CALGB 100104. *J Clin Oncol* 2010; 28: Abstract 8017.

Mailankody S, Mena E, Yuan CM, Balakumaran A, Kuehl WM, Landgren O. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 2159-2170.

Maisnar V, Tichý M, Smolej L, Zák P, Radocha J, Palicka V, Malý J, Bláha V. Isotype class switching after transplantation in multiple myeloma. *Neoplasma* 2007; 54: 225-228.

Mark T, Jayabalan D, Coleman M, Pearse RN, Wang YL, Lent R, Christos PJ, Lee JW, Agrawal YP, Matthew S, Ely S, Mazumdar M, Cesarman E, Leonard JP, Furman RR, Chen-Kiang S, Niesvizky R. Atypical serum immunofixation patterns frequently emerge in immunomodulatory therapy and are associated with a high degree of response in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2008; 143: 654-660.

Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, Ronconi S, Tosi P, Lemoli RM, Bandini G, Motta MR, Testoni N, Amabile M, Ottaviani E, Vianelli N, de Vivo A, Gozzetti A, Tura S, Cavo M. Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2000a; 18: 2273-2281.

Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, Ronconi S, Tosi P, Lemoli R, Bandini G, Testoni N, Amabile M, Ottaviani E, Buonamici S, Soverini S, Montefusco V, de Vivo A, Bonifazi F, Tura S, Cavo M. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2000b; 8: 930-934.

Mass RE. A comparison of the effect of prednisone and a placebo in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Chemother Rep* 1962; 16: 257-259.

Mateos MV, García-Sanz R, López-Pérez R, Moro MJ, Ocio E, Hernández J, Megido M, Caballero MD, Fernández-Calvo J, Báñez A, Almeida J, Orfao A, González M, San Miguel JF. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple

myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol* 2002; 118: 1034-1040.

Mateos MV, Oriol A, Martínez-López J, Gutiérrez N, Teruel AI, de Paz R, García-Laraña J, Bengoechea E, Martín A, Mediavilla JD, Palomera L, de Arriba F, González Y, Hernández JM, Sureda A, Bello JL, Bargay J, Peñalver FJ, Ribera JM, Martín-Mateos ML, García-Sanz R, Cibeira MT, Ramos ML, Vidriales MB, Paiva B, Montalbán MA, Lahuerta JJ, Bladé J, San Miguel JF. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomized trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 934-941.

Mellqvist UH, Lenhoff S, Johnsen HE, Hjorth M, Holmberg E, Juliusson G, Tangen JM, Westin J. Cyclophosphamide plus dexamethasone is an efficient initial treatment before high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of a randomized comparison with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone. *Cancer* 2008; 112: 129-135.

Michigami T, Shimizu N, Williams PJ, Niewolna M, Dallas SL, Mundy GR, Yoneda T. Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and $\alpha(4)\beta(1)$ -integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood* 2000; 96: 1953-1960.

Mihelic R, Kaufman JL, Lonial S. Maintenance therapy in multiple myeloma. *Leukemia* 2007; 21:1150-1157.

Mitus AJ, Stein R, Rappaport JM, Antin JH, Weinstein HJ, Alper CA, Smith BR. Monoclonal and oligoclonal gammopathy after bone marrow transplantation. *Blood* 1989; 74: 2764-2768.

Moulopoulos LA, Dimopoulos MA, Christoulas D, Kastiris E, Anagnostou D, Koureas A, Roussou M, Gavriatopoulou M, Migkou M, Iakovaki M, Gkatzamanidou M, Tasidou A, Terpos E. Diffuse MRI marrow pattern correlates with increased angiogenesis, advanced disease features and poor prognosis in newly diagnosed myeloma treated with novel agents. *Leukemia* 2010; 24: 1206-1212.

Mueller PS, Terrell CL, Gertz MA. Fever of unknown origin caused by multiple myeloma: a report of 9 cases. *Arch Intern Med* 002; 62: 1305-1309.

Munshi NC. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: genetic versus environmental etiologies. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 1457-1459.

Myeloma Trialist's Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3832-3842.

Nadal E, Giné E, Bladé J, Esteve J, Rosiñol L, Fernández-Avilés F, Marin P, Martínez C, Rovira M, Urbano-Ispizua A, Carreras E, Montserrat E. High-dose therapy/autologous stem cell transplantation in patients with chemosensitive multiple myeloma: predictors of complete remission. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 61-64.

Niesvizky R, Richardson PG, Rajkumar SV, Coleman M, Rosiñol L, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Boral AL, Esseltine DL, Anderson KC, Bladé J. The relationship between quality of response and clinical benefit for patients treated on the bortezomib arm of the international, randomized, phase 3 APEX trial in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* 2008a; 143: 46-53.

Niesvizky R, Jayabalan DS, Christos PJ, Furst JR, Naib T, Ely S, Jalbrzikowski J, Pearse RN, Zafar F, Pekle K, Larow A, Lent R, Mark T, Cho HJ, Shore T, Tepler J, Harpel J, Schuster MW, Mathew S, Leonard JP, Mazumdar M, Chen-Kiang S, Coleman M. BiRD (Biaxin [clarithromycin]/Revlimid [lenalidomide]/dexamethasone) combination therapy results in high complete- and overall-response rates in treatment-naive symptomatic multiple myeloma. *Blood* 2008b; 111: 1101-1109.

Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Bladé J, González M, García-Sanz R, López-Berges C, Moro MJ, Hernández J, Escribano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998; 152: 1655-1664.

Orlowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, Bladé J, Hajek R, Spencer A, San Miguel J, Robak T, Dmoszynska A, Horvath N, Spicka I, Sutherland HJ, Suvorov AN, Zhuang SH, Parekh T, Xiu L, Yuan Z, Rackoff W, Harousseau JL. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in

relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3892-3901.

Paccagnella A, Chiarion-Sileni V, Soesan M, Baggio G, Bolzonella S, De Besi P, Casara D, Frizzarin M, Salvagno L, Favaretto A. Second and third responses to the same induction regimen in relapsing patients with multiple myeloma. *Cancer* 1991; 68: 975-980.

Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, Sureda A, Montejano L, Gutiérrez NC, García de Coca A, de Las Heras N, Mateos MV, López-Berges MC, García-Boyeró R, Galende J, Hernández J, Palomera L, Carrera D, Martínez R, de la Rubia J, Martín A, Bladé J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF. 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.

Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, Mateo G, Montalbán MA, Mateos MV, Bladé J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF. 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.

Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, Mateo G, López A, Rasillo A, Vidriales MB, López-Berges MC, Miguel JF, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78: 239-252.

Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, Merla E, Capparella V, Callea V, Cangialosi C, Grasso M, Rossini F, Galli M, Catalano L, Zamagni E, Petrucci MT, De Stefano V, Ceccarelli M, Ambrosini MT, Avonto I, Falco P, Ciccone G, Liberati AM, Musto P, Boccadoro M. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367: 825-831.

Palumbo A, Falco P, Corradini P, Falcone A, Di Raimondo F, Giuliani N, Crippa C, Ciccone G, Omedè P, Ambrosini MT, Gay F, Bringhen S, Musto P, Foà R, Knight R, Zeldis JB, Boccadoro M, Petrucci MT; Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4459-4465.

Palumbo A, Bringhen S, Liberati AM, Caravita T, Falcone A, Callea V, Montanaro M, Ria R, Capaldi A, Zambello R, Benevolo G, Derudas D, Dore F, Cavallo F, Gay F, Falco P, Ciccone G, Musto P, Cavo M, Boccadoro M. Oral melphalan, prednisone, and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results of a randomized controlled trial. *Blood* 2008a; 112: 3107-3114.

Palumbo A, Facon T, Sonneveld P, Bladé J, Offidani M, Gay F, Moreau P, Waage A, Spencer A, Ludwig H, Boccadoro M, Harousseau JL. Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 2008b; 111: 3968-3977.

Palumbo A, Falco P, Benevolo G, Rossi D, Carella AM, Guglielmelli T, Rocci A, De Paoli L, Grasso M, Mosca Siez ML, Piro E, Caltagirone S, Gay F, Cavallo F, Gaidano G, Boccadoro M. A multicenter, open label study of oral lenalidomide and prednisone (RP) followed by oral lenalidomide melphalan and prednisone (MPR) and oral lenalidomide maintenance in newly diagnosed elderly multiple myeloma patients. *Blood* 2010a; 116: Abstract 1940.

Palumbo A, Bringhen S, Rossi D, Cavalli M, Larocca A, Ria R, Offidani M, Patriarca F, Nozzoli C, Guglielmelli T, Benevolo G, Callea V, Baldini L, Morabito F, Grasso M, Leonardi G, Rizzo M, Falcone AP, Gottardi D, Montefusco V, Musto P, Petrucci MT, Ciccone G, Boccadoro M. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2010b; 28: 5101-5109.

Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, Michaeli J, Epstein J, Choi Y. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 11581-11586.

Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro MJ, Martín-Nuñez G, Galende J, Borrego D, Rodríguez MJ, Ortega F, Hernandez J, Moreno I, Domínguez M, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A. 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.

Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, Taccioli C, Zanesi N, Alder H, Hagan JP, Munker R, Volinia S, Boccadoro M, Garzon R, Palumbo A, Aqeilan RI, Croce CM. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 12885-12890.

Pineda-Roman M, Bolejack V, Arzoumanian V, Anaissie E, van Rhee F, Zangari M, Walker R, Hollmig K, Shaughnessy JD Jr, Epstein J, Krishna S, Crowley J, Barlogie B. Complete response in myeloma extends survival without, but not with history of prior monoclonal gammopathy of undetermined significance or smouldering disease. *Br J Haematol* 2007; 136: 393-399.

Popat R, Oakervee HE, Hallam S, Curry N, Odeh L, Foot N, Esseltine DL, Drake M, Morris C, Cavenagh JD. Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) front-line treatment of multiple myeloma: updated results after long-term follow-up. *Br J Haematol* 2008; 141: 512-516.

Rajkumar SV, Fonseca R, Lacy MQ, Witzig TE, Therneau TM, Kyle RA, Litzow MR, Gertz MA, Greipp PR. Plasmablastic morphology is an independent predictor of poor survival after autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1551-1557.

Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3111-3116.

Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Bradwell AR, Clark RJ, Larson DR, Plevak MF, Dispenzieri A, Katzmann JA. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106: 812-817.

Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, Abonour R, Siegel DS, Katz M, Greipp PR. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 29-37.

Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, English A, Pratt G, Child JA, Jack AS, Morgan GJ. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon

specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol* 1998; 100: 176-183.

Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, Owen RG, Jack AS, Child JA, Morgan GJ. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002; 100: 3095-3100.

Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431-438.

Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2487-2498.

Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3562-3571.

Rosiñol L, Cibeira MT, Bladé J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Segarra M, Cid MC, Filella X, Montserrat E. Extramedullary multiple myeloma escapes the effect to thalidomide. *Haematologica* 2004; 89: 832-836.

Rosiñol L, Cibeira MT, Uriburu C, Yantorno S, Salamero O, Bladé J, Montserrat E. Bortezomib: an effective agent in extramedullary disease in multiple myeloma. *Eur J Hematol* 2006; 76: 405-408.

Rosiñol L, Oriol A, Mateos MV, Sureda A, García-Sánchez P, Gutiérrez N, Alegre A, Lahuerta JJ, de la Rubia J, Herrero C, Liu X, Van de Velde H, San Miguel J, Bladé J. A phase II trial of alternating bortezomib and dexamethasone as induction regimen prior to autologous ítem cell transplantation in younger patients with multiple myeloma:

efficacy and clinical implications of tumor response kinetics. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4452-4458.

Rosiñol L, García-Sanz R, Lahuerta JJ, Hernández-García M, Sureda A, de la Rubia J, Oriol A, Hernández-Ruiz B, Carrera D, Navarro I, García-Ruiz JC, Besalduch J, Gardella S, García-Laraña J, Díaz-Mediavilla J, Alegre A, San Miguel JF, Bladé J. A PETHEMA trial of high-dose therapy/stem cell support, including tandem transplant, in primary refractory multiple myeloma: final results in 81 patients. *Bone Marrow Transplant* 2008a; 41: Abstract 374.

Rosiñol L, Pérez-Simón JA, Sureda A, de la Rubia J, de Arriba F, Lahuerta JJ, González JD, Díaz-Mediavilla J, Hernández B, García-Frade J, Carrera D, León A, Hernández M, Abellán PF, Bergua JM, San Miguel J, Bladé J. A prospective PETHEMA study of tandem autologous transplantation versus autograft followed by reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2008b; 112: 3591-3593.

Rosiñol L, Cibeira MT, Mateos MV, Martínez J, Oriol A, Teruel AI, Hernández D, García-Laraña J, De La Rubia J, Sureda A, Besalduch J, Palomera L, Gonzalez Y, Etxebeste MA, Díaz-Mediavilla J, Hernández MT, de Arriba F, Alegre A, Lahuerta JJ, San Miguel JF, Blade J. A phase III PETHEMA/GEM study of induction therapy prior autologous stem cell transplantation (ASCT) in multiple myeloma: superiority of VTD (Bortezomib/Thalidomide/Dexamethasone) over TD and VBMCP/VBAD plus bortezomib. *Blood* 2010; 116: Abstract 307.

Rotta M, Storer BE, Sahebi F, Shizuru JA, Bruno B, Lange T, Agura ED, McSweeney PA, Pulsipher MA, Hari P, Maziarz RT, Chauncey TR, Appelbaum FR, Sorrow ML, Bensinger W, Sandmaier BM, Storb RF, Maloney DG. Long-term outcome of patients with multiple myeloma after autologous hematopoietic cell transplantation and nonmyeloablative allografting. *Blood* 2009; 113: 3383-3391.

Rovira M, Rosiñol L, Fernández-Avilés F, Martínez C, Giné E, Esteve J, Cibeira MT, Marín P, Carreras E, Bladé J.. Is there a curative potential of autologous stem cell transplantation in multiple myeloma? Long-term results from a single-centre series. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: Abstract P592.

San Miguel JF, García-Sanz R, González M, Orfao A. Immunophenotype and DNA content in multiple myeloma. *Balliere`s Clinical Haematology* 1995a; 8: 735-759.

San Miguel JF, García-Sanz R, González M, Moro MJ, Hernández JM, Ortega F, Borrego D, Carnero M, Casanova F, Jiménez R. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood* 1995b; 85: 448-455.

San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Bladé J, López-Berges C, Caballero D, Hernández J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Díaz-Mediavilla J, Palomera L, Orfao A. 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.

San Miguel JF, García-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. En: *Best Practice & Research Clinical Haematology. Advances in the Biology and Management of Plasma Cell Dyscrasias* 2005; 18: 569-583.

San Miguel JF, Harousseau JL, Joshua D, Anderson KC. Individualizing treatment of patients with myeloma in the era of novel agents. *J Clin Oncol* 2008a; 26: 2761-2766.

San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008b; 359: 906-917.

Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, Martínez J, Mateo G, Martínez P, Ribera JM, Hernández JM, Lahuerta JJ, Orfão A, González M, San Miguel JF. 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.

Shain KH, Landowski TH, Dalton WS. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for *de novo* drug resistance. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 557-563.

Shustik C, Belch A, Robinson S, Rubin SH, Dolan SP, Kovacs MJ, Grewal KS, Walde D, Barr R, Wilson J, Gill K, Vickars L, Rudinkas L, Sicheri DA, Wilson K, Djurfeldt M, Shepherd LE, Ding K, Meyer RM. A randomised comparison of melphalan with prednisone or dexamethasone as induction therapy and dexamethasone or

observation as maintenance therapy in multiple myeloma: NCIC CTG MY.7. *Br J Haematol* 2007; 136: 203-211.

Singhal S, Vickrey E, Krishnamurthy J, Singh V, Allen S, Mehta J. The relationship between the serum free light chain assay and serum immunofixation electrophoresis, and the definition of concordant and discordant free light chain ratios. *Blood* 2009; 114: 38-39.

Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: A recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 1990; 76: 1647-1656.

Snozcek CL, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Kumar S, Greipp PR, Clark RJ, Rajkumar SV. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia* 2008; 22: 1933-1937.

Sonneveld P, van der Holt B, Segeren CM, Vellenga E, Croockewit AJ, Verhoe GE, Cornelissen JJ, Schaafsma MR, van Oers MH, Wijermans PW, Westveer PH, Lokhorst HM. Intermediate-dose melphalan compared with myeloablative treatment in multiple myeloma: long-term follow-up of the Dutch Cooperative Group HOVON 24 trial. *Haematologica* 2007; 92: 928-935.

Spencer A, Prince M, Roberts AW, Bradstock KF, Prosser IW. First analysis of the Australian Leukaemia and Lymphoma Group trial of thalidomide and alternate day prednisone following autologous stem cell transplantation for patients with multiple myeloma. *Blood* 2006; 108: Abstract 58 .

Steensma DP, Gertz MA, Greipp PR, Kyle RA, Lacy MQ, Lust JA, Offord JR, Plevak MF, Therneau TM, Witzig TE. A high bone marrow plasma cell labeling index in stable plateau-phase multiple myeloma is a marker for early disease progression and death. *Blood* 2001; 97: 2522-2523.

Sullivan PW, Salmon SE. Kinetics of tumor growth and regression in IgG multiple myeloma. *J Clin Invest* 1972; 51: 1697-1708.

Tosi P, Zamagni E, Cellini C, Ronconi S, Patriarca F, Ballerini F, Musto P, Di Raimondo F, Ledda A, Lauria F, Masini L, Gobbi M, Vacca A, Ria R, Cangini D, Tura

S, Baccarani M, Cavo M. Salvage therapy with thalidomide in patients with advanced relapsed/refractory multiple myeloma. *Haematologica* 2002; 87: 408-414.

Uljon SN, Richardson PG, Schur PH, Anderson KC, Tanasijevic MJ, Lindeman NI. Serial serum free light chain measurements do not detect changes in disease status earlier than electrophoretic M-spike measurements in patients with intact immunoglobulin myeloma. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 562-568.

Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, Albini A, Bussolino F, Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999; 93: 3064-3073.

Vande Broek I, Vanderkerken K, Van Camp B, Van Riet I. Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 325-334.

van de Velde HJK, Liu X, Chen G, Cakana A, Deraedt W, Bayssas M. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica* 2007; 92: 1399-1406.

Varettoni M, Corso A, Pica G, Mangiacavalli S, Pascutto C, Lazzarino M. Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple myeloma: a longitudinal study on 10003 consecutive patients. *Ann Oncol* 2010; 21: 325-330.

Vesole DH, Barlogie B, Jagannath S, Cheson B, Tricot G, Alexanian R, Crowley J. High-dose therapy for multiple myeloma: improved prognosis with better supportive care and double transplants. *Blood* 1994; 84: 950-956.

Vesole DH, Tricot G, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Bracy D, Miller L, Cheson B, Crowley J, Barlogie B. Autotransplant in multiple myeloma: what have we learned? *Blood* 1996; 88: 838-847.

Waage A, Gimsing P, Fayers P, Abildgaard N, Ahlberg L, Björkstrand B, Carlson K, Dahl IM, Forsberg K, Gulbrandsen N, Haukås E, Hjertner O, Hjorth M, Karlsson T, Knudsen LM, Nielsen JL, Linder O, Mellqvist UH, Nesthus I, Rolke J, Strandberg M, Sørnbø JH, Wisløff F, Juliusson G, Turesson I; Nordic Myeloma Study Group. Melphalan and prednisone plus thalidomide or placebo in elderly patients with multiple myeloma. *Blood* 2010; 116:1405-1412.

Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* 2011; 117: 553-562.

Wang M, Delasalle K, Feng L, Thomas S, Giralt S, Qazilbash M, Handy B, Lee JJ, Alexanian R. CR represents an early index of potential long survival in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 498-504.

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.

Weber DM, Chen C, Niesvizky R, Wang M, Belch A, Stadtmauer EA, Siegel D, Borrello I, Rajkumar SV, Chanan-Khan AA, Lonial S, Yu Z, Patin J, Olesnyckyj M, Zeldis JB, Knight RD. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med* 2007; 357: 2133-2142.

Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009; 113: 5418-5422.

Wijermans P, Schaafsma M, Termorshuizen F, Ammerlaan R, Wittebol S, Sinnige H, Zweegman S, van Marwijk Kooy M, van der Griend R, Lokhorst H, Sonneveld P. Phase III study of the value of thalidomide added to melphalan plus prednisone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma: the HOVON 49 Study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3160-3106.

Wu P, Davies FE, Boyd K, Thomas K, Dines S, Saso RM, Potter MN, Ethell ME, Shaw BE, Morgan GJ. The impact of extramedullary disease at presentation in the outcome of myeloma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 230-235.

Yang Y, Ren Y, Ramani VC, Nan L, Suva LJ, Sanderson RD. Heparanase enhances local and systemic osteolysis in multiple myeloma by upregulating the expression and secretion of RANKL. *Cancer Res* 2010; 70: 8329-8338.

Zamagni E, Nanni C, Patriarca F, Tacchetti P, Englaro E, Perrone G, Buttignol S, Brioli A, Pantani L, Zannetti BA, Caroborante F, Baccarani M, Fanti S, Cavo M. Prognostic relevance of 18F-FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated

with up-front autologous transplantation: a prospective study. *Blood* 2010; 116: Abstract 369.

Zent CS, Wilson CS, Tricot G, Jagannath S, Siegel D, Desikan KR, Munshi N, Bracy D, Barlogie B, Butch AW. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood* 1998; 91: 3518-3523.

Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, Sanderson R, Yang Y, Wilson C, Zangari M, Anaissie E, Morris C, Muwalla F, van Rhee F, Fassas A, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002; 99: 1745-1757.

Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V, Huang Y, Williams DR, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Zangari M, Dhodapkar M, Shaughnessy JD Jr. Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood* 2007; 109: 1692-1700.