



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Factores pronósticos en el mieloma quiescente: comportamiento evolutivo del componente monoclonal, inmunoparesia isotipo específica y microambiente inmune

Ignacio Isola

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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 and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

FACTORES PRONÓSTICOS EN EL MIELOMA QUIESCENTE: COMPORTAMIENTO EVOLUTIVO DEL COMPONENTE MONOCLONAL, INMUNOPARESIA ISOTIPO ESPECÍFICA Y MICROAMBIENTE INMUNE

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Ignacio Isola

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por:

Carlos José Fernández de Larrea Rodríguez

(Universitat de Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona)

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universitat de Barcelona.

Diciembre, 2023

Agradecimientos

Gracias a Carlos por haberme ayudado a seguir adelante en los múltiples momentos en los que completar esta tesis me parecía imposible.

Gracias a Ester, a Maripau y a Laia por su invaluable trabajo (y por la paciencia!). Sin ellas esta tesis no existiría.

Gracias a Arturo por guiarme en el desafío estadístico del mieloma quiescente evolving.

Gracias a todo el equipo de gammapatías y amiloidosis del Hospital Clínic por permitirme llevar adelante los trabajos que constituyen esta tesis. Gracias a David por su ayuda a distancia.

Gracias a mis compañeras del laboratorio de hematología del Hospital Sant Joan de Dèu por el apoyo.

Gracias a Luisi, Maca, Sopi, Toto, Alfred, Gabi, Diego y Pedro por cuidarme (los quiero!).

Gracias a mi papá y a mi hermano.

Financiamiento

El trabajo incluido en esta tesis doctoral estuvo financiado en parte por las becas PI16/0423, PI12/1093, PI19/ 00669 y PI20/00436 del Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa”, y la beca 2014SGR-552 de la Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (Generalitat de Catalunya).

Índice

Introducción.....	1
1. Definición del mieloma quiescente y criterios diagnósticos.....	2
2. Prevalencia del mieloma quiescente.....	5
3. Bases fisiopatogénicas de la mielomagénesis.....	6
3.1. Diferenciación de la célula B	6
3.2. Eventos iniciadores.....	8
3.3. Perfil genómico del mieloma quiescente.....	10
3.4. Mecanismos moleculares de progresión.....	11
4. Microambiente tumoral.....	14
4.1. Nicho medular.....	16
4.1.1. Matriz extracelular.....	16
4.1.2. Células estromales.....	17
4.1.3. Citoquinas.....	18
4.1.4. Osteoclastos.....	19
4.1.5. Osteoblastos.....	20
4.1.6. Células endoteliales.....	21
4.2. Microambiente inmune.....	22
4.2.1. Células mieloides supresoras.....	23
4.2.2. Macrófagos.....	24
4.2.3. Células dendríticas.....	25
4.2.4. Linfocitos T y NK.....	27
4.3. El nicho medular en los estadios precursores.....	30
5. Factores pronósticos.....	31
5.1. Modelos basados en parámetros relacionados con la carga tumoral al diagnóstico.....	32
5.2. Modelos de riesgo basados en estudios de imágenes.....	35
5.3. Mieloma quiescente de ultra-alto riesgo y actualización de los criterios diagnósticos del mieloma múltiple.....	36
5.4. Modelos de riesgo evolutivos.....	39
5.5. Modelos genómicos.....	41
5.5.1. Secuenciación ADN/ARN y perfiles de expresión génica.....	41
5.5.2. Alteraciones citogenéticas.....	43

6. Tratamiento del mieloma quiescente.....	46
6.1. Lenalidomida.....	46
6.2. Carfilzomib, lenalidomida y dexametasona.....	48
6.3. Anticuerpos monoclonales.....	49
6.4. Vacunas	50
7. Manejo actual de los pacientes con mieloma quiescente.....	51
Hipótesis.....	55
Objetivos.....	59
Materiales, métodos, y resultados.....	61
1. El patrón “evolving” del componente monoclonal en pacientes con mieloma quiescente: impacto en el riesgo de progresión precoz.....	63
2. La inmunoparesia definida por la supresión del par de cadenas pesada/ligera en los pacientes con mieloma quiescente demuestra especificidad de isotipo inicial y afecta a otros isotipos en estadios avanzados.....	77
3. El análisis de la expresión génica del microambiente medular revela diferentes subtipos inmunes en el mieloma quiescente asociados con la progresión a enfermedad sintomática.....	97
Discusión.....	119
Conclusiones.....	133
Bibliografía.....	135

Abreviaturas y acrónimos

4-IPP	4-yodo-6-fenilpirimidina
ADAM33	Dominio 33 de la metalopeptidasa ADAM (<i>ADAM metallopeptidase domain 33</i>)
ADCC	Actividad citotóxica directa y dependiente de anticuerpos
AID	Enzima deaminasa de citosina inducida por activación
AKT	Serina treonina quinasa AKT
ANG	Angiopoyetina
ANG1	Angiopoyetina 1
ANG2	Angiopoyetina 2
ANXA2	Anexina A2
APC	Célula presentadora de antígenos
aPC	Células plasmáticas de fenotipo aberrante
APOBEC	Enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico (<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>)
APRIL	Ligando inductor de la proliferación (<i>A proliferation-inducing ligand</i>)
ARG1	Arginasa-1
ASPM	<i>Assembly factor for spindle microtubules</i>
ATM	Serina treonina quinasa ATM
AXL	Receptor tirosina quinasa AXL
BAD	Inductor de muerte asociado a BCL2 (<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>)
BAFF	Factor activador de célula B (<i>B-cell-activating factor</i>)
BAK1	Asesino antagonista homólogo de BCL2 (<i>BCL2 antagonist/killer 1</i>)
Bcl-2	Regulador de la apoptosis Bcl-2
Bcl-x	Proteína 1 similar a BCL2
BCMA	Antígeno de maduración de las células B (<i>B cell maturation antigen</i>)
BCR	receptor de células B (<i>B-Cell Receptor</i>)

bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico (<i>Basic fibroblast growth factor</i>)
Bim	Proteína 11 similar a BCL2
BMP2	Proteína morfogénica ósea 2 (<i>Bone morphogenetic protein 2</i>)
BMPC	Células plasmáticas en médula ósea (<i>Bone marrow plasma cells</i>)
BTLA	Atenuador de linfocitos B y T
CAR-T	Células T con receptores quiméricos de antígenos
CASP3	Caspasa 3
CCL	Ligando de quimiocina C-C
CCND	Ciclina D
CCR	Receptor de quimiocina C-C
CD138	Syndecan 1
CDF	Células dendríticas foliculares
CDKN2	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>)
CG	Centro germinal
CHSY1	Condroitín sulfato sintasa 1
CIP	Inmunoparesia clásica
CLP	Progenitores linfoides comunes (<i>Common lymphoid progenitors</i>)
CM	Componente monoclonal
CMs	Componente monoclonal sérico
CNAs	Alteración en el número de copias (<i>Copy number alterations</i>)
CNVs	Variaciones en el número de copias (<i>Copy number variations</i>)
CP	Células plasmáticas
CPc	Células plasmáticas circulantes
CRAB	<i>hyperCalcemia, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions</i>
CSR	Cambio de isotipo de inmunoglobulinas (<i>Class switch recombination</i>)
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>)
CX3CL1	Ligando 1 de quimiocina C-X3-C

CXCL	Ligando de quimiocina C-X-C
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina C-X-C
DCs	Células dendríticas
dFLC	Diferencia absoluta entre los niveles de cadenas ligeras kappa y lambda en suero
DKK1	Proteína Dickkopf-1 (<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>)
DNAM-1	Molécula accesoria 1 de DNAX (<i>DNAX accessory molecule-1</i>)
DTL	<i>Denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog</i>
eCM	Comportamiento <i>evolving</i> del componente monoclonal
eHb	Comportamiento <i>evolving</i> de la hemoglobina
EMR	Enfermedad mínima residual
ENTPD1	<i>Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1</i>
Eomes	Eomesodermina
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FAM46C	<i>Family with sequence similarity 46, member C</i>
FCER1A	Fragmento Fc del receptor epsilon 1a (<i>Fc epsilon receptor 1a</i>)
FLCr	Cociente de cadena ligera involucrada/no involucrada
FLCs	Cadenas ligeras en suero libres (<i>Free light chains</i>)
FLT3	Receptor tirosina quinasa 3 relacionado con fms (<i>Fms related receptor tyrosine kinase 3</i>)
FOS	Proto-oncogén Fos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto
GNLY	Granulisina
GZMA	Granzima A
GZMB	Granzima B
GZMH	Granzima H
GZMM	Granzima M
HDAC6	Histona deacetilasa 6
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos

HIF1A	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (<i>Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha</i>)
HLA-A	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, A
HLA-B	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, B
HLA-C	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, C
HLC	Par de cadena pesada/ligera de inmunoglobulina
HLC IP	Inmunoparesia HLC (isotipos no involucrados)
HMMR	Receptor de motilidad mediada por hialuronano (<i>Hyaluronan mediated motility receptor</i>)
HMS	Hipermutación somática
HSC	Células madre hematopoyéticas (<i>Hematopoietic stem cells</i>)
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1 (<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>)
ICIs	<i>Immune checkpoints</i> inhibidores
IDO-1	<i>Enzima indolamina-2,3-dioxigenasa 1</i>
IFN gamma	Interferón gamma
IFNAR1	Subunidad 1 del receptor de IFN alfa y beta
IFNL	Interferón lambda
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IgH	Gen de las cadena pesada de las inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
IL17RB	Receptor beta de IL17
IL2RG	Subunidad gamma del receptor de IL2
IL3R alfa	Subunidad alfa del receptor de interleuquina 3
IMI	Inmunoparesia isotipo específica (<i>Isotype-matched immunoparesis</i>)
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible
IQR	Rango intercuartil
IRF1	Factor regulador del interferón 1 (<i>Interferon regulatory factor 1</i>)
IRF4	Factor regulador del interferón 4 (<i>Interferon regulatory factor 4</i>)

ISG15	<i>Proteína de 15 kDa estimulada por IFN (ISG15 ubiquitin like modifier)</i>
JAK	Quinasa Janus
KIR	<i>killer cell Ig-like receptors</i>
KLRB1	<i>killer cell lectin like receptor B1</i>
KLRC1	<i>killer cell lectin like receptor C1</i>
KLRD1	<i>killer cell lectin like receptor D1</i>
KLRF1	<i>killer cell lectin like receptor F1</i>
KLRK1	<i>killer cell lectin like receptor K1</i>
KRd	Carfilzomib, lenalidomida y dexametasona
LAG-3	<i>Gen 3 de activación de linfocitos (Lymphocyte-activation gene 3)</i>
LFA1	Antígeno asociado a función de linfocito 1 (<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>)
LGALS1	Galectina 1
LILRB1	Receptor leucocitario tipo inmunoglobulina B1 (<i>Leukocyte immunoglobulin like receptor B1</i>)
LILRB3	Receptor leucocitario tipo inmunoglobulina B3 (<i>Leukocyte immunoglobulin like receptor B3</i>)
LPS	Lipopolisacáridos
LTB	Linfotoxina beta
LTF	Lactotransferrina
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAF	factor de transcripción MAF
MAFB	factor de transcripción MAFB
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
Mcl-1	Regulador de la apoptosis Mcl-1
mDCS	Células dendríticas mieloides
MDSCs	Células mieloides supresoras
MEC	Matriz extracelular
MFGE8	<i>Milk fat globule EGF and factor V/VIII domain containing</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

MICA	Molécula A relacionada al complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (<i>Major histocompatibility complex class-I related chain molecule A</i>)
MIP1alfa	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (<i>Macrophage inflammatory protein-1 alpha</i>)
MIP1beta	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (<i>Macrophage inflammatory protein-1 alpha</i>)
MM	Mieloma múltiple
M-MDSCs	Células mieloides supresoras monocíticas
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
MO	Médula ósea
MQ	Mieloma múltiple quiescente
MUC1	Mucina 1
MX1	GTPasa MX1
NCAM1	Molécula de adhesión celular neural 1 (<i>Neural cell adhesion molecule 1</i>)
NCRs	Receptores de citotoxicidad natural (<i>Natural cytotoxicity receptors</i>)
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NGS	Tecnología de secuenciación de nueva generación
NKG2D	Receptor activador de células NK grupo 2, miembro D
NKp80	Receptor de células NK tipo lectina F1
NRP1	Neuropilina 1
NT5E	Ecto 5' Nucleotidasa
OPG	Osteoprotegerina
OS	Supervivencia global (<i>overall survival</i>)
p38 MAPK	Quinasas activadas por mitógenos p38
PCPI	Índice de proliferación de las células plasmáticas
PD-1	Proteína 1 de muerte celular programada (<i>Programmed cell death protein 1</i>)
pDCs	Células dendríticas plasmocitoides
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PD-L1	Ligando 1 de muerte celular programada
PET	Tomografía por emisión de positrones
PETHEMA	Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas
PET-TC	Tomografía por emisión de positrones-Tomografía computada
PFS	Supervivencia libre de progresión (<i>progression-free survival</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinasa
PMN-MDSCs	Células mieloides supresoras granulocíticas
PRF1	Perforina 1
proteinuria	Proteinuria de Bence-Jones
BJ	
PSEN1	Presenilina 1
PTHrP	Proteína relacionada con la parathormona
PVR	Receptor del poliovirus
RANK	Receptor activador del factor nuclear NFκB
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear NFκB
RMN	Resonancia magnética
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RRM2	Subunidad M2 de ribonucleósido-difosfato reductasa (<i>ribonucleotide reductase regulatory subunit M2</i>)
RUNX2	Factor de transcripción de la familia RUNX 2
S100A12	Proteína de unión al calcio S100 A12
SELPLG	P-selectina ligando
SFRP2	<i>Secreted frizzled related protein 2</i>
SLiM	<i>Sixty percent (>60%) clonal BMPCs, involved/uninvolved serum free light chain ratio of ≥ 100, > 1 focal bone lesions on MRI.</i>
SNVs	Variantes de nucleótido único (<i>Single Nucleotide Variants</i>)
SP	Sangre periférica
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción (<i>Signal transducer and activator of transcription</i>)
TAC	Tomografía axial computada

TACI	Activador transmembrana modulador de calcio y ligando de la ciclofilina (<i>Transmembrane activator and CAML interactor</i>)
TAM	Macrófagos asociados a tumor
T-bet / TBX2:	Factor de transcripción T-box 21
TCF4	Factor de transcripción 4
TD	Dependiente de célula T
Tfh	Linfocito T <i>helper</i> folicular
TGF	Factor de crecimiento transformador
TGF-beta	Factor de crecimiento transformador-beta
Th	Linfocito T <i>helper</i>
THBS1	Gen que codifica a la proteína trombospondina 1
TI	Independiente de célula T
TIGIT	Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM (<i>T cell immunoglobulin and ITIM domain</i>)
TIS	Firma de inflamación tumoral (<i>Tumor inflammation signature</i>)
TLR7	Receptor de tipo toll 7
TLR9	Receptor de tipo toll 9
TMEM48	Proteína transmembrana 48
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFAIP3	Proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (<i>TNF alpha induced protein 3</i>)
TNFRSF	Miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (<i>TNF receptor superfamily member</i>)
TNFSF	Miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (<i>TNF superfamily member</i>)
Tregs	Linfocitos T reguladores
TTP	Tiempo transcurrido hasta la progresión (<i>Time to progression</i>)
VCAM1	Molécula de adhesión celular vascular 1 (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)

VPP	Valor predictivo positivo
WES	Secuenciación del exoma completo (<i>whole exome sequencing</i>)
WGS	Secuenciación del genoma completo (<i>whole genome sequencing</i>)
WHSC1	<i>Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1</i>
XCL2	Ligando 2 de quimiocina X-C
XCR1	Receptor 1 de quimiocina X-C
ZNF292	Proteína de dedo de zin 292 (<i>Zinc finger protein 292</i>)

Tesis en formato de compendio de publicaciones

La tesis consta de 3 objetivos y 3 artículos

- **Isola I**, Fernández de Larrea C, Pereira A, Cibeira MT, Magnano L, Tovar N, Rodríguez-Lobato LG, Calvo X, Aróstegui JI, Díaz T, Lozano E, Rozman M, Yagüe J, Bladé J, Rosiñol L. Evolving M-protein pattern in patients with smoldering multiple myeloma: impact on early progression. *Leukemia*. 2018; 32(6):1427-1443.

Factor de impacto: 10.023, Cuartil: Q1

- **Isola I**, Moreno DF, Moga E, Mena MP, Tovar N, Rodríguez-Lobato LG, Oliver-Caldés A, Salgado MC, Brasó-Maristany F, Yagüe J, Cibeira MT, Prat A, Rosiñol L, Bladé J, Fernández de Larrea C. Immunoparesis defined by heavy/light chain pair suppression in smoldering multiple myeloma shows initial isotype specificity and involves other isotypes in advanced disease. *Ann Hematol*. 2021; 100(12):2997-3005.

Factor de impacto: 4.03, Cuartil: Q2

- **Isola I**, Brasó-Maristany F, Moreno DF, Mena MP, Oliver-Calders A, Paré L, Rodríguez-Lobato LG, Martín-Antonio B, Cibeira MT, Bladé J, Rosiñol L, Prat A, Lozano E, Fernández de Larrea C. Gene Expression Analysis of the Bone Marrow Microenvironment Reveals Distinct Immunotypes in Smoldering Multiple Myeloma Associated to Progression to Symptomatic Disease. *Front Immunol*. 2021; 12:792609.

Factor de impacto: 8.786, Cuartil: Q1

Introducción

Las células plasmáticas (CP) constituyen el último estadio de diferenciación de los linfocitos B, y su función es producir anticuerpos como parte de la inmunidad humoral. La transformación maligna de las CP puede resultar en la enfermedad sintomática conocida como mieloma múltiple (MM). Esta entidad se caracteriza por la acumulación de CP en la médula ósea (MO), las cuales producen una inmunoglobulina (Ig) monoclonal conocida como componente monoclonal (CM) o paraproteína. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad derivan directamente de la infiltración por parte de las CP y/o de los efectos del CM, y están incluidas en el acrónimo CRAB (del inglés: hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones líticas óseas)¹. La edad media al momento del diagnóstico es de aproximadamente 65 años, con un 15% de pacientes menores de 50 años². A pesar de los recientes avances en su tratamiento, el MM es considerado una enfermedad incurable con una supervivencia mediana de aproximadamente 5 años³, que ha ido mejorando en las últimas décadas⁴.

La detección de la paraproteína o CM secretado por las CP malignas permitió la identificación de estadios asintomáticos, precursores del MM. De esta manera, el MM sería el resultado de la progresión a través de dos estadios clínicos previos: un estadio pre-maligno conocido como gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y un estadio intermedio entre la GMSI y el MM conocido como mieloma múltiple quiescente (MQ). La prevalencia de la GMSI es de aproximadamente un 3% en personas mayores de 50 años, con una edad mediana al diagnóstico de 72 años. El riesgo acumulado de progresión a MM es del 10% a los 10 años y del 36% a los 40 años, lo que es equivalente aproximadamente a un 1% anual. Esto significa que la mayor parte de los pacientes con GMSI no progresaran a enfermedad sintomática⁵. El estadio intermedio conocido como MQ se distingue de la GMSI principalmente por razones clínicas, dado su mayor riesgo de progresión a MM en los primeros 5 años desde el diagnóstico: 10% anual para el MQ frente al 1% anual para la GMSI⁶. El MQ constituye, sin embargo, un grupo biológicamente heterogéneo. Se trata de una entidad clínicamente definida, que incluye tanto a pacientes que se comportan de forma similar a una GMSI (una entidad pre-

maligna con una tasa de progresión muy baja), como a pacientes con un comportamiento biológicamente maligno, que desarrollan síntomas y daño de órgano blanco dentro de los primeros dos años desde el diagnóstico.

Los estadios precursores del MM (GMSI y MQ) constituyen una oportunidad extraordinaria para estudiar los mecanismos evolutivos en las gammapatías monoclonales y para diseñar estrategias preventivas y tratamientos en fases precoces. En los últimos años, la introducción de nuevos tratamientos ha cambiado el pronóstico de los pacientes con MM. Muchos de estos tratamientos pueden ser menos tóxicos que la quimioterapia convencional. Así mismo, nuevas herramientas diagnósticas han permitido identificar factores asociados con la progresión de los estadios asintomáticos de la enfermedad. Combinando nuevos tratamientos con tecnologías diagnósticas modernas, tendríamos la posibilidad de identificar pacientes con estadios precursores del MM que podrían beneficiarse de una potencial intervención terapéutica temprana.

Definición del mieloma quiescente y criterios

diagnósticos

El término “mieloma quiescente” (MQ) fue acuñado por Kyle y Greipp en 1980⁷, para describir el curso clínico de 6 pacientes que fueron diagnosticados de MM basándose en la presencia de un CM en suero ≥ 3 g/dL y una infiltración a nivel medular por células plasmáticas $\geq 10\%$. A lo largo de un período mínimo de seguimiento de 5 años (rango, 5-16 años), ninguno de los pacientes desarrolló hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o enfermedad ósea, o requirió tratamiento para el MM. Los autores concluyeron que los pacientes que se presentaran con características clínicas similares eran candidatos a observación, sin indicación de tratamiento. En el mismo año, Alexanian⁸ utilizaría el término “mieloma indolente” para describir a 20 pacientes asintomáticos, con una mediana de CM sérico de 3,7 g/dL (rango, 2,5 – 4,5 g/dL), sin que constara el grado de infiltración por células plasmáticas a nivel medular. Aunque la mayor parte de los pacientes de esta serie eventualmente requirieron tratamiento, la mediana de

tiempo al inicio del mismo fue de tres años. La supervivencia global también fue significativamente mayor que en los pacientes con “MM sintomático”, con una mediana de 64 meses.

Durante las décadas siguientes, diferentes criterios fueron utilizados para diagnosticar y evaluar el riesgo de progresión de los pacientes con “MM asintomático” o MQ. Con el fin de estandarizar la práctica clínica, el *International Myeloma Working Group* (IMWG) publicó guías de consenso en 2003⁹, definiendo el MQ como la presencia de un CM sérico ≥ 3 g/dL y/o una infiltración medular por células plasmáticas clonales $\geq 10\%$, en ausencia de daño de órgano asociado al MM o amiloidosis (**Tabla 1**).

Con posterioridad al consenso del IMWG, varios estudios¹⁰⁻¹³ describieron la asociación de ciertas características clínicas con un riesgo de progresión a enfermedad sintomática muy alto, dando origen al concepto de “MQ de ultra-alto riesgo”. De esta manera, la mayor parte (65 a 95%) de los pacientes con $\geq 60\%$ de células plasmática en MO, un cociente de cadenas ligeras en suero libres (FLCs) involucrada/no involucrada ≥ 100 o más de una lesión ósea focal en un estudio de resonancia magnética (RMN), experimentaban progresión precoz (dentro de los dos años del diagnóstico) a enfermedad sintomática. Estos hallazgos, en el contexto de nuevos tratamientos con un mejor perfil de toxicidad y el desarrollo de estudios de imagen más sensibles, llevaron a la reclasificación de los pacientes con “MQ de ultra-alto riesgo” como MM activo en el consenso publicado por el IMWG en el 2014¹⁴, con la finalidad de evitar la morbilidad asociada al desarrollo de daño orgánico (principalmente fracturas óseas e insuficiencia renal). (**Tabla 1**).

Tabla 1

Clasificación del IMWG

Consenso	GMSI	MQ	MM
IMWG 2003 ⁹	<ul style="list-style-type: none"> - CM sérico < 3 g/dL - BMPC clonales < 10% - Ausencia de daño de órgano asociada a MM (CRAB) u otro proceso linfoproliferativo B 	<ul style="list-style-type: none"> - CM sérico ≥ 3 g/dL y/o - BMPC clonales ≥ 10% y - Ausencia de CRAB 	<ul style="list-style-type: none"> - Presencia de CM en suero y/o orina - Presencia de BMPC clonales o plasmocitomas - Presencia de CRAB
IMWG 2014 ¹⁴	<ul style="list-style-type: none"> - CM sérico < 3 g/dL - BMPC clonales < 10% - Ausencia de daño de órgano asociada a MM (CRAB), otro proceso linfoproliferativo B o amiloidosis 	<ul style="list-style-type: none"> - CM sérico ≥ 3 g/dL y/o - BMPC clonales ≥ 10% y - Ausencia de CRAB o amiloidosis 	<ul style="list-style-type: none"> - BMPC clonales ≥ 10% o plasmocitoma extramedular - CRAB o SLiM

BMPC (del inglés): **Bone Marrow Plasma Cells**.

CRAB (del inglés): **hyperCalcemia, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions**.

SLiM (del inglés): **Sixty percent (>60%) clonal BMPCs, involved/uninvolved serum free Light chain ratio of ≥ 100, > 1 focal bone lesions on MRI**.

Prevalencia del mieloma quiescente

La prevalencia del MQ en la población general no está claramente definida. Los desafíos en la determinación certera de la epidemiología de esta enfermedad surgen de su rareza (que implica la realización de estudios epidemiológicos de gran escala), del infradiagnóstico que supone su carácter por definición asintomático, y de la infrarrepresentación de las minorías en las bases de datos públicas¹⁵. En general, la población negra representa un porcentaje mayor de los afectos por todos los estadios de las gammapatías monoclonales, seguidos por la población hispana/latina, la caucásica y la asiática¹⁵⁻¹⁷. Otra dificultad a la que se enfrentan los estudios epidemiológicos del MQ es el hecho de que el MQ no cuenta con un código de diagnóstico propio en la *International Classification of Disease* (ICD), por lo que es considerado dentro del conjunto del MM.

Un estudio sueco evaluó todos los pacientes diagnosticados de MM desde enero de 2008 a diciembre del 2011, utilizando los datos del *Swedish Myeloma Registry*¹⁸. De los 2.494 pacientes incluidos con diagnóstico de MM, 14,4% (360 pacientes) cumplían criterios diagnósticos de MQ. De estos, un 28,8% (4,2% de todos los casos diagnosticados como MM) fueron clasificados como MQ de alto riesgo según el modelo de la Mayo Clinic⁶. Utilizando a la población mundial como referencia, la incidencia ajustada a la edad del MQ fue estimada en 0,44 casos por 100.000 habitantes, y la del MQ de alto riesgo de 0,14. En otro estudio sueco que analizó 4.904 pacientes diagnosticados con MM entre 2008 y 2015, 18,6% (916) de los pacientes cumplían criterios de MQ¹⁹.

Un estudio realizado en los Estados Unidos analizó los datos de la *National Cancer Database* (NCDB), la base de datos pública de cáncer más grande del país. De los 86.327 pacientes diagnosticados de MM entre 2003 y 2011, un 13,7% cumplían criterios de MQ, con una mediana de edad al diagnóstico de 67 años²⁰. Utilizando la incidencia ajustada por edad del MM en la población de los Estados Unidos como referencia, la incidencia del MQ fue estimada en 0,9 casos por 100.000 habitantes. Otro estudio, que analizó

también datos de la NCDB, determinó que 17,1% (11.643) de los 682.34 pacientes diagnosticados de MM entre 2010 y 2014 eran clasificables como MQ²¹.

A la luz de la reciente evidencia que apoyaría el inicio de tratamiento en el estadio de MQ, tanto la relativamente alta prevalencia demostrada como sus diferencias sociodemográficas, tienen implicaciones para el diseño de futuras estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Bases fisiopatogénicas de la mielomagénesis

Diferenciación de la célula B

La diferenciación de las células B comienza con las células madre hematopoyéticas (**HSC**) en la médula ósea, en donde las células estromales proveen citoquinas y quimiocinas como CXCL12 e interleuquina (IL)-7, que permiten el desarrollo inicial de la célula B²². A partir de las señales de las células estromales, las **HSC** se diferencian en progenitores linfoides comunes (**CLP**), que expresan receptores para c-kit e IL-7, ligandos necesarios para su supervivencia y proliferación. Con la expresión de los factores de transcripción E2A y EBF, las **CLP** se transforman en células **pro-B**²³. Desde este punto del desarrollo, las células B de la médula ósea experimentan un reordenamiento secuencial de los genes correspondientes a las cadenas pesadas y a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (Ig), la recombinación V(D)J, que resulta en la generación de **células B inmaduras con expresión de IgM**²⁴. Las células B inmaduras migran entonces desde la MO a los órganos linfoides secundarios (principalmente el bazo), en donde se diferencian a los estadios **T1 y T2**, para convertirse entonces en **células B maduras que co-expresan IgM e IgD**, luego de lo cual esperan la activación por antígenos foráneos²⁵.

Para su activación y diferenciación en células plasmáticas (**CP**) secretoras de anticuerpos, las células B maduras en los órganos linfoides secundarios requieren dos señales. La primera señal deriva del receptor de células B (BCR) y su unión a un antígeno,

y la segunda puede ser independiente (TI) o dependiente (TD) de linfocitos T. Los antígenos TI, como los lipopolisacáridos y los glicolípidos, generan CP de corta duración que producen anticuerpos de baja afinidad. Las respuestas TD, iniciadas por el encuentro con un antígeno y la interacción con un linfocito T helper folicular (Tfh), permite que las células B se transformen en CP de corta duración o que ingresen al centro germinal (CG) para diferenciarse a CP o células B de memoria con mayor afinidad antigénica.

El centro germinal puede dividirse en la zona oscura, donde las células B experimentan expansión clonal e hipermutación somática (HMS), y la zona clara, donde las células B atraviesan un proceso de maduración de su afinidad a través de la interacción con Tfh y células dendríticas foliculares (CDF) (**Figura 1**)²⁶. En la zona oscura, las células B activadas por el antígeno se transforman en **centroblastos** y experimentan expansión clonal. Durante esta proliferación, el proceso de HMS introduce cambios de pares de bases en las regiones V(D)J de los genes correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de las Ig. Los centroblastos se diferencian a **centrocitos**, que se trasladan a la zona clara del centro germinal. Allí, los centrocitos con receptores antigénicos / Ig no favorables son eliminados por apoptosis, mientras que los centrocitos de alta afinidad reciben estímulos de proliferación y supervivencia por parte de los Tfh y las CDF (como CD40 e IL-21)²⁷ e incluso pueden reingresar en la zona oscura para re-evolucionar su receptor y mejorar su afinidad.²⁸ Estos centrocitos sufrirán además un proceso de recombinación somática irreversible (CSR) mediante el cual pueden cambiar el isotipo de Ig de IgM e IgD a IgG, IgA o IgE. La enzima deaminasa de citosina inducida por activación (AID) es requerida para estos procesos de alteración del ADN, con un rol esencial en estas reacciones de diversificación inmune secundaria. La reacción en el CG permite que las células B con receptores de alta afinidad se diferencien en **células B de memoria o plasmáticas**²⁹. Estas células plasmáticas recirculan y migran de regreso a la médula ósea, en donde encuentran un nicho adecuado para convertirse en CP de larga supervivencia que secretan los anticuerpos que median protección a largo plazo contra antígenos específicos³⁰.

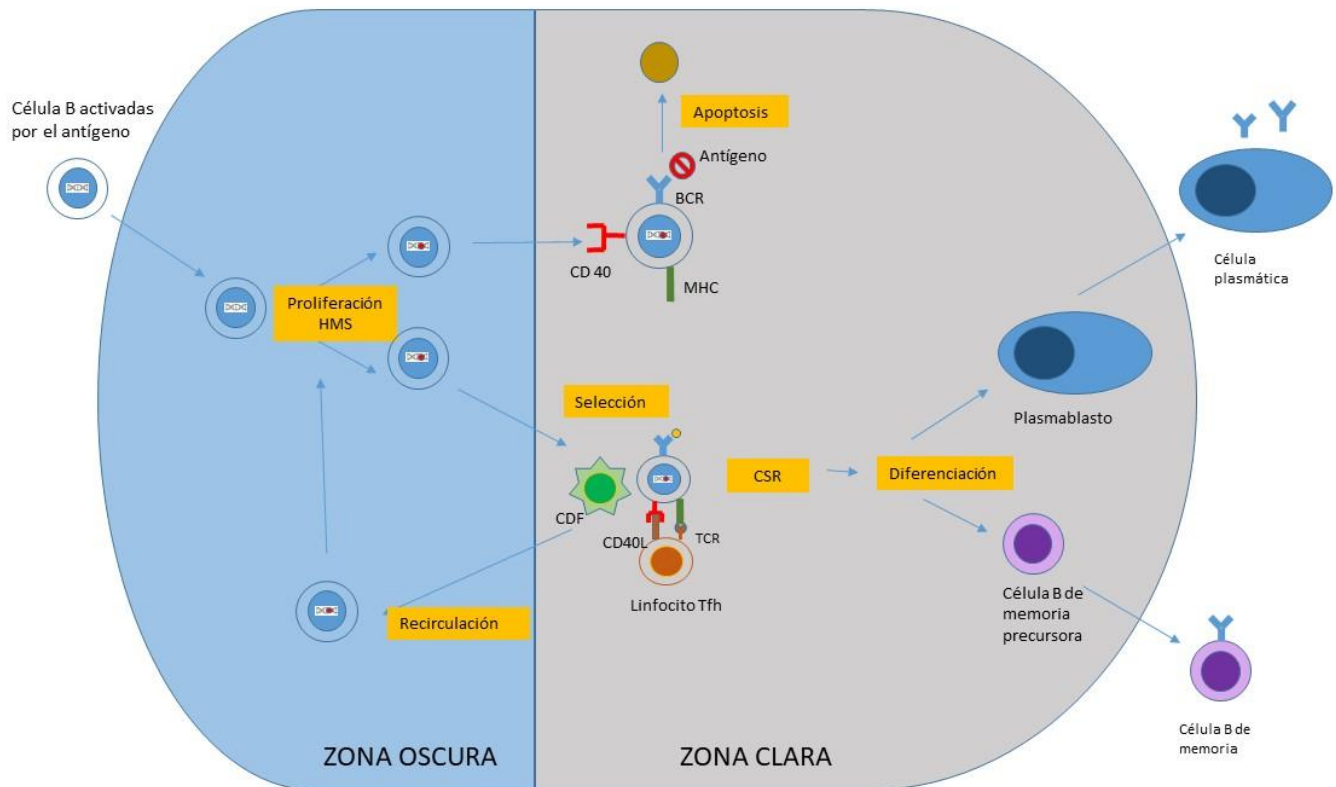


Figura 1: Diferenciación de las células B en el centro germinal. Adaptado de De silva, et al.²⁸

Eventos iniciadores

Actualmente, existe consenso en la teoría de que la célula madura que ha atravesado el centro germinal y ha experimentado hipermutación somática y cambio de isotipo es la que da origen al MM. En la década de 1990 se demostró que las células del MM no expresan el marcador de superficie CD34, específico de progenitores hematopoyéticos³¹. El análisis del repertorio V(D)J evidenció que las células neoplásicas presentan reordenamientos completos tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobulinas, con una tasa de hipermutación somática mayor que la de cualquier otra neoplasia linfóide³²⁻³³. En concordancia con estos hallazgos, se ha demostrado la existencia de selección antigénica del BCR en las células tumorales³⁴. El efecto del cambio de isotipo es evidente en el hecho de que predominen los isotipos IgG e IgA tanto en las gammopatías asintomáticas como en el MM, sin que se encuentre

heterogeneidad de isotipo entre las células tumorales de cada paciente³³. Por lo tanto, es durante la reacción en el centro germinal que la célula plasmática adquiere una de las dos alteraciones “primarias” que la inmortalizan y que se encuentran en todas las células clonales desde los estadios más tempranos: **hiperdiploidía y translocaciones del gen *IgH***.

Aproximadamente la mitad de los casos de MM presentan aneuploidía de varios de los cromosomas impares, incluyendo al 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21, lo que se conoce como **hiperdiploidía**³⁵. La hiperdiploidía es casi siempre excluyente con las **translocaciones de *IgH***³⁶, y los MM hiperdiploides tienden a tener un mejor pronóstico³⁷. Se hipotetiza que la hiperdiploidía es consecuencia de errores de segregación cromosómica durante la rápida proliferación en el centro germinal, pero correspondería a ganancias ocurridas en diferentes marcos temporales más que a un único evento mitótico fallido³⁸. Las **translocaciones de *IgH***, por su parte, resultan en la yuxtaposición del promotor de *IgH* con un oncogen, entre los cuales se incluyen los tres genes codificantes de ciclinas D (*CCND1-3*), *WHSC1*, *MAF* y *MAFB*³⁹. Estas translocaciones resultan de un proceso de cambio de isotipo o hipermutación somática defectuosos durante la activación en el centro germinal³³. Independientemente del evento primario, la sobreexpresión de por lo menos uno de los genes de ciclina D parece constituir un evento temprano y común de las neoplasias de células plasmáticas. Por ejemplo, las translocaciones de *IgH* con *MAF* o *MAFB* resultan en niveles elevados de *CCND2*, la translocación *IgH:WHSC1* resulta en niveles moderadamente elevados de *CCND2*, y los pacientes con hiperdiploidía presentan sobreexpresión de *CCND1* y *CCND2*³⁹.

Numerosos estudios han demostrado que los estadios precursores (GMSI y MQ) comparten las alteraciones “primarias” que caracterizan al MM, es decir hiperdiploidía y translocaciones de *IgH*. Utilizando novedosas estrategias de análisis computacional, se ha estimado que los eventos iniciales de transformación de las células germinales ocurren durante la segunda y tercera década de vida, precediendo por décadas el diagnóstico de GMSI, MQ o MM. Los clones se mantendrían en un estado de lenta proliferación, adquiriendo aberraciones adicionales durante muchos años, hasta ser clínicamente identificados⁴⁰. Mientras las anomalías citogenéticas **primarias**

determinan la transformación maligna de las células plasmáticas normales, las anomalías **secundarias** promueven la progresión de la enfermedad al impulsar la expansión clonal de las células plasmáticas malignas, eventualmente resultando en el desarrollo de síntomas. El hecho de que algunos pacientes con GMSI puedan permanecer clínicamente estables durante años, o incluso no presentar progresión nunca, evidencia que el modelo de evolución del MM no consiste en la acumulación continua de alteraciones hasta la progresión. Ciertos eventos concretos, asociados con fases más avanzadas, ocurren aleatoriamente y de manera subclonal, determinando la progresión a enfermedad sintomática⁴¹.

Perfil genómico del mieloma quiescente

El linfocito B post germinal adquiere una un defecto genético primario (hiperdiploidía, translocaciones del gen *IgH*) en el estadio de GMSI, lo que supone una ventaja clonal y determina la aparición de un clon dominante⁴². Otras alteraciones secundarias (variantes de nucleótido único en la vía de la quinasa activada por mitógenos, alteraciones en las vías de reparación del ADN, variantes estructurales o desregulación de *MYC*, alteraciones en el número de copias y translocaciones) ocurrirían en el estadio de MQ, dando por resultado un perfil genómico similar al descrito en el MM⁴³⁻⁴⁵.

Dos estudios recientes utilizando tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS), describen el perfil genómico de los pacientes con MQ. En ambos casos, los autores concluyen que el paisaje genético del MQ es similar al del MM de reciente diagnóstico. Bustoros et al. utilizaron secuenciación del exoma completo (WES) y secuenciación profunda dirigida para estudiar muestras de 214 pacientes con MQ, con muestras secuenciales analizadas en 5 de los casos⁴⁶. Las translocaciones de *IgH* fueron identificadas en 36% de los pacientes. Las alteraciones en el número de copias (CNAs) resultaron las alteraciones genéticas más frecuentes (88%), con hiperdiploidía en un 55% de los casos, ganancias del brazo largo del cromosoma 1 (1q) y deleciones del brazo largo del cromosoma 13 y del cromosoma 16 (13q y 16q). Las deleciones focales significativas afectaron a las regiones 1p22.1, 6q27, 14q24.3 y 14q32.31. Las variantes de nucleótido único (SNVs) en genes característicamente mutados en MM estaban

presentes en un 55% de los pacientes: 46% presentaban alteraciones en *MAPK*, 10% en genes involucrados en la reparación del ADN (incluyendo *TP53*), 22% en *NFkB*, 21% en el procesamiento de proteínas y 6% en vías de ciclo celular. Un 6% de los pacientes presentaron eventos bialélicos afectando *TP53*, *RB1*, *CDKN2*, *ZNF292*, *DIS3* o *FAM46C*. El grado de clonalidad de las alteraciones genéticas descritas en esta cohorte sugieren que las CNAs son eventos fundacionales o tempranos, excepto para del(17p) y del(1p), que resultaron mayormente subclonales. Por el contrario, las mutaciones en la vía de las MAPK constituyeron mayormente eventos tardíos asociados con la progresión tumoral. Boyle et al.⁴⁷ analizaron mediante NGS una cohorte de 82 pacientes con MQ (9 de ellos con muestras secuenciales), comparando los hallazgos con 223 MM estudiados de manera similar. La frecuencia de translocaciones de *IgH* en MQ (35%) fue similar a la hallada en los pacientes con MM (37%). Las lesiones genéticas consideradas de mal pronóstico resultaron menos frecuentes en el MQ: t(4;14), reordenamientos de *MYC*, del(1p), del(8p), del(14q), del(16q) y del(17p). Las mutaciones de *FAM46C* y *NRAS* también fueron menos frecuentes en MQ con respecto a MM, sugiriendo que estas alteraciones podrían constituir eventos que identifiquen pacientes en transformación. Las alteraciones en la vía de MAPK y NFkB también resultaron menos frecuentes en los pacientes con MQ, así como también las lesiones bialélicas en genes supresores de tumores. Este último hallazgo podría sugerir que estos *second-hits* son quizá eventos asociados a la transición a MM.

Mecanismos moleculares de progresión

Un hallazgo común de los diferentes estudios que utilizaron tecnología NGS para analizar muestras pareadas de pacientes en los estadios de GMSI/MQ y de MM, es la presencia de heterogeneidad clonal y subclonalidad en los estadios asintomáticos más tempranos, con la mayor parte de las poblaciones subclonales involucradas en la progresión a enfermedad sintomática ya presentes al momento del diagnóstico^{43,45-48}. No existen diferencias significativas en el número de alteraciones genómicas entre los pacientes que progresan y los que permanecen estables, o entre las formas asintomáticas y el MM.

Más bien, el patrón de asociación o la combinación de determinadas alteraciones genéticas parece ser el determinante del riesgo a desarrollar enfermedad sintomática.

Analizando 53 muestras secuenciales de 9 pacientes con MQ (6 de los cuales progresaron durante el seguimiento), Boyle et al. sugirió que mientras la hiperdiploidía, uno de los principales eventos iniciadores del MM, es estable y no tiene un impacto en el tiempo a la progresión, las ganancias y pérdidas segmentarias son mecanismos claves en la transición al MM⁴⁷. La monitorización de la arquitectura subclonal en múltiples muestras secuenciales demostró un aumento de la diversidad con el tiempo, con una evolución en ramas como el principal mecanismo de progresión. Cambios significativos en la arquitectura subclonal precedieron eventos de relevancia clínica y, según los autores, podría ayudar a identificar aquellos pacientes que requieren tratamiento en un momento precoz de la transformación cuando el cociente beneficio/riesgo del mismo es máximo.

El estudio de Bolli et al, analizando muestras pareadas de 11 pacientes con MQ al momento del diagnóstico y en el momento de progresión a enfermedad sintomática, es el primero basado en la secuenciación del genoma completo (WGS)⁴⁸. Todos los casos eran considerados de alto riesgo, de acuerdo a criterios previos a 2014, con una mediana de tiempo de progresión a enfermedad sintomática de 8 meses. La tecnología de WGS reveló un mayor enriquecimiento en alteraciones genéticas (mutaciones, cambios en el número de copias, reordenamientos) en comparación con los estudios que utilizaron WES. Si bien el número de SNVs e inserciones/deleciones fue similar entre el estadio de MQ y MM sintomático, para muchas alteraciones se registró un importante cambio en la CCF (*cancer cell fraction*), y muchas alteraciones se perdieron o fueron adquiridas, sugiriendo la existencia de una competición dinámica entre subclones durante la progresión. El análisis de las muestras pareadas reveló dos patrones principales de evolución a enfermedad sintomática. Los pacientes con un patrón “**estable**” presentan un paisaje genético similar entre los estadios de MQ y MM; estos pacientes tienen biológicamente un MM precoz y desarrollan daño de órgano con el aumento de la masa tumoral. En contraste, los pacientes con un modelo de evolución “**espontáneo**” representan un ejemplo de evolución darwiniana, donde la adquisición de alteraciones

genéticas adicionales confiere una ventaja proliferativa a uno de los subclones, llevando a una arquitectura clonal cambiante al progresar de MQ a MM. En este caso, el tiempo a la progresión sería más largo al ser necesario adquirir aberraciones genéticas adicionales para alcanzar el estadio de MM (**Figura 2**).

Los estudios utilizando tecnología de NGS han ayudado a delinear firmas mutagénicas que caracterizan a los diferentes estadios evolutivos de la enfermedad. Si bien los mismos procesos mutagénicos se encuentran ya operativos desde los estadios asintomáticos, la firma asociada a una actividad aberrante de AID (deaminasa inducida por activación) contribuiría principalmente a la iniciación tumoral en la célula post-germinal, mientras que otros procesos (deaminasa APOBEC) actuarían sobre ese terreno fértil para dar forma al paisaje genómico que caracteriza a la enfermedad sintomática. De esta manera, la firma mutagénica APOBEC se encuentra enriquecida en pacientes asintomáticos que luego progresan, aumenta con la progresión de GMSI a leucemia de células plasmáticas, y es particularmente activa en casos de MM con un comportamiento clínico agresivo^{38,47,48}.

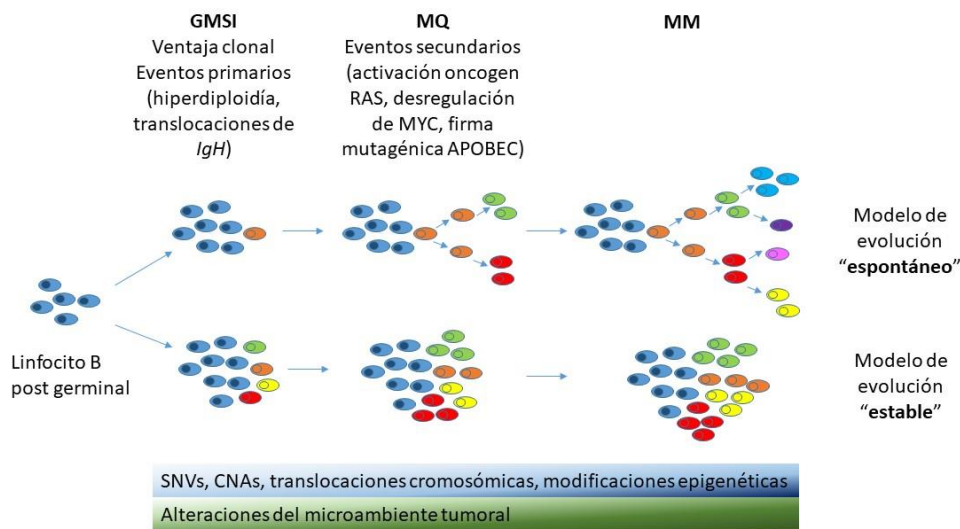


Figura 2. Patrones de evolución a enfermedad sintomática de las gammopatías. Adaptado de Visram A, et al.⁴⁹

Microambiente tumoral

Una limitación de los estudios genómicos es que se centran en la célula tumoral y no toman en consideración las complejas interacciones con el microambiente. No todos los pacientes con GMSI o MQ y un perfil genético similar progresan a MM. Las alteraciones moleculares asociadas con estadios avanzados de la enfermedad están muchas veces presentes en subclones en los estadios precursores, sugiriendo que factores extrínsecos pueden determinar el balance entre la latencia y la progresión a enfermedad sintomática. En este contexto, el sistema inmune tiene un gran impacto en la determinación de este balance. Este hecho ya ha sido puesto de manifiesto en varios tumores sólidos en los que cambios cuantitativos y cualitativos del microambiente inmune y estromal se asocian diferentes subtipos tumorales, con diferente pronóstico y respuesta al tratamiento⁵⁰⁻⁵².

Una demostración directa del papel del microambiente en la progresión de las gammapatías asintomáticas surgió del estudio en modelos de ratones⁵³, en los cuales injertos de pacientes con gammapatías asintomáticas mostraron crecimiento progresivo, sugiriendo que la estabilidad clínica de estas entidades podría estar determinada en parte por una restricción del crecimiento tumoral ejercida por el microambiente. De forma interesante, la progresión ocurrió tras la adquisición de predominancia de un subclon minoritario en el injerto. Este hallazgo es un ejemplo de cómo el paisaje genómico heterogéneo de las gammapatías se adapta al microambiente en un juego dinámico requerido para la progresión tumoral. Este concepto fue apoyado también por un estudio realizado a partir de biopsias simultáneas en pacientes con MM de reciente diagnóstico⁵⁴, que reveló una importante heterogeneidad entre lesiones espacialmente separadas, posiblemente reflejando la influencia de diferentes contextos microambientales en la selección de subclones de las células tumorales. La modificación de la presión evolutiva que ejerce el microambiente con fines terapéuticos, evitando que un subclon más activo adquiriera un papel predominante y determine la aparición eventual de síntomas, es un desafío importante para el futuro.

En 1889 Stephen Paget introdujo la hipótesis “semilla y tierra”, que postulaba que las células tumorales (semilla) crecen preferiblemente en microambientes seleccionados (tierra). De esta manera, las células plasmáticas que sufrieron alteraciones genéticas en el centro germinal llegan a la médula ósea, donde tienen acceso a una gran variedad de señales del microambiente que favorecen su supervivencia. El nicho medular es el principal lugar de residencia de las CP de larga vida, y la supervivencia de las CP normales y neoplásicas depende de la compleja interacción entre componentes celulares, las proteínas de la matriz extracelular (MEC) y los factores solubles⁵⁵.

Aunque no se ha demostrado, es probable que las CP normales y neoplásicas utilicen los sinusoides de la MO como puerta de entrada, de manera similar a los que hacen las células progenitoras hematopoyéticas. Una de las moléculas principales en mediar el anidamiento, alojamiento y la retención de las CP, tanto normales como transformadas, es el receptor de quimiocinas CXCR4, que interactúa con CXCL12, una quimiocina altamente expresada en la MO⁵⁶⁻⁵⁷. El bloqueo de la interacción CXCL12-CXCR4 con el inhibidor plerixafor (AMD300), interrumpe el contacto de las células de MM con el microambiente medular, y determina su movilización hacia la circulación⁵⁸. Entre otros efectos, la interacción de CXCL12 con CXCR4 en la superficie de las células de MM activa la integrina $\alpha 4\beta 1$, permitiendo su unión al ligando VCAM-1 expresado en la microvasculatura medular⁵⁹. Este evento de adhesión representa un paso clave en el tráfico de las células de MM hacia el microambiente de la MO y probablemente también en su recirculación. La unión de las células de MM a la microvasculatura de de la MO también está mediada por P y E-selectina y sus ligandos. La P-selectina ligando (SELPLG) se expresa en la superficie de las células de MM y juega un rol importante en las interacciones iniciales de las células de MM con el endotelio, facilitando el rodamiento de las células plasmáticas malignas sobre la P-selectina expresada por la microvasculatura^{59,60}.

Nicho medular

Matriz extracelular

El microambiente de la médula ósea provee una estructura (la matriz extracelular, MEC) que actúa como los “cimientos” para las células de mieloma. La MEC está constituida por proteínas como fibronectina, colágeno, osteopontina, ácido hialurónico y laminina. Se ha demostrado que la adhesión de las células tumorales es importante para su supervivencia y la resistencia a fármacos. Un mecanismo de adhesión célula-MEC está mediada por la activación de integrinas, y las células de mieloma muestran preferencia por las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\beta 7$ ⁶¹. La unión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ a la fibronectina de la MEC induce la activación de NF κ B, resultando en mecanismos de resistencia a drogas mediados por adhesión celular y a señalización pro-supervivencia⁶². La integrina $\beta 7$ puede ser regulado por el gen *MAF*, por lo que los pacientes con la t(14;16) presentan niveles elevados de integrina $\beta 7$ ⁶³. Esta molécula es necesaria para la supervivencia de las CP transformadas y también juega un papel en la resistencia a drogas mediada por adhesión celular, con activación constitutiva en las células tumorales^{61,64}. Otras integrinas como integrina $\alpha 5\beta 1$ y NCAM1 también son activas en la progresión tumoral⁶⁵.

Syndecan-1 (CD138) es un proteoglicano heparán sulfato y un marcador de superficie de las CP. Se une al colágeno de tipo I e induce la expresión de la metaloproteinasa de la matriz 1 (MMP1), promoviendo la invasión tumoral, la resorción ósea y la angiogénesis⁶⁶. Adicionalmente, los niveles de syndecan-1 se correlacionan con la supervivencia y crecimiento celulares⁶⁷. La heparinasa tiene interacciones complejas con syndecan-1, causando tanto su agrupación y el aumento de la adhesión a la MEC, como también su liberación en forma soluble^{68,69}. La forma soluble de syndecan-1 promueve el crecimiento de las células tumorales in-vivo⁷⁰. CD44, HMMR son receptores del ácido hialurónico, una proteína “andamio” secretada en la médula ósea. Ambas proteínas regulan el eje CXCL12/CXCR4, y están involucrada en la motilidad celular⁷¹. CD38 es otro ligando del ácido hialurónico expresado en altos niveles por las CP, lo que

lo convierte en una diana efectiva de inmunoterapias utilizadas en el tratamiento del MM (daratumumab e isatuximab).

Células estromales

La unión de la integrina $\alpha4\beta1$ de las células de MM al VCAM1 de una célula estromal adyacente promueve vías de señalización que activan NFkB, mediando la supervivencia y la proliferación celular⁶⁶. Otro de los receptores de las células tumorales, LFA-1, se une al ICAM1 de las células adyacentes del estroma. Este receptor es una integrina asociada con progresión y mal pronóstico, así como también aumento de la proliferación en modelos murinos⁷². La mucina 1 (MUC1) es otra proteína transmembrana que se une al ICAM1, que ha demostrado estar involucrada en la progresión del MM. MUC1 induce la proliferación, utilizando la señalización vía B-catenina/TCF4 para aumentar la expresión del gen *MYC*⁷³.

Las células plasmáticas también expresan CD28, una proteína transmembrana conocida por la co-estimulación de linfocitos T. Durante este proceso, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de una célula presentadora de antígenos (APC) se une primero al receptor de los linfocitos T. El linfocito T no se activa del todo hasta que el CD80/86 de la APC se une al CD28, induciendo la supervivencia, proliferación y funciones efectoras del linfocito T. Las CP retienen la capacidad pro-supervivencia de la señalización vía CD28, y la unión al CD80/86 de las células estromales de la MO (por ejemplo, las células dendríticas) media la supervivencia de las células plasmáticas de larga supervivencia durante años^{74,75}. Las células plasmáticas normales y neoplásicas dependen de la activación mediada por CD28 de las vías de señalización de PI3K. Los modelos murinos knock-out de CD28 presentan disminución de la producción de anticuerpos producidos por las CP de larga supervivencia, y la eliminación de CD28 y CD86 con ARN de interferencia lleva a la muerte de líneas celulares de mieloma⁷⁵⁻⁷⁸.

Citoquinas

Las células del mieloma también favorecen su supervivencia y proliferación induciendo la secreción de citoquinas por parte de las células estromales. La unión directa de las CP a las células estromales activas vías como MAPK, NOTCH y PI3K, determinando la transcripción y secreción de numerosas citoquinas. Una de esas citoquinas es la interleuquina 6 (IL-6), involucrada con el crecimiento, supervivencia, migración y resistencia a drogas en el MM. IL-6 se une a su receptor (IL-6R) y activa las vías MEK/MAPK, JAK/STAT, y PI3K/AKT⁷⁹. También aumenta la dependencia de Mcl-1, una proteína antiapoptótica de la familia de Bcl-2 esencial para la supervivencia de células plasmáticas normales y neoplásicas. IL-6, vía STAT3, induce la fosforilación de Bim, que aumenta su afinidad por Mcl-1 en detrimento de Bcl-2/Bcl-x, con la consecuente estabilización de Mcl-1^{80,81}.

En ausencia de IL-6, otras dos citoquinas, BAFF y APRIL, han demostrado tener un efecto protector para las células de mieloma, especialmente bajo tratamiento con corticoides⁸². BAFF es un miembro de la familia de TNF (factor de necrosis tumoral) y se expresa en la superficie de las células estromales, existiendo también una forma escindida soluble. Esta molécula estimula el crecimiento de las células B, y la unión a sus receptores BAFF-R y TACI determina un incremento en la proliferación y supervivencia de las células de mieloma⁸³. APRIL es una proteína secretada que se une a TACI y a BCMA, una proteína actualmente utilizada como diana de terapias de linfocitos T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T) para el mieloma. La señalización mediada por BAFF y APRIL también determina estímulos para el crecimiento y la supervivencia de las células de MM por parte de las células dendríticas circundantes⁸⁴. Los receptores de estas dos citoquinas (BCMA, TACI and BAFF-R) se encuentran sobreexpresadas en las CP neoplásicas en comparación con las normales, subrayando su importancia en la fisiopatogenia de la enfermedad⁸². Además de promover el crecimiento de las células mielomatosas (vía MAPK y NFkB), la vía APRIL/BCMA también determina el aumento de expresión de moléculas inmunosupresoras (PD-L1, TGF-beta, e IL-10)⁸⁵.

Otro miembro de la familia TNF involucrado- en el crecimiento y supervivencia de las células de MM en la MO es TNF-alfa. TNF-alfa es un mediador de inflamación y se encuentran niveles significativamente más elevados en pacientes con enfermedad ósea⁸⁶. Mientras que la señalización mediada por TNF-alfa induce un aumento moderado en la proliferación celular, también aumenta la expresión de moléculas de adhesión que median la unión a las células del estroma, así como también la secreción de IL-6. Los niveles de TNF-alfa disminuyen con el tratamiento con drogas inmunomoduladoras como la talidomida, lo que podría explicar parte de su mecanismo de acción en el MM⁸⁷.

Las células de MM inducen la secreción de numerosos factores de crecimiento por parte de las células del estroma. Entre ellos, el IGF (factor de crecimiento similar a la insulina) estaría involucrado en el anidamiento, la proliferación, la supervivencia de las células de MM⁸⁸. IGF también está implicado en la resistencia a los citotóxicos, a la dexametasona y a los inhibidores de proteasoma⁸⁹. Las células del estroma también producen otros factores de crecimiento como HGF, bFGF y VEGF, que tienen influencia en la activación de los osteoclastos y la angiogénesis⁶⁶.

Osteoclastos

Las lesiones óseas que caracterizan al MM resultan de la activación osteoclástica, y generan espacio para la proliferación de las células neoplásicas. Para activar directamente a los osteoclastos, las células de MM secretan MIP-1alfa y MIP-1beta. MIP-1alfa se une a CCR1 y CCR5, mientras que MIP-1beta se une a CCR5 y CCR8, para inducir la formación y la activación de osteoclastos⁹⁰⁻⁹². Se ha demostrado que MIP-1alfa induce destrucción ósea, adhesión al estroma y aumento de la masa tumoral en modelos murinos⁹⁰. A su vez, los osteoclastos secretan IL-6 para estimular la proliferación y el crecimiento no solo de las células de MM, sino también de otros osteoclastos⁹³. La interacción entre el MM y los osteoclastos también determina la regulación en alza de CHSY1, que induce la señalización vía NOTCH y promueve la supervivencia de las células

de MM⁹⁴. La señalización vía NOTCH, particularmente NOTCH3 y NOTCH4, lleva al reclutamiento de precursores de osteoclastos y al aumento de la resorción ósea⁹⁵.

Las citoquinas que estimulan la osteoclastogénesis también surgen de la interacción entre las células de MM y las células del estroma. La unión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ con VCAM promueve la secreción de citoquinas como IL-1, IL-6, TNF-alfa y PTHLH, que promueven el crecimiento de los osteoclastos. La unión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y VCAM también determina la producción por parte de las células estromales de RANKL. RANKL se une a su receptor RANK para estimular la diferenciación y activación de los osteoclastos, con la consecuente lisis ósea⁹⁶. La glicoproteína de la matriz ósea osteopontina y la citoquina proinflamatoria IL-17 también han sido implicadas en la osteoclastogénesis y la resorción ósea. Ambas se asocian a peor pronóstico y a lesiones óseas en los pacientes con MM⁹⁷.

Osteoblastos

Las células de MM también afectan la homeostasis ósea inhibiendo la producción y activación de los osteoblastos. Los osteoblastos y las células del estroma producen osteoprotegerina (OPG), que inhibe el desarrollo de enfermedad ósea compitiendo con RANKL por la unión a RANK⁹⁸. La unión de OPG con RANK previene la maduración y la activación de los osteoclastos⁹⁹. La relación entre RANKL y OPG es un indicador pronóstico y puede ser influido de varias maneras¹⁰⁰. Una de esas maneras es la unión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ de las células de MM al VCAM de las células estromales, lo que disminuye la secreción por parte de estas últimas de OPG y aumenta la secreción de RANKL, inclinando la balanza a favor de los osteoclastos¹⁰¹. Otros factores que aumentan la proporción RANKL/OPG son la esclerostina y la activina A. La esclerostina es una glicoproteína que induce apoptosis en osteoblastos e inhibe la formación ósea¹⁰². La activina A, un miembro de la familia TGF-beta, aumenta la señalización a través de varias vías para promover la diferenciación de los osteoclastos, y es un marcador de mal pronóstico¹⁰³. Los efectos de IL-3, una citoquina que se encuentra aumentada en pacientes con MM y estimula la proliferación de células de MM y osteoclastos al mismo

tiempo que inhibe la génesis de osteoblastos, estarían mediados por un aumento en la producción de activina por parte de los monocitos/macrófagos de la MO¹⁰⁴.

Las células de MM también pueden prevenir la maduración de los progenitores de osteoblastos. La unión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ de las células de MM al VCAM de los progenitores osteoblásticos disminuye la actividad de RUNX2, factor de transcripción necesario para la diferenciación de los osteoblastos¹⁰⁵. Además de aumentar la proporción RANKL/OPG, la secreción de IL-7 por parte de las células estromales también disminuye la actividad de RUNX2 y la diferenciación de los osteoblastos⁹⁷.

La secreción de las citoquinas DKK1 y SFRP2 por parte de las células de MM también contribuyen a la resorción ósea. DKK1 y SFRP2 inhiben la vía canónica de Wnt, que es responsable de la diferenciación de los progenitores de osteoblastos^{105,106}. Ambas citoquinas inhiben la diferenciación de los osteoblastos y suprimen la mineralización ósea *in vitro*^{107,108}. Adicionalmente, la secreción de TGF-beta y HGF por parte de las células estromales promueven la generación de osteoclastos mientras limitan la actividad de los osteoblastos¹⁰⁹.

Células endoteliales

Los pacientes con enfermedad progresiva muestran un aumento en la densidad de microvasos, una medida de la angiogénesis, cuando se los compara con pacientes con GMSI¹¹⁰. Las células de MM se multiplican en el microambiente de la MO y generan tumores hipóxicos, estimulando la angiogénesis para mantener la disponibilidad de oxígeno y la remoción de catabolitos. En condiciones de hipoxia, las células de MM regulan al alza el HIF1A, que modifica la transcripción de citoquinas proangiogénicas incluyendo HGF, bFGF, VEGF y ANG2. Las células de MM también pueden producir constitutivamente estas citoquinas, debido a mutaciones genéticas o activación de oncogenes¹¹¹.

La adhesión de las células de MM a la MEC aumenta la angiogénesis. La expresión de moléculas de adhesión integrina $\alpha 4\beta 1$, LFA-1 y CD44 ha demostrado correlacionarse con

aumento de la angiogénesis en el MM¹¹². Syndecan-1 también ha demostrado ser crucial en la angiogénesis medular; se relaciona con la densidad de microvasos y facilita la unión de factores de crecimiento, particularmente HGF, a las células. En su forma soluble, esta molécula puede unirse en al HGF para aumentar su potencia¹¹³. Las células de MM también facilitan la degradación de la MEC utilizando metaloproteinasas y heparinasa para permitir la migración de las células endoteliales al tejido circundante¹¹⁴.

Las células de MM estimulan a las células estromales para que secreten HGF, VEGF e IL-8 para inducir neovascularización¹¹⁵. A su vez, las células endoteliales producen IGF1 e IL-6 para promover el crecimiento de las células neoplásicas. Este proceso puede inducir un ciclo autócrino donde las mismas células endoteliales producen VEGF, Ang1 e HGF para promover la angiogénesis^{116,117}.

Microambiente inmune

Estudios previos han confirmado que el microambiente inmune en el MM presenta desregulación en la señalización de distintos receptores y en la expresión de citoquinas¹¹⁸, así como alteraciones cuantitativas en los linfocitos T, NK y células dendríticas¹¹⁹⁻¹²¹. El MM induce un estado de inmunosupresión con expansión de linfocitos T reguladores (Tregs)^{122,123}, células mieloides supresoras (MDSCs)^{124,125}, macrófagos asociados a tumor^{126,127} y disfunción de linfocitos NK. Las alteraciones en el microambiente inmune del MM han sido asociadas con reducción de la respuesta inmune antitumoral, inducción de angiogénesis, resistencia a la quimioterapia y progresión de la enfermedad^{123, 127-129}.

Células mieloides supresoras

En los últimos años las MDSCs, un grupo heterogéneo de células inmaduras que pueden dividirse en granulocíticas (PMN-MDSCs) y monocíticas (M-MDSCs), han emergido como reguladores inmunes negativos en infección, enfermedades autoinmunes, sepsis y cáncer. Las MDSCs se acumulan en la MO de pacientes y modelos murinos de MM, y su

cantidad se correlaciona con el estadio de la enfermedad y el pronóstico^{125, 130-132}. Un estudio demostró que niveles reducidos de PMN-MDSCs se asociaban con una menor formación de vasos sanguíneos, y que las M-MDSCs a su vez podían funcionar como precursores de osteoclastos, favoreciendo la progresión tumoral¹³³. Estos resultados sugieren que las diferentes subpoblaciones de MDSCs cumplirían diferentes papeles en el microambiente tumoral, y que podrían constituir dianas terapéuticas con la finalidad de modular la angiogénesis y las lesiones óseas en el MM.

Los modelos murinos de MM han servido para estudiar los efectos de la acumulación de MDSCs a nivel medular, lo que se acompaña de una inhibición de la citotoxicidad antitumoral y una disminución de los linfocitos T CD4+ Th1. En un modelo *knock-out* deficiente en su capacidad de acumular MDSCs en la MO (S100A9) pudo reestablecerse la inmunidad anti-tumoral, desacelerando la progresión de la enfermedad¹²⁵. Otro demostró que las CP neoplásicas y las MDSCs interactúan en el nicho medular favoreciéndose mutuamente. Mientras que las células de MM promueven el desarrollo y supervivencia de las MDSCs, las MDSCs generan un ambiente protector al inducir anergia de los linfocitos T CD8+ y NK. Este efecto es mediado por factores solubles secretados por las MDSCs, como la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la arginasa (ARG1), especies reactivas de oxígeno (ROS) y citoquinas inmunosupresoras como IL-6 e IL-10. Este estudio también demostró que la expresión de estas citoquinas podía ser disminuida utilizando terapias actualmente utilizadas para el MM como el bortezomib o la lenalidomida, que sin embargo no disminuyeron el número de MDSCs funcionales¹³⁰. Otros estudios sí demostraron una disminución en la frecuencia de MDSCs con los mismos agentes, y que los efectos supresores asociados a este subtipo celular pueden ser reducidos, retrasando la progresión del MM y mejorando la respuesta a quimioterapia^{134,135}. Si bien los efectos de las terapias actualmente disponibles en las MDSCs del MM no están claros, la depleción de las MDSCs podría representar una manera de revertir la inmunosupresión asociada al MM, aumentando el efecto antitumoral de las terapias actualmente utilizadas.

Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas que juegan un papel crucial en la eliminación de patógenos y en la reparación tisular. Se clasifican en dos fenotipos principales: M1 y M2. En el nicho tumoral, los macrófagos M1 o “pro-inflamatorios / clásicamente activados” expresan niveles altos de MHC clase II y actúan como agentes antitumorales segregando citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico. Los macrófagos M2 o “anti inflamatorios / alternativamente activados”, por el contrario, tienen actividad inmunosupresora que favorece la progresión tumoral, caracterizada por una expresión elevada de CD163, CD206, arginasa, y por la producción de IL-10, VEGF y metaloproteinasas de la matriz (MMP)^{136,137}. La polarización M1/M2 depende de las señales de activación presentes en el entorno: las citoquinas Th1 como el IFN gamma y los productos bacterianos, incluyendo a los lipopolisacáridos, promueven la diferenciación M1, mientras que las citoquinas Th2 como IL-10 y los glucocorticoides, promueven la diferenciación de los macrófagos al fenotipo M2. Durante la progresión tumoral, los macrófagos M1 pueden perder gradualmente sus propiedades antitumorales y adquirir un fenotipo M2, constituyendo lo que se conoce como TAM (macrófagos asociados a tumor). El protagonismo de los TAM en el desarrollo del cáncer está ampliamente estudiado, y han demostrado potencial como biomarcadores pronósticos y como diana terapéutica¹³⁸.

En el MM, varios estudios han establecido una correlación entre la infiltración medular por macrófagos M2 y un curso clínico más agresivo, una menor supervivencia y peor respuesta al tratamiento^{139,140}. La citoquina CXCL12 segregada por las células de MM es capaz de atraer monocitos al nicho tumoral. Al mismo tiempo las células estromales, por su cuenta o mediante la interacción con las células neoplásicas, pueden aumentar el reclutamiento de monocitos y favorecer su diferenciación hacia un fenotipo M2. El eje CXCR4/CXCL12 parece ser crucial para este proceso, ya que la neutralización de CXCR4 inhibiría el reclutamiento de los monocitos. El fenotipo M2 se asocia a supresión de linfocitos T, angiogénesis, crecimiento tumoral y quimioresistencia¹⁴¹. La evidencia actual parece indicar, por lo tanto, que la infiltración medular por macrófagos con un

fenotipo antiinflamatorio se asociaría a un peor pronóstico y a una peor respuesta al tratamiento.

Los macrófagos medulares mantendrían, sin embargo, su capacidad antitumoral; la “reprogramación” podría constituir una aproximación terapéutica atractiva. Los macrófagos pueden actuar como células presentadoras de antígeno (APC), exponiendo antígenos de MM que activan linfocitos CD4+ Th1 y favoreciendo la diferenciación macrofágica al fenotipo M1 mediante IFN gamma. Estos macrófagos M1 inducen la muerte tumoral mediante la activación de vías apoptóticas intrínsecas, y segregan CXCL9 y CXCL10, dos quimioquinas que frenan el desarrollo tumoral. En modelos murinos con xenoinjertos tumorales, el tratamiento con GM-CSF (pro M1) y 4-IPP (inhibidor de M2) demostró la posibilidad de reprogramar los macrófagos hacia un fenotipo M1, con un efecto tumoricida¹⁴².

En resumen, los macrófagos son esenciales en el establecimiento y progresión del MM, y pueden ser manipulados por las células tumorales para su beneficio. Sin embargo, la posibilidad de “reprogramarlos” constituye una potencial herramienta terapéutica que está siendo estudiada.

Células dendríticas

Numerosos investigadores han estudiado las alteraciones cuantitativas, fenotípicas y funcionales de las células dendríticas (DCs) en los pacientes con MM. Se han descrito diferencias significativas en el número de DCs circulantes entre individuos sanos y pacientes con MM, con una reducción de aproximadamente el 50% en DCs mieloides (mDCs, BDCA1+) y plasmocitoides (pDCs, BDCA2+)¹⁴³. A nivel del nicho medular, sin embargo, la progresión de estadios asintomáticos a MM y el aumento de la carga tumoral parece acompañarse de una acumulación de mDCs y de pDCs¹²¹.

Además de los cambios numéricos, se han observado alteraciones fenotípicas significativas en las DCs de los pacientes con MM. Por ejemplo, se ha descrito una

disminución en la expresión de CCR5 (migración de DCs inmaduras a los sitios de inflamación), CCR7 (migración de las DCs maduras a los órganos linfoides secundarios) y DEC-205 (presentación de antígenos) en las DCs presentes en la sangre periférica (SP) de pacientes con MM. La menor expresión de HLA-DR y moléculas co-estimuladoras como CD80/86 y CD40 indicaría que estas DCs se encuentran en un estado inmaduro asociado con una menor capacidad de presentación de antígenos. Las pDCs de pacientes con MM muestran una producción insuficiente de IFN-gamma, indispensable para establecer una adecuada respuesta inmune de tipo innato. Como resultado de estas alteraciones, la activación y proliferación de los linfocitos T es insuficiente, lo que se asocia a una respuesta inmune inefectiva¹⁴⁴.

Las alteraciones fenotípicas y deficiencias funcionales (alteración en la diferenciación, maduración y activación) descritas en las DCs de los pacientes con MM están influenciadas por citoquinas inhibitorias presentes en el microambiente tumoral. Las citoquinas más frecuentemente involucradas son TGF-B1, VEGF, IL-6 e IL-10. Estos factores pueden inducir hiperactivación de las vías STAT3 y ERK, alterando la diferenciación de las DCs^{145,146}. TGF-B1 e IL-10, ambas secretadas por las células de MM, serían responsables de la disminución de CD80/86 durante la maduración de las DCs¹⁴⁷. IL-6, a su vez, promueve la diferenciación de los precursores CD34+ en monocitos en vez de DCs, regulando al alza CD14 y disminuyendo CD1a, HLA-DR, CD40 y CD80¹⁴⁸. Se han confirmado los efectos inhibidores de las citoquinas derivadas del tumor IL-6, IL-10 y TGF-B1 en la maduración y función de las DCs, utilizando un modelo murino. Este bloqueo de la maduración resultó en una expresión reducida de moléculas MHC y factores co-estimuladores en la superficie de las DCs, con una capacidad insuficiente para determinar respuestas de los linfocitos T¹⁴⁹.

Las DCs parecen jugar un papel dual en el microambiente del MM: por un lado, activan linfocitos T CD8+ citotóxicos contra las células tumorales mediante la fagocitosis de células plasmáticas apoptóticas; por otro, son capaces de proteger a las células de MM del ataque de los linfocitos T CD8+ al regular a la baja subunidades del proteasoma a través de un mecanismo contacto dependiente que involucra al eje CD28-CD86/CD80^{121,150}. Recientemente, se han identificado alteraciones contacto

dependientes entre las pDCs y las células de MM, responsables de la proliferación tumoral y la inmunosupresión. El co-cultivo de pDCs y células de MM llevó a un aumento en la expresión de CD73, TLR7/9, HDAC6, PD-L1, IL-3R alfa y una reducción en la expresión de CASP3, BAK1, ADAM33 y BAD en las células tumorales. Estos hallazgos permiten la identificación de nuevas dianas para el diseño de inmunoterapias: el bloqueo de CD73 permitió reactivar la actividad de los linfocitos T CD8+ contra las células de MM, y de la misma manera el bloqueo de la interacción con CD28 utilizando un antagonista (CTLA-4-Ig) podría evitar el escape inmune mediado por pDCs^{121,151}.

Linfocitos T y NK

De los componentes celulares del microambiente tumoral, los linfocitos T son los más ampliamente estudiados en la génesis y progresión del cáncer. Las células de MM presentan una serie de alteraciones genéticas que las distinguen de las células normales a nivel proteico, lo que permite la inducción de una respuesta inmune por parte de los linfocitos T reactivas al tumor. Sin embargo, la respuesta es evadida por las células tumorales, que desactivan las funciones efectoras de los linfocitos T utilizando un espectro de mecanismos inmunosupresores.

Se han descrito alteraciones cuantitativas y funcionales de los linfocitos T en los pacientes con MM, incluyendo una disminución en el número de linfocitos CD4+ y CD8+, anomalías en el cociente Th1/Th2 y respuestas inmunes dependientes de linfocitos T deficientes¹⁵². Estas alteraciones se han encontrado incluso en los estadios precursos de la enfermedad. Por ejemplo, pacientes con GMSI demostraron niveles elevados de linfocitos T exhaustos y de Tregs¹⁵³. En pacientes con MQ, se encontró una reducción en la expresión de marcadores de activación en comparación con individuos sanos, incluyendo CD25, CD28 y CD54¹⁵⁴. Estas alteraciones fenotípicas se profundizan con la progresión de la enfermedad¹⁵⁵.

Las células de MM son capaces de evitar las funciones efectoras de los linfocitos T a través de distintos mecanismos: defectos en la secreción de citoquinas, pérdida de la capacidad de proliferación, disminución de la citotoxicidad, actividad alterada de

factores de transcripción como T-bet y expresión de *immune checkpoints* inhibidores (ICIs) entre los que se incluyen PD-1 (*programmed cell death protein 1*), Lag-3 (*lymphocyte-activation gene 3*), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) y TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*)¹⁵⁶. La señalización a través de los ICIs es un mecanismo clave para regular el balance entre activación y tolerancia que, si alterado, puede determinar el escape de la vigilancia inmune. PD-L1, ligando de PD-1, es expresado por las células de MM, especialmente en las recaídas, y PD-1 se encuentra sobreexpresado en linfocitos T y NK de pacientes con MM, que presentan además un fenotipo senescente¹⁵⁷. A pesar de los datos preclínicos y los resultados de los ensayos clínicos utilizando un inhibidor de PD-1 en otros tipos de tumores, la experiencia en el caso del MM no ha sido satisfactoria^{158,159}. Por otro lado, estudios recientes en modelos murinos (Vk*MYC) demostraron que la carga tumoral de MM se correlaciona con el porcentaje de linfocitos CD8+ TIGIT+, y que TIGIT es el ICI más expresado en los ratones enfermos. Aún más importante es el descubrimiento en un modelo murino TIGIT-*null* del enlentecimiento del crecimiento del MM y de la reducción de la carga tumoral en ratones *wild-type* con un tratamiento anti-TIGIT¹⁶⁰, abriendo la posibilidad de nuevas inmunoterapias para este grupo de pacientes.

En el nicho medular del MM, los linfocitos T *helper* (Th) también muestran alteraciones: proliferación alterada de linfocitos T CD4+, alteraciones en el balance Th1/Th2, disminución en las citoquinas Th1, sobreexpresión de citoquinas Th2 y expansión de los linfocitos Th17 pro-inflamatorios¹⁶¹. Los Tregs, normalmente involucrados en modular las respuestas inmunes y mediar la auto-tolerancia, pueden ser utilizados por las células tumorales para lograr la supresión de la respuesta inmune y su consecuente evasión¹⁶². Los Tregs inhiben la función de los linfocitos Th1, Th17, macrófagos y DCs mediante interacción celular directa o mediante la secreción de citoquinas inhibitorias como IL-10 y TGF-beta¹⁶³. Los Tregs están aumentados en la MO de pacientes con GMSI que progresan a MM¹⁶⁴, y su expansión esta inversamente relacionada con la supervivencia¹⁶⁵. Tratamientos inmunomoduladores como lenalidomida o pomalidomida inhiben la proliferación y función de los Tregs¹⁶⁶, y su elevada expresión de CD38 los convierte en diana para los mAb anti-CD38 utilizados actualmente. La utilización de mAb anti-CD38 demostró, de hecho, inhibir la inmunosupresión en co-

cultivos *ex vivo*¹²². Las implicancias terapéuticas de los Tregs son múltiples, incluyendo un rol en el desarrollo de estrategias de vacunación anti-mieloma, donde el fallo de tratamiento en un ensayo de MM en estadios tempranos se asoció a un aumento en el número de Tregs¹⁶⁷.

Los linfocitos T gammadelta, un subtipo minoritario de los linfocitos T, han demostrado funciones efectoras contra el MM tanto de tipo innato como adaptativo¹⁶⁸. Los linfocitos gammadelta producen IFN-gamma y demuestran actividad citotóxica frente a las células de MM *in vitro* e *in vivo*, luego de la activación con bifosfonatos e IL-2¹⁶⁹. Los bifosfonatos también aumentan la señalización vía NKG2D, presente no solo en los linfocitos gammadelta, sino también en linfocitos NK y linfocitos CD8+, luego de su interacción con el ligando MICA (*major histocompatibility complex class-I related chain molecule A*). La expresión de MICA en la superficie de las células plasmáticas es inversamente proporcional al estadio de la enfermedad, siendo mayor en GMSI que en MM. El desprendimiento de MICA desde las células de MM lleva a su aumento en sangre periférica y a la modulación negativa de NKG2D, lo que sugiere que podría tratarse de un mecanismo de evasión inmune¹⁷⁰.

Los linfocitos NK son jugadores claves de la inmunidad innata. Son capaces de desarrollar actividad citotóxica directa y dependiente de anticuerpos (ADCC), desencadenada por el reconocimiento de ligandos en las células de MM mediante receptores como NKG2D, CD16, 2B4, NKp80 o DNAM-1¹⁷¹. Esta actividad citotóxica se encuentra regulada a su vez por receptores inhibidores que se unen a MHC-I como los KIR (*killer cell Ig-like receptors*) o CD94/NKG2A¹⁷². Al contrario de lo que ocurre con los linfocitos CD8+, los linfocitos NK reconocen marcadores de transformación oncogénica presentes en la superficie de las células de MM, y no neo-antígenos presentados por MHC-1, siendo una ventaja en el contexto de un tumor reducido en neo-antígenos como es el MM¹⁷³. Las células de MM pueden también evadir a los linfocitos NK, al mantener la expresión de moléculas de HLA¹⁷⁴ y al liberar MICA, lo que resulta en la regulación a la baja o el bloqueo de los receptores NKG2D de las NK^{170,175}. La activación de Tregs por parte de las células de MM también ha sido implicada como un mecanismo de inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos NK¹⁷⁶. La disminución de receptores como NKG2D o los NCRs (*natural*

citotoxicity receptors) en los linfocitos NK de la MO, así como DNAM-1 en los de SP y de 2B4 en ambas poblaciones, puede contribuir a las alteraciones funcionales reportadas en los pacientes con MM¹⁷⁷. Comprender las alteraciones cuantitativas y funcionales de los linfocitos NK es fundamental, a la luz del reciente desarrollo de inmunoterapias basadas en este subtipo celular¹⁷⁸.

El nicho medular en los estadios precursores (GMSI y MQ)

Utilizando la metodología de secuenciación de ARN en célula única, distintos grupos han demostrado alteraciones en el microambiente inmune tumoral en los estadios más tempranos de la enfermedad (GMSI)¹⁷⁹. Entre los cambios descritos, se encontró un enriquecimiento de linfocitos NK y monocitos no clásicos, así como una disminución de las pDCs. Además de alteraciones cuantitativas, también se identificaron cambios funcionales. Por ejemplo, aunque la expresión de HLA en monocitos CD14+ se encontraba aumentada, la correspondiente expresión de las proteínas a nivel de superficie estaba reducida, siendo compatible con un defecto en la presentación de antígenos presente en estadios precoces de la enfermedad. Experimentos de co-cultivo demostraron que las células neoplásicas son las responsables de estas alteraciones, modificando el medioambiente inmune ya desde los estadios precursores.

En el caso del MQ, se demostró expansión de los Tregs a nivel medular en muestras de pacientes, así como en modelos murinos con estadios tempranos de enfermedad. Se ha demostrado, asimismo, que la expansión *in vivo* de los Tregs en pacientes se correlaciona con una peor supervivencia, mientras en los modelos murinos la ausencia de Tregs medulares prolonga la supervivencia. Estos hallazgos plantean la posibilidad de los Tregs como diana terapéutica para prevenir la progresión en el MM. La expansión de los Tregs podría estar mediada por la secreción de IFN tipo 1 por parte de las células de MM, lo que sería reversible utilizando anticuerpos anti-IFNAR1¹⁸⁰.

Es importante no olvidar, sin embargo, que el microambiente tumoral no está constituido únicamente por células inmunes. En un estudio reciente analizando la matriz extracelular de muestras de MO de pacientes con GMSI, MM de reciente diagnóstico y

MM recaído, 2 proteínas, ANXA2 y LGALS1, estaban presentes únicamente en el caso de enfermedad sintomática. ANXA2 es una proteína que aumenta la formación de osteoclastos y la resorción ósea, y ha demostrado promover el crecimiento celular y disminuir la apoptosis en líneas celulares de MM. La supresión de LGALS1 ha demostrado inhibir la angiogénesis inducida por el MM y el crecimiento tumoral *in vivo*. Estos hallazgos fueron confirmados a nivel de expresión de ARN. Otras proteínas, sin embargo, se encontraron alteradas únicamente en el estadio de GMSI, lo que parece indicar que otros componentes del microambiente también se encuentran afectados desde los estadios más tempranos, al igual que ocurre con las células inmunes¹⁸¹.

Factores pronósticos en el mieloma quiescente

Durante los últimos años se han diseñado numerosos sistemas de estratificación de riesgo de progresión en pacientes con MQ. Los parámetros actualmente más utilizados en la práctica clínica, y con mayor evidencia, están relacionados con la carga tumoral: el grado de infiltración por células plasmáticas a nivel medular (BMPC), el tamaño del componente monoclonal sérico (CMs) y el cociente de cadena ligera involucrada/no involucrada (FLCr). Otros factores pronósticos para la progresión que se han identificado en algunos estudios incluyen^{182,183}:

- Isotipo IgA
- Inmunoparesia (reducción de los isotipos de Ig no involucrados)
- Porcentaje de células plasmáticas de fenotipo aberrante/clonales
- Células plasmáticas circulantes en sangre periférica
- Actividad proliferativa de las células plasmáticas
- Presencia de cadenas ligeras en orina (proteinuria de Bence Jones -BJ-)
- Cambios dinámicos en los marcadores de carga tumoral (evolución del CM o disminución de la hemoglobina)
- Afección ósea detectada por RMN o PET-CT
- Características citogenéticas/moleculares de la población clonal
- Niveles séricos de BCMA soluble

Modelos basados en parámetros relacionados con la carga tumoral al diagnóstico

Uno de los primeros estudios, que evaluó a 127 pacientes con MQ diagnosticados entre 1975 y 1998, encontró una asociación entre la progresión a enfermedad sintomática y >10% BMPC, la presencia de proteinuria de BJ y el isotipo IgA¹⁸⁴.

El primer sistema de la *Mayo Clinic* surgió a partir del estudio retrospectivo de 276 pacientes que cumplían con los criterios diagnósticos del IMWG de 2003, evaluados entre 1970 y 1995. Estos pacientes fueron separados en tres grupos de acuerdo al porcentaje de BMPC y el CMs al diagnóstico: BMPC \geq 10% y CMs \geq 3 g/dL, BMPC \geq 10% y CMs < 3 g/dL y BMPC < 10% y CMs \geq 3 g/dL. El riesgo acumulado de progresión a los 15 años fue de 87, 70 y 39% respectivamente, mientras que la mediana de tiempo a la progresión (TTP) fue de 2, 8 y 19 años. Otros factores asociados con la progresión a enfermedad sintomática de los pacientes con MQ incluyeron el isotipo IgA, la presencia de proteinuria de BJ, la inmunoparesia y el patrón de infiltración por células plasmáticas a nivel de médula ósea⁶. Poco después se describió que el cociente al diagnóstico de las cadenas ligeras libres κ / λ (FLCr) <1:8 (0,125) o >8 constituía un factor de riesgo independiente para la progresión del MQ. Al agregar esta información al sistema de estratificación de riesgo de la Mayo Clinic, se estableció un nuevo modelo en el que el riesgo acumulado de progresión a los 10 años y la mediana del tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP) para los pacientes con 1 factor de riesgo fue de 50% y 10 años, 65% y 5 años para aquellos que tenían 2 factores de riesgo y finalmente de 84% y 2 años para los que reunían los tres¹⁸⁵.

Un estudio del grupo español PETHEMA (Programa de Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas) con 93 pacientes diagnosticados de MQ utilizando los criterios del IMWG del 2003 y/o la presencia de > 10 g/L de proteinuria de BJ, analizó el % de CP de fenotipo aberrante (aPC/BMPC) en médula ósea mediante citometría de flujo. Desarrollaron un modelo de riesgo utilizando los dos factores asociados de forma

independiente a la supervivencia libre de progresión (PFS) en este estudio: un cociente aPC/BMPC $\geq 95\%$ y la presencia de inmunoparesia (definida como un valor por debajo de la normalidad de 1 o 2 de las Ig de los isotipos no involucrados). La PFS a los 5 años y la mediana de TTP fueron: 4% y no alcanzada, 46% y 73 meses, y 72% y 23 meses para los pacientes con 0, 1 y 2 factores de riesgo, respectivamente¹⁸⁶.

Se realizó una comparación entre el modelo de riesgo de la *Mayo Clinic* y el de PETHEMA, clasificando con ambos a 77 pacientes con MQ. En esta cohorte, 33, 35 y 4 pacientes fueron clasificados como de riesgo bajo, intermedio y alto según el modelo de la *Mayo Clinic*, mientras que de acuerdo al modelo de PETHEMA los grupos quedaron conformados por 17, 22 y 38 pacientes. La discordancia fue particularmente notable al clasificar pacientes de alto riesgo frente al resto, y la concordancia global entre los dos modelos fue de solamente un 28,6% (22/77). Este hecho resaltó la necesidad de optimizar los modelos utilizados para estratificar a los pacientes con MQ¹⁸⁷.

En el 2011, el grupo de la *Mayo Clinic* describió que un 3.2% de los pacientes con MQ diagnosticados entre 1996 y 2010 presentaban una infiltración por CP al diagnóstico $\geq 60\%$, y que el 95% de los pacientes en este grupo progresó a enfermedad sintomática (mediana de TTP de 7 meses)¹⁸⁸. El mismo grupo, al analizar retrospectivamente 586 pacientes diagnosticados entre 1970 y 2010 utilizando los criterios del IMWG del 2003, describió un nuevo punto de corte para la FLCr ≥ 100 (redondeando el valor de 91 para simplificación clínica). El grupo de alto riesgo así definido presentaba un riesgo de progresión a MM a los 2 años de 72% y un TTP de 15 meses, comparado con 28% y 55 meses para el resto de los pacientes que no cumplían con dicho criterio¹². Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente por diferentes grupos. Un estudio de 96 pacientes con MQ diagnosticados de acuerdo a los criterios del 2003 encontró un grupo de muy alto riesgo (12,5% de la cohorte), que progresó antes de los 18 meses desde el diagnóstico. Al analizar los factores de riesgo asociados a este grupo, los autores identificaron que una infiltración a nivel medular $\geq 60\%$ y un FLCr ≥ 100 tenían una especificidad de 95.5% y 98% para identificar aquellos pacientes que progresaban antes de los 18 meses¹¹. En otra cohorte de 135 pacientes con MQ, todos los pacientes con $\geq 60\%$ BMPC y 64% de los pacientes con FLCr ≥ 100 progresaron dentro de los dos años.

Los autores construyeron un modelo utilizando tres factores de riesgo: $BMPC \geq 40\%$, $FLCr \geq 50$ y una concentración de albumina $\leq 3,5$. Los pacientes con 0, 1 y 2/3 factores de riesgo eran considerados como de bajo, intermedio o alto riesgo, con tasas de progresión a los dos años de 16%, 44% y 81% respectivamente. Los niveles de albumina resultaron inversamente proporcionales a los de IL-6, un factor de crecimiento para las células de MM, lo que podría explicar su papel como biomarcador pronóstico¹⁸⁹.

En un estudio de 91 pacientes con MQ diagnosticados según los criterios del IMWG del 2003, la presencia de $> 5 \times 10^6$ células plasmáticas circulantes (CpC) /L y/o $>5\%$ CpC / 100 células mononucleares positivas para Ig de citoplasma, se asoció con un aumento en el riesgo de progresión a los dos años (71 frente a 24%), una disminución en el TTP (12 frente a 57 meses) y una disminución de la supervivencia global (49 frente a 148 meses). Para este estudio se analizaron células mononucleares fijadas de sangre periférica, mediante una técnica de inmunofluorescencia¹⁹⁰. Un segundo estudio utilizando citometría de flujo, analizó 100 pacientes diagnosticados según los criterios del 2003 entre 2008 y 2013. Veinticuatro (24%) de los pacientes demostraron tener CpC, con una mediana de 78 células / 150,000 eventos. Estos pacientes presentaron una mediana de TTP de 10 meses frente a no alcanzada en el grupo que no presentaba CpC. Utilizando un punto de corte ≥ 150 CpC, la mediana de TTP de este grupo fue de 9 meses (frente a no alcanzada), con un valor predictivo positivo (VPP) y una especificidad para la progresión a los dos años de 78% y 97%. En esta cohorte, también resultaron factores de riesgo significativos para la progresión una $FLCr > 8$ y la presencia de inmunoparesia, lo que permitió el diseño de modelos con la inclusión de los tres factores de riesgo. Al aplicar el modelo de la *Mayo Clinic* del 2007⁶ a esta cohorte, 18 pacientes fueron clasificados como de alto riesgo, con un VPP y una especificidad para la progresión a los dos años de tan solo 33% y 85%¹⁹¹.

Uno de los últimos estudios utilizando los criterios diagnósticos del 2003 analizó una cohorte de 147 pacientes diagnosticados entre 1983 y 2013, y encontró que los pacientes con proteinuria de Bence Jones presentaban un TTP significativamente más corto (21,7 frente a 82,9 meses). Analizando el grado de proteinuria de manera cuantitativa, los autores fueron capaces de separar a los pacientes en 4 grupos con claras

diferencias en las medianas de TTP¹⁹². Finalmente, utilizando el registro danés de MM (DMMR), se analizaron 321 pacientes diagnosticados entre 2005 y 2014 que no presentaron datos de progresión dentro de los tres meses del diagnóstico. En este estudio un FLCr elevado no se asoció a un menor TTP, pero si lo hicieron un CM \geq 3 g/dL y la presencia de inmunoparesia (definida como la reducción de por lo menos 25% por debajo del valor normal de 1 o 2 de las Ig no involucradas). Utilizando estos dos criterios, el riesgo de progresión a los dos años fue de 5% (sin factores de riesgo), 18% (1 factor de riesgo) y 38% (2 factores de riesgo)¹⁹³.

Modelos de riesgo basados en estudios de imágenes

Un importante biomarcador de progresión a enfermedad sintomática del MQ es la presencia de lesiones óseas. La presencia de lesiones líticas se incluyó en la definición de mieloma sintomático, basándose en estudios que demostraron que los pacientes con \geq 1 lesión lítica presentaban una mediana de TTP de 10 meses¹⁹⁴. Actualmente, la definición de lesiones líticas incluye la presencia de por lo menos una lesión (\geq 5mm) en un estudio de rayos X, TAC o PET-TAC (según disponibilidad de recursos). Sin embargo, los pacientes sin lesiones óseas en los estudios mencionados pueden tener hallazgos anormales en un estudio de RMN, lo que también les confiere un mayor riesgo de progresión.

Un estudio evaluó 149 pacientes con MQ mediante RMN de cuerpo completo, detectando lesiones focales en 42 de ellos (28%)¹⁰. Los pacientes con > de 1 lesión focal (15%) presentaron un riesgo de progresión a enfermedad sintomática mayor, con una mediana de TTP de 13 meses y una tasa de progresión a los dos años de 70%. En el análisis multivariado, la presencia de > de 1 lesión focal por RMN mantuvo su valor pronóstico al ajustar por otras variables como BMPC, valores de CM en suero y orina e inmunoparesia. En el mismo estudio, el hallazgo de infiltración medular difusa en la RMN también se asoció a un aumento en el riesgo de progresión. Estos hallazgos fueron confirmados al estudiar 98 pacientes con MQ a los que se les realizó una RMN espinal y luego fueron seguidos por un mínimo de 2,5 años¹⁹⁵. En este estudio, la mediana de TTP

a enfermedad sintomática en el caso de existir > de 1 lesión focal fue de 14 meses. Estos resultados llevaron a la actualización de los criterios diagnósticos del IMWG antes mencionados, por lo que actualmente los pacientes con > 1 lesión ósea en RMN son considerados como MM activo¹⁴.

El estudio de PET-TAC utilizando glucosa marcada con el radionucleótido 18F (18F-FDG PET-TAC) permite la identificación de lesiones osteolíticas y ha sido incorporado recientemente por el IMWG como una técnica a utilizar en el diagnóstico de MM. Zamagni *et al.* estudiaron el impacto de la presencia de lesiones sin osteólisis en la progresión del MQ a enfermedad sintomática. En 120 pacientes con MQ, el PET-TAC resultó anormal en un 16%. Este subgrupo presentó una mediana de TTP de 1,1 años frente a 4,5 años para aquellos con un estudio negativo, mientras que la probabilidad de progresión a los dos años fue de 58% y 33% respectivamente¹⁹⁶.

Mieloma quiescente de ultra-alto riesgo y actualización de los criterios diagnósticos del MQ

En el año 2014, el IMWG actualizó los criterios diagnósticos de MQ al definir un grupo de “ultra-alto” riesgo que presentaban nuevos “eventos definitorios de MM”: BMPC \geq 60%, FLCr \geq 100 y > 1 lesión focal en un estudio de RMN. Estos pacientes presentan un riesgo de progresión a los 2 años de 80%, por lo que deben ser considerados como MM y recibir un tratamiento acorde. Como resultado de esta actualización, 10-15% de los pacientes previamente diagnosticados como MQ debieron ser reclasificados, lo que obligó a la revisión de los modelos de riesgo hasta ese momento utilizados¹⁴. El grupo de la *Mayo Clinic* reanalizó su cohorte inicial con 421 pacientes que cumplían con los nuevos criterios del 2014¹⁹⁷. El análisis multivariado permitió diseñar un nuevo modelo de riesgo que utilizaba los mismos parámetros del modelo del 2008 pero con diferentes puntos de corte: FLCr > 20, CMs > 2 g/dL, BMPC > 20% (el modelo “20/2/20”). En base a estos parámetros, tres grupos de riesgo fueron definidos: bajo riesgo (sin factores de riesgo), riesgo intermedio (1 factor de riesgo) y alto riesgo (2 o más factores de riesgo). La mediana estimada del TTP fue de 109,8, 67,8 y 29,2 meses, respectivamente. En el

2020, este modelo fue validado con una cohorte de 1.966 pacientes de 75 centros de 23 países¹⁸². Con un seguimiento de 3 años, la mediana de TTP para toda la cohorte fue de 6,4 años, con un riesgo de progresión a los 2, 5 y 10 años de 22%, 42% y 64% respectivamente. El análisis multivariado, considerando aún más factores de riesgo potenciales que en el estudio previo del 2018, confirmó la relevancia de los parámetros y los puntos de corte (20/2/20) previamente descritos. La estratificación de 1.363 pacientes que contaban con la información suficiente en las tres categorías antes definidas reveló tasas de progresión a los dos años de 6%, 18% y 44% respectivamente. En base a estos resultados, el modelo 20/2/20 es uno de los más empleados y recomendados para su utilización en la práctica clínica.

Como parte del estudio iMMunocell, se analizaron en forma seriada la presencia de células plasmáticas circulantes (CPC) en 150 pacientes con MQ diagnosticados mediante los criterios actualizados del IMWG, durante un período de 3 años desde el diagnóstico. Los pacientes con $> 0,015\%$ CPC al momento del diagnóstico demostraron una mediana de TTP de 17 meses, mientras que la misma no fue alcanzada en el grupo con $\leq 0,015\%$ CPC. La presencia de $> 20\%$ BMPC no tuvo valor pronóstico en el análisis multivariado que incluyó FLCr < 20 , CMs > 2 g/dL y $> 0.015\%$ CTc. La estratificación en grupos de riesgo utilizando el modelo 20/2/20 y un nuevo modelo reemplazando BMPC por CTc (20/2/0,015) resultó similar. Si bien en este estudio el valor pronóstico de las CPC parece ser superior, con la gran ventaja de ser un parámetro mínimamente invasivo, es necesaria su evaluación en otras series, sin existir consenso en cuanto al punto de corte a ser utilizado¹⁹⁸.

Utilizando los criterios actualizados del 2014, se evaluaron de manera retrospectiva 306 pacientes con MQ en los que se había medido el índice de proliferación de las células plasmáticas (PCPI) mediante el método de bromodeoxiuridina o citometría de flujo, definiéndose como elevado un PCPI $> 0,5\%$ ¹⁹⁹. Los pacientes con un PCPI elevado presentaron una mediana de TTP más corta y un riesgo de progresión a los dos años mayor que aquellos pacientes con un PCPI bajo (3 años y 49% vs. 7,1 años y 20%). El PCPI demostró ser un factor de riesgo independiente para la progresión tanto cuando se incluyó en el modelo original de la *Mayo Clinic* como en el actualizado. El aumento de la

relación entre proliferación y apoptosis (Ratio-PA) de las células neoplásicas, determinada mediante citometría de flujo al diagnóstico, ha sido asociado también con un elevado riesgo de progresión en pacientes con MQ. En un estudio reciente, un Ratio-PA elevado permitió identificar a un grupo de pacientes con MQ y una PFS a los 10 años del 35%, complementando el modelo de estratificación de riesgo estandar²⁰⁰.

En 2020, el grupo checo de mieloma (CMG) desarrolló un modelo de estratificación basado exclusivamente en parámetros séricos²⁰¹. Se estudiaron 287 pacientes con MQ diagnosticados según los criterios del IMWG del 2003 como grupo de entrenamiento, y el modelo se validó de manera independiente con otra cohorte de 240 pacientes. Con una mediana de seguimiento de 2,4 y 2,5 años respectivamente, la progresión a MM ocurrió en 52% y 39% de los pacientes de cada grupo. En el análisis multivariado, los predictores de progresión a los dos años resultaron ser un FLCr < 30, la presencia de inmunoparesia (por lo menos una de las Ig no involucradas por debajo de la normalidad) y un CMs $\geq 2,3$ g/dL. Utilizando estos parámetros se definieron cuatro grupos de riesgo basados en la presencia de cero, uno, dos o tres factores de riesgo. Notablemente, el riesgo de progresión a los dos años en ambas cohortes para los pacientes con tres factores de riesgo fue de 79 y 80%.

Finalmente, el grupo de la *Mayo Clinic* publicó en el 2021 un análisis retrospectivo de 184 pacientes con MQ en los que analizaron el valor pronóstico de los niveles del *B-cell maturation antigen* soluble (BCMAs) al diagnóstico, utilizando como punto de corte la mediana de la cohorte (127 ng/mL)²⁰². Los pacientes con BCMAs <127 ng/mL presentaron PFS y OS significativamente más largas que los pacientes con valores ≥ 127 ng/mL (4,7 frente a 1,9 años y 11,9 vs. 7,5 años). Una importante limitación de este estudio es que incluyó, con el objetivo de permitir una comparación entre los pacientes que progresaban y los que no, un mayor número de pacientes con MQ con progresión que lo esperable en una cohorte de MQ convencional.

Modelos de riesgo evolutivos

Una limitación significativa de la mayor parte de modelos de riesgo actualmente utilizados es que son aplicados al momento del diagnóstico del MQ y asumen que el riesgo de progresión se mantiene constante en el tiempo. Sin embargo, los estudios retrospectivos han demostrado que el riesgo de progresión es más alto durante los primeros 5 años desde el diagnóstico y luego se estabiliza en 3-5% anual a partir de ese momento⁶. En un intento de evidenciar las diferentes trayectorias clínicas del MQ, varios grupos han construido modelos de riesgo basados en la evolución de distintos biomarcadores en el tiempo.

La idea de utilizar mediciones seriadas de biomarcadores para identificar pacientes con un curso indolente frente a aquellos con un curso clínico más agresivo fue descrita por Rosiñol *et al.* en el 2003²⁰³. En este estudio, se describió un grupo de MQ “*evolving*”, definido como aquellos pacientes que presentaban un aumento progresivo del CMs en los primeros dos controles tras el diagnóstico. El grupo “*evolving*” se caracterizó por una mayor proporción de pacientes con subtipo IgA y más del 50% presentaba el antecedente de un diagnóstico previo de GMSI. Este grupo demostró una mediana de TTP de 1,3 años, en comparación con 3,9 años para el grupo “*no evolving*”. Este último grupo presentó niveles estables de CMs, aumentando abruptamente en el momento de progresión a enfermedad sintomática.

Ravi *et al.* investigaron el impacto del comportamiento *evolving* tanto del CMs (eCM) como de la Hb (eHb) en el riesgo de progresión²⁰⁴. En este estudio se definió el comportamiento “*evolving*” como un incremento del CM $\geq 10\%$ en 6 meses, o $\geq 25\%$ en el primer año desde el diagnóstico, con un mínimo absoluto del incremento fijado en 0,55 g/dL para aumentar la especificidad. Por su parte, el comportamiento “*evolving*” de la Hb fue definido como una disminución ≥ 0.5 g/dL en los primeros 12 meses desde el diagnóstico. Tanto el comportamiento *evolving* del CM como el de la Hb resultaron en factores de riesgo independientes para la progresión a enfermedad sintomática dentro de los dos años desde el diagnóstico, así como también $BMPC \geq 20\%$. Un modelo de riesgo utilizando estos tres parámetros determinó medianas de TTP de 12,3, 5,1, 2 y

1 año para los pacientes con 0 a 3 factores de riesgo, respectivamente. Cabe destacar que el riesgo de progresión a los dos años para aquellos pacientes con comportamiento “*evolving*” del CM y de la Hb fue de 81,5%. Un estudio similar analizó el comportamiento *evolving* del CM (eCM) y la Hb (eHb) definidos de una manera similar, pero en este caso solo el eCM constituyó un factor de riesgo asociado en forma independiente con la progresión, junto con un BMPC $\geq 20\%$ y una FLCr ≥ 8 ²⁰⁵. En contraposición a lo previamente descrito, los pacientes con eCM y eHb en este estudio presentaron un riesgo de progresión a los dos años de solo 18,5%. Esta diferencia pudo deberse a que se trataba de una cohorte con un menor número de pacientes con MQ de alto riesgo.

Un grupo corroboró la utilidad pronóstica del comportamiento evolutivo de diferentes biomarcadores, evaluando la trayectoria durante el primer año posterior al diagnóstico de la Hb, el CMs y la diferencia entre los valores de FLC²⁰⁶. Otro estudio identificó cambios absolutos en el CMs (aumento ≥ 5 g/L) y la FLCr (aumento $\geq 4,5$), desde el diagnóstico de SMM hasta 6 meses previos a la progresión a MM, como factores de riesgo para la progresión a enfermedad sintomática²⁰⁷.

El concepto *evolving* no ha sido únicamente estudiado en el caso de biomarcadores séricos. Un estudio evaluó 63 pacientes con MQ utilizando un método de volumetría 3D a partir de RMN de cuerpo entero. La velocidad de crecimiento de las lesiones óseas, utilizando un punto de corte de 114 mm³/mes, fue capaz de identificar a un subgrupo de pacientes con un riesgo de progresión a los 2 años de 82.5%, y demostró una mayor sensibilidad y menor tasa de falsos positivos que el biomarcador de “> 1 lesión focal” actualmente utilizado por el IMWG²⁰⁸.

La ventaja de utilizar valores absolutos en vez de relativos para caracterizar a un paciente como “*evolving*” radicaría en que, con éstos últimos, los pacientes con bajos niveles al diagnóstico solo necesitarían un incremento muy pequeño para cumplir con el criterio, lo que determinaría una menor especificidad. Los modelos de riesgo “*evolutivos*” son actualmente menos utilizados que los basados en mediciones al diagnóstico, ya que los segundo resultan más prácticos a la hora de definir que pacientes son candidatos a ensayos clínicos. Otro problema surge de los diferentes puntos de corte

descritos por los diferentes grupos. Con puntos de corte bien definidos y validados en un mayor número de pacientes, el comportamiento *evolving* podría agregarse a los modelos de riesgo actualmente recomendados.

Modelos genómicos

Secuenciación ADN/ARN y perfiles de expresión génica

El grupo de Salamanca utilizó en 2012 técnicas de FISH, SNP-arrays y perfiles de expresión génica para estudiar un grupo de 123 pacientes con MQ de alto riesgo. Las anomalías cromosómicas no se asociaron con un aumento del riesgo de progresión a enfermedad sintomática. Sin embargo, la sobreexpresión de cuatro genes SNORD (SNORD25, SNORD27, SNORD30 y SNORD31) se correlacionó con un TTP más corto. Estos genes son responsables de la expresión de ARN no codificante que está involucrado en la modificación postranscripcional del rARN. Desafortunadamente, el número de pacientes en el que se estudió el perfil de expresión génica fue limitado (33)²⁰⁹.

También se ha utilizado un sistema de estratificación de riesgo basado en la expresión de 70 genes (GEP70), descrito previamente en el pronóstico del MM, para estudiar una cohorte de GMSI y MQ en un estudio prospectivo (SWOG S0120)²¹⁰. Una puntuación elevada (>0,26) se asoció con un aumento en el riesgo de progresión de los pacientes con MQ (riesgo de progresión a los 2 años de 49,7%). Al combinar una puntuación GEP70 >0,26, un CMs $\geq 3\text{g/dL}$ y una dFLC >25mg/dL, fue posible identificar un subgrupo con un riesgo de progresión a los dos años de 67%. Este estudio también reveló que los diferentes subtipos moleculares descritos mediante perfiles de expresión génica en MM ya están presentes en los estadios precursores (GMSI y MQ), un hallazgo consistente con estudios previos que han revelado que las alteraciones citogenéticas características del MM también pueden ser observadas en pacientes con GMSI²¹¹. Otro estudio más reciente del mismo grupo utilizó una firma genómica derivada de 4 genes (*RRM2*, *DTL*,

TMEM48 y *ASPM*) para identificar a un grupo de alto riesgo con una tasa de progresión a los dos años de 86%²¹².

El grupo de Bolli *et al.* fue el primero en utilizar secuenciación de genoma completo (WGS) para estudiar pacientes con MQ, validando hallazgos previos, al encontrar las mismas alteraciones citogenéticas, mutaciones y reordenamientos descritos en el MM²¹³. Las ganancias de 1q, del13q, hiperdiploidía y translocaciones de *IgH* fueron las anomalías más frecuentemente halladas en los pacientes con MQ. El estudio de muestras secuenciales permitió definir dos modelos de progresión a enfermedad sintomática (**Figura 2**): el “estático”, donde no se registraba un cambio en la arquitectura subclonal, y el “espontáneo”, observando un cambio en la composición subclonal. El TTP del primer grupo resultó más corto que el del primero, reflejando por tanto únicamente el tiempo necesario para acumular una masa tumoral suficiente. Otro hallazgo importante del estudio fue que la deaminasa de citidina inducida por activación (AID) jugaría un rol importante en la determinación del paisaje mutacional de las fases subclínicas más tempranas, mientras que la deaminasa de citidina APOBEC estaría involucrada en la progresión a enfermedad sintomática.

Utilizando la técnica de secuenciación de exoma completo (WES) se demostró, una vez más, que las mutaciones asociadas con la progresión a MM ya están presentes en el MQ al diagnóstico⁴⁶. En este estudio, se asociaron con un mayor riesgo de progresión las alteraciones de la vía de MAPK (SNVs en *KRAS* y *NRAS*), reparación de ADN (deleciones de 17q y *TP53*, SNVs en *ATM*) y reordenamientos de *MYC* (translocaciones y CNVs en el locus). Los pacientes con mutaciones asociadas a APOBEC presentaron un TTP significativamente más corto. Las alteraciones genómicas descritas en este estudio mantuvieron su valor pronóstico de manera independiente, aún tras tomar en consideración las variables de riesgo clínicas. Los pacientes sin estas alteraciones presentaron una mediana de TTP de 7,2 años frente a 1,2 años en aquellos con una o más. El riesgo asociado a estas alteraciones genómicas resultó acumulativo, y los pacientes con dos o más alteraciones progresaron aún más precozmente. Estos resultados fueron validados en una cohorte externa de 72 pacientes con MQ

previamente secuenciados. Este modelo, además, resultó más eficiente al ser comparado con los modelos de predicción de riesgo de la *Mayo Clinic* (2008 y 2018).

Utilizando la secuenciación del genoma completo (WGS), también se pudieron identificar dos grupos de pacientes con MQ con diferencias no solo en el perfil genómico, sino también en el momento de adquisición de mutaciones asociadas con enfermedad sintomática⁴¹. Los pacientes con enfermedad progresiva se caracterizaron por un mayor número de eventos genéticos “determinantes” de MM como eventos genómicos complejos (“cromotripsis” o “*templated insertions*”), mutaciones en genes *driver*, aneuploidía y mutaciones asociadas a APOBEC. Por el contrario, los pacientes con MQ estable se caracterizaron por una carga mutacional más baja y por la ausencia de estos eventos genéticos, iniciándose además a edades más avanzadas. De esta manera, la WGS permitió identificar dos entidades precursoras de MM biológica y clínicamente diferentes.

Si bien las nuevas herramientas moleculares han permitido revelar la arquitectura subclonal del MQ y los procesos involucrados en la progresión tumoral a MM, no existen marcadores claramente asociados a las categorías de MQ de bajo y alto riesgo. Esto, junto con el costo y la complejidad de estas tecnologías, hacen que por el momento no sean utilizadas para la determinación del riesgo en el ámbito clínico.

Alteraciones citogenéticas

En la cohorte de la *Mayo Clinic* de 351 pacientes con MQ diagnosticados entre 1991 y 2010 según los criterios del IMWG del 2003, encontraron que 43,9% presentaban trisomías, 36,2% translocaciones de *IgH*, 4% trisomías y translocaciones de *IgH*, 0,9% monosomía del cromosoma 13/delecciones de 13q y 15,1% no presentaban alteraciones detectables⁴². De las translocaciones de *IgH*, 44,9% eran t(11;14), 28,3% t(4;14), 8,7% translocaciones con *MAF* (t(14;16) o t(14;20)), y 18,1% tenían un *partner* diferente o no identificable. Los pacientes con t(4;14) presentaron un riesgo de progresión significativamente mayor y una mediana de TTP significativamente más corta (28 frente

55 meses) en comparación con la $t(11;14)$. La presencia de monosomía 13 / deleción 13q no se asoció a un aumento del riesgo de progresión, mientras que los pacientes con deleción de 17p presentaron una tendencia a un mayor riesgo de progresión, si bien no se contó con un número suficiente de pacientes con esta anomalía. Los pacientes fueron estratificados en 4 grupos citogenéticamente definidos, con diferente riesgo de progresión. El grupo de alto riesgo estaba constituido por pacientes con $t(4;14)$, el de riesgo intermedio por pacientes con trisomías, el de riesgo *standard* por pacientes con $t(11;14)$, translocaciones de *MAF*, otras translocaciones de *IgH*, monosomía 13/deleción 13q o trisomías + translocaciones, y finalmente el grupo de bajo riesgo por pacientes con estudio de FISH normal o material insuficiente para el estudio. La mediana del TTP fue de 28, 34, 55 y no alcanzada para cada uno de los 4 grupos, respectivamente. Otro estudio del mismo año que incluyó 248 pacientes con MQ, encontró que la presencia de deleciones de 17p, $t(4;14)$, ganancias de 1q e hiperdiploidía se asociaban a una mediana de TTP significativamente más corta, teniendo el peor pronóstico la del17p²¹⁴. La $t(11;14)$ y la deleción 13q no tuvieron un efecto significativo en el TTP. Los pacientes fueron estratificados en un grupo de alto riesgo (del17p, $t(4;14)$, ganancia 1q) y en un grupo de riesgo *standard* (los que no presentaban dichas alteraciones), con una tasa de progresión a los tres años de 45% frente a 24%, respectivamente.

De los 1.363 pacientes con MQ incluidos en el estudio del IMWG del 2020, 689 contaban con información citogenética. La presencia de $t(4;14)$, $t(14;16)$, ganancia 1q y monosomía 13/del13q fueron agregadas al modelo de riesgo como un cuarto factor, quedando así determinados 4 grupos con diferente riesgo de progresión a los dos años: bajo riesgo (0 factores) con un 6% de riesgo de progresión, riesgo bajo-intermedio (1 factor) con 22,8%, riesgo intermedio (2 factores) con 45,5% y alto riesgo (3-4 factores) con un 63,1% de riesgo de progresión a los dos años¹⁸².

En definitiva, ciertas alteraciones citogenéticas constituyen factores de riesgo independientes para la progresión a enfermedad sintomática de pacientes con MQ, y se ha demostrado que su adición puede mejorar modelos basados únicamente en variables clínicas (como el modelo 2/20/20). Sin embargo, no todas parecen tener el mismo impacto, e incluso hay discordancias entre los diferentes modelos propuestos. A esto se

suma la dificultad técnica que implica el análisis citogenético de las gammapatías, derivado del grado variable de infiltración medular y la baja tasa proliferativa de las células plasmáticas malignas.

El modelo de riesgo “ideal” combinaría marcadores de carga tumoral al diagnóstico junto con sus cambios evolutivos, así como marcadores genéticos que puedan predecir la biología tumoral y biomarcadores que reflejen la permisividad del microambiente inmune. En la práctica clínica, sin embargo, deben utilizarse modelos basados en pruebas aplicadas rutinariamente y disponibles de manera universal. Los modelos más modernos, basados en las nuevas técnicas de secuenciación masiva, no están estandarizados (con métodos y tecnología que varía entre los diferentes laboratorios), no han demostrado superioridad a la hora de identificar pacientes candidatos a intervención temprana, y no están disponibles en la mayoría de los centros asistenciales.

Si bien existe discordancia entre los diferentes modelos con respecto a la identificación de pacientes de “alto riesgo”, es probable que debido a su baja sensibilidad cada uno de ellos capture a una proporción de los pacientes con mayor riesgo de progresión. Al utilizar distintos modelos, sería posible identificar a una mayor cantidad de pacientes. En todo caso, un modelo que identifique a una población con un riesgo de progresión a los dos años > 50% puede ser utilizado para adaptar el seguimiento de los pacientes con MQ.

El modelo 2/20/20 está aceptado por el IMWG y es actualmente el más utilizado por su sencillez y aplicación universal. Cualquiera sea el modelo elegido, es recomendable combinarlo con las pruebas de imagen adecuadas.

Tratamiento del mieloma quiescente

El tratamiento estándar actual del MQ es la observación. Sin embargo, numerosos ensayos clínicos se han llevado a cabo en este grupo de pacientes con la finalidad de retrasar el desarrollo de enfermedad sintomática o incluso de alcanzar la curación.

Un metaanálisis evaluó 8 ensayos clínicos aleatorizados y controlados incluyendo un total de 885 pacientes, para comparar el tratamiento precoz (fase asintomática) frente al diferido (en el momento de la progresión)²¹⁵. Los esquemas de tratamiento utilizados incluyeron melfalán + prednisona, bifosfonatos ± talidomida, siltuximab y lenalidomida + dexametasona. Globalmente, el tratamiento precoz se asoció a una disminución del riesgo de progresión a enfermedad sintomática (*risk ratio* [RR] = 0,53, [95% CI]: 0,33-0,87, $P=0,01$), particularmente en el grupo de pacientes de alto riesgo (RR=0,51, 95% CI: 0,37-0,70, $P=0,0001$). En este último grupo, el tratamiento precoz también se asoció a una disminución de la mortalidad (RR=0,53, 95% CI: 0,29-0,96, $P=0,04$). Con respecto a los efectos adversos, el riesgo de neoplasias secundarias fue significativamente mayor con el tratamiento precoz (RR=4,13, 95% CI: 1,07-15,97, $P=0,04$). Este metaanálisis, sin embargo, sería cuestionable por la amplia heterogeneidad de los esquemas terapéuticos y la falta de estratificación de riesgo en la mayor parte de los ensayos clínicos.

Lenalidomida

Los resultados de dos estudios prospectivos de fase III apoyan el uso de lenalidomida (± dexametasona) en pacientes con MQ de alto riesgo.

El estudio QuiRedex fue un ensayo fase III en 119 pacientes con MQ de alto riesgo, definidos por la presencia de BMPC >10% y un CMs >3g/dL o, en el caso de que sólo uno de estos criterios estuviese presente, la presencia de >95% de BMPC de fenotipo aberrante junto a inmunoparesia. Los pacientes fueron aleatorizados a recibir 4 ciclos de inducción con lenalidomida y dexametasona, seguidos de mantenimiento con

lenalidomida por 2 años frente a observación²¹⁶. El objetivo primario analizado fue el tiempo a la progresión (TTP). Al momento del primer análisis y luego de de una mediana de seguimiento de 45 meses, el TTP en los pacientes tratados fue significativamente más largo que el del grupo control (mediana no alcanzada frente a 21 meses, respectivamente; $P < 0.001$), con una supervivencia global que también fue significativamente mayor en el grupo de tratamiento (tasa de supervivencia a los 3 años de 94% frente a 80%, respectivamente; $P = 0.03$). En la última actualización de los resultados, con una mediana de seguimiento de 12,5 años, la mediana de TTP para los pacientes tratados era de 9,5 años frente a 2,1 años para la rama de observación (HR=0.28; 95% CI: 0.18-0.44; $P < 0.0001$). La mediana de supervivencia global no fue alcanzada por el grupo de tratamiento precoz, mientras que resultó de 8,5 años en la rama control (HR=0.57; 95% CI: 0.34-0.95; $P = 0.032$). No se observaron diferencias entre las dos ramas cuando se comparó la supervivencia global desde el inicio del tratamiento al momento de la progresión, sugiriendo que el tratamiento con lenalidomida no estaría asociado a la selección de clones resistentes. Las neoplasias secundarias resultaron más frecuentes en el grupo de tratamiento precoz (10% frente a 2%), pero el riesgo acumulado no fue significativamente diferente entre los dos grupos²¹⁷.

El ensayo fase III del Eastern Cooperative Oncology Group E3A06 evaluó la eficacia de lenalidomida en monoterapia frente a observación en pacientes con MQ de riesgo intermedio o alto²¹⁸. La lenalidomida se administró como agente único vía oral hasta la progresión o suspensión, ya fuese por toxicidad o por otra razón. Se constató respuesta al tratamiento en un 50% de los pacientes en la rama de lenalidomida. Con una mediana de seguimiento de 35 meses, la supervivencia libre de progresión (objetivo primario del estudio) fue significativamente más prolongada en la rama de lenalidomida, con una disminución del 72% en el riesgo de progresión. El beneficio fue mayor en los pacientes con MQ de alto riesgo, definidos con el modelo de riesgo de la *Mayo Clinic* del 2018. La tasa de discontinuación de tratamiento fue del 50% (en 40% de los casos por efectos adversos), y los efectos adversos no hematológicos de grado 3 y 4 se registraron en 28% de los pacientes con lenalidomida. Las neoplasias secundarias ocurrieron en 5,2% y 3,5% de los pacientes tratados y no tratados, respectivamente.

Varios tratamientos diferentes y más intensivos han sido o están siendo explorados en pacientes con MQ. Estas nuevas estrategias, sin embargo, se han empleado en estudios piloto con un limitado número de pacientes o en ensayos fase II, con resultados todavía preliminares.

Inhibidores del proteasoma, lenalidomida y dexametasona

Un estudio en los Estados Unidos evaluó el tratamiento de pacientes con MQ de alto riesgo con carfilzomib, lenalidomida y dexametasona (KRd), resultando en una tasa de respuesta del 100%, con negatividad en el estudio de enfermedad mínima residual (EMR) en 92% (citometría de flujo) y 75% (NGS) de los pacientes²¹⁹. Luego de una mediana de seguimiento potencial de 43,3 meses, 63% de los pacientes se mantuvieron con EMR negativa, con tasas estimadas a los 4 años de supervivencia libre de progresión y supervivencia global de 71% y 100%, respectivamente.

Un estudio posterior fase II en pacientes con MQ de alto riesgo (según el modelo de la *Mayo Clinic* o de PETHEMA) evaluó KRd + mantenimiento con lenalidomida (KRd-R)²²⁰. El objetivo primario de remisión completa con EMR negativa fue alcanzado por un 70,2% de los pacientes, con una mediana de duración de 5,5 años. En el análisis correspondiente a los 5 años, un 10% de los pacientes había desarrollado MM. Los efectos adversos de grado 3-4 ocurrieron en 33% de los pacientes, sin registrarse decesos.

Entre los estudios examinando estrategias con una finalidad curativa se encuentra el GEM-CESAR, un ensayo fase II con una sola rama con pacientes de alto riesgo (> 50% de riesgo de progresión a MM en 2 años, según el modelo español de PETHEMA) y de ultra-alto riesgo²²¹. El tratamiento consistió en una inducción con KRd, seguida de una intensificación con melfalán a altas dosis y trasplante autólogo, consolidación con dos ciclos de KRd y mantenimiento con lenalidomida y dexametasona por dos años. El objetivo primario fue evaluar la tasa de EMR negativa por citometría de flujo de alta sensibilidad tras la inducción y el trasplante autólogo. Los resultados mostraron una tasa de respuesta de 98% tras la inducción, 98% tras trasplante autólogo y 100% tras

consolidación. Un 68,6% de los pacientes alcanzaron una remisión completa luego de la consolidación, con enfermedad mínima residual negativa en un 56%²²².

La combinación oral de tres drogas ixazomib, lenalidomida y dexametasona seguido de ixazomib + lenalidomida fue estudiado en un ensayo de fase II en pacientes con MQ de alto riesgo²²³. Los resultados preliminares con 61 pacientes incluidos en el estudio revelaron una tasa de respuesta del 90.9% (50/55), incluyendo 12 respuestas completas (21.8%). Ninguno de los pacientes progresó a enfermedad sintomática durante el tratamiento pero 4 lo hicieron durante el seguimiento posterior. Ninguno de los pacientes discontinuó el tratamiento por toxicidad.

Anticuerpos monoclonales

El ensayo de fase II randomizado CENTAURUS evaluó el uso de daratumumab (dirigido contra CD38) como terapia única con tres esquemas de tratamiento (extendida intensa, extendida intermedia y corta) en 123 pacientes con MQ de riesgo intermedio/alto²²⁴. Los objetivos primarios fueron una tasa de remisión completa >15% y la tasa de progresión/muerte por paciente/año. Con una mediana de seguimiento de 26 meses, la tasa de remisión completa para los tres esquemas fue de 4,9%, 9,8% y 0%. La tasa de muerte/progresión fue favorable en las tres ramas, con una mediana de PFS >2 años. A partir de estos resultados, se desarrolla el ensayo fase III AQUILA, que comparará 39 ciclos de daratumumab subcutáneo frente a observación activa en 360 pacientes con MQ de alto riesgo de acuerdo a la presencia de uno o más de los siguientes factores: CMs ≥ 3 g/dL, subtipo IgA, inmunoparesia, FLCr ≥ 8 pero < 100 , BMPC 51-60%²²⁵. El daratumumab también está siendo evaluado en combinación en diversos ensayos clínicos: el DETER-SMM, un ensayo fase III que evalúa lenalidomida y dexametasona frente a daratumumab, lenalidomida y dexametasona en 288 pacientes con MQ de alto riesgo, con supervivencia global como objetivo primario; o el ensayo fase II ASCENT, donde se evalúa daratumumab, carfilzomib, lenalidomida y dexametasona (DKRd) sin trasplante autólogo en pacientes con MQ de alto riesgo²²⁶.

El isatuximab (dirigido contra CD38) también está siendo evaluado en un ensayo de fase II como terapia única en pacientes con MQ de alto riesgo. En los primeros 24 pacientes evaluables las respuestas fueron similares a las reportadas con lenalidomida, incluyendo respuesta parcial (42%), muy buena respuesta parcial (17%) y respuesta completa con EMR negativa por citometría de flujo de alta sensibilidad (5%)²²⁷. El estudio fase III ITHACA evalúa isatuximab, lenalidomida y dexametasona frente a lenalidomida y dexametasona en pacientes con MQ de alto riesgo según los criterios de la Mayo Clinic (2/20/20) o de PETHEMA. Por el momento no se han registrado discontinuaciones del tratamiento por efectos adversos. Con una mediana de seguimiento de 19.4 meses, la tasa de respuesta completa es de 43.5%, con \geq muy buena respuesta parcial en 73.9% de los pacientes²²⁸.

La monoterapia con elotuzumab (anti-SLAMF7/CS1), un anticuerpo monoclonal que ha demostrado promover la actividad citotóxica de los linfocitos NK *in vitro*, ha demostrado una modesta actividad en pacientes con MQ (tasa de respuesta global de 10%) en un ensayo de fase II²²⁹. Otro estudio de fase II evaluó el elotuzumab en combinación con lenalidomida y dexametasona en pacientes con MQ de alto riesgo, con una tasa de respuesta global del 84% (6% de respuestas completas), y una PFS del 95% a los 36 meses de seguimiento²³⁰.

El inhibidor de *immune checkpoint* pembrolizumab (anti-PD1) fue evaluado en 13 pacientes con MQ de riesgo intermedio/alto. Con una mediana de 8 ciclos recibidos, 11 pacientes (85%) mantuvieron enfermedad estable, un paciente progresó y un paciente con deleción de 17p y un perfil de expresión génica de alto riesgo consiguió EMR negativa que persistió durante 27 meses. Tres pacientes discontinuaron el tratamiento por efectos adversos inmunes²³¹.

El siltuximab (anti IL-6) fue evaluado en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, en 85 pacientes con MQ de alto riesgo. Con una mediana de seguimiento de 29,2 meses, la tasa de PFS al año fue de 84,5% para la rama de tratamiento y 74,4% con placebo. La mediana de PFS no fue alcanzada con siltuximab, mientras que fue de 23,5 meses para el grupo placebo. Los efectos adversos fueron en su mayoría de grado 2-3, siendo comunes las infecciones y complicaciones urinarias²³².

Vacunas

PVX-410 es una vacuna compuesta por una combinación de 4 péptidos, dirigida contra 3 antígenos sobreexpresados en las células plasmáticas (XBP1, CD138 y CS1/SLAMF7). Estos 4 péptidos fueron seleccionados en base a experimentos *in vitro*, en los que se demostró que eran capaces de estimular una respuesta antígeno específica por parte de los linfocitos T citotóxicos, incluyendo proliferación, secreción de IFN gamma y actividad citotóxica²³³. Un ensayo multicéntrico fase I/IIa de escalada de dosis reclutó 22 pacientes con MQ de riesgo moderado/alto, que recibieron la vacuna con y sin lenalidomida²³⁴. Los efectos adversos más frecuentes fueron reacciones leves a moderadas en el sitio de inyección y síntomas constitucionales. PVX-410 resultó inmunogénica como monoterapia, y aún más en combinación con lenalidomida, como quedó demostrado por un aumento en los linfocitos T CD8+ IFN-gamma+ específicos, así como por un aumento sostenido de las células efectoras de memoria vacuna-específicas. En la cohorte de monoterapia, 3 de los 12 pacientes progresaron a MM, con una mediana de TTP de 36 semanas. En la cohorte de tratamiento combinado, 1 de los 12 pacientes progresó y 5 mostraron respuesta, con una mediana en el TTP no alcanzada. Esta vacuna está siendo evaluada en otro ensayo de fase I, en combinación con el inhibidor selectivo de histona-desacetilasa citarinostat y con lenalidomida²³⁵.

Manejo actual de los pacientes con mieloma quiescente

Para los pacientes con MQ de bajo riesgo o intermedio según los criterios del modelo 2/20/20, la observación constituye el estándar de tratamiento. Estos pacientes deben monitorizarse con determinaciones de hemograma, CMs, FLCs, calcio y creatinina cada 3-4 meses. El intervalo puede reducirse a un control cada 6 meses tras los primeros 5 años. En aquellos pacientes con un estudio de RMN que muestre infiltración difusa,

lesiones focales solitarias o lesiones dudosas, se recomienda la repetición del estudio de imagen en 3-6 meses. Si durante el seguimiento, los pacientes con $\geq 20\%$ BMPC presentan un comportamiento *evolving* del CMs y la hemoglobina, la posibilidad de un tratamiento debe ser considerada. Esta recomendación se basa en el hecho de que estos cambios se asocian con un riesgo de progresión a los 2 años $> 90\%$. De la misma manera, si durante el seguimiento los pacientes inicialmente caracterizados como de bajo riesgo cumplen criterios de alto riesgo según el modelo del 2018 de la Mayo Clínic o del IMWG, debe considerarse la posibilidad de intervención precoz²³⁶.

En el caso de los pacientes con MQ de alto riesgo, no existe actualmente consenso con respecto a la indicación de tratamiento precoz. Dos estudios aleatorizados con lenalidomida \pm dexametasona han mostrado beneficios en estos pacientes, aunque presentan limitaciones. En el estudio español, los pacientes comenzaron a ser reclutados en el 2007, antes de la utilización rutinaria de estudios de imágenes más avanzados y de la reclasificación diagnóstica del MM, por lo que se incluyeron pacientes que hoy serían considerados como MM. Aunque se evidenció un aparente beneficio en supervivencia global en los pacientes que recibieron tratamiento, el estudio no se diseñó con el poder suficiente para analizar supervivencia global, y sólo 28% de los pacientes en la rama control recibieron lenalidomida como tratamiento en el momento de progresión a MM²¹⁶. El estudio posterior confirmatorio del *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) reclutó también pacientes que no presentaban MQ de alto riesgo, tampoco fue diseñado con la potencia necesaria para evaluar diferencias en supervivencia global, y el cruce de los pacientes de la rama control a la rama de tratamiento previo al desarrollo de enfermedad sintomática limita la interpretación de los resultados²¹⁸. Si bien no existe evidencia contundente de un beneficio en cuanto a la supervivencia, ambos estudios demostraron un 90% de reducción en el tiempo transcurrido hasta constatarse daño de órgano blanco. En base a estos resultados, algunos grupos y expertos en el MQ recomiendan el tratamiento de pacientes con MQ de alto riesgo con lenalidomida \pm dexametasona (según comorbilidades y tolerancia al corticoide) durante dos años²³⁶.

Con respecto a la posibilidad de aplicar los regímenes utilizados en el tratamiento del MM, no existe suficiente evidencia de ensayos clínicos que apoyen dicha estrategia. Actualmente se encuentran en curso estudios comparando tripletes terapéuticos

(daratumumab, lenalidomida y dexametasona / isatuximab, lenalidomida y dexametasona frente a lenalidomida y dexametasona) e incluso tratamientos intensivos con quimioterapia a altas dosis y trasplante autólogo, con intención curativa. Una limitación de estos estudios, sin embargo, continúa siendo la ausencia de una rama control / observación que permita demostrar la utilidad del tratamiento precoz de los pacientes con MQ en cuanto a supervivencia global o incluso a calidad de vida.

Hipótesis

El mieloma quiescente es considerado hoy un constructo clínico de definición arbitraria para denominar un estadio intermedio asintomático entre la gammapatía monoclonal de significado incierto y el mieloma múltiple sintomático. Al analizar las curvas de progresión de los pacientes con mieloma quiescente, pueden identificarse patrones que reflejan las diferencias de un conjunto biológicamente heterogéneo: pacientes con un comportamiento biológicamente maligno que progresarán a mieloma múltiple en pocos meses y pacientes con un comportamiento biológico pre-maligno similar a una gammapatía monoclonal de significado incierto, que pueden presentar progresión o no luego de años de un curso clínico asintomático e indolente. La identificación de los pacientes con alto riesgo de progresión, con el fin de prevenir el daño orgánico, ha sido siempre una de las metas principales de la investigación en el campo de las gammapatías.

Hasta hace poco, la conducta clínica indiscutida frente a los pacientes con mieloma quiescente era el seguimiento estrecho para detectar eventos definitorios de mieloma múltiple que determinaran el inicio del tratamiento. Los resultados de ensayos clínicos recientes muestran que quizá esquemas basados en lenalidomida pudiesen ser superiores a la observación, en cuanto a la prevención del daño de órgano blanco, en pacientes con mieloma quiescente de alto riesgo. Sin embargo, a falta de un beneficio claro en cuanto a supervivencia en una población asintomática, las implicancias económicas, la toxicidad relacionada al tratamiento y el impacto en la calidad de vida deben ser cuidadosamente considerados a la hora de indicar un tratamiento precoz. Sobre todo, teniendo en cuenta que existen pacientes con mieloma quiescente que nunca progresarán a enfermedad sintomática.

En la actualidad, no existe un evento biológico definido que se haya asociado causalmente con la progresión, por lo que no es posible predecir con certeza al momento del diagnóstico que pacientes con mieloma quiescente progresarán. De este hecho surge la necesidad de refinar los modelos de estratificación de riesgo, para

identificar con la mayor exactitud posible que pacientes con mieloma quiescente se beneficiarían de un tratamiento precoz.

Una limitación significativa de los sistemas de estratificación de riesgo actualmente empleados es que utilizan variables o biomarcadores evaluados únicamente al momento del diagnóstico, asumiendo que el riesgo de progresión permanece constante a lo largo del tiempo. El comportamiento evolutivo del componente monoclonal en suero ha sido reconocido como un posible factor de riesgo para la progresión a mieloma múltiple, que reflejaría las diferencias biológicas existentes en este grupo heterogéneo de pacientes. Se han descrito dos tipos de gammapatías asintomáticas: el subtipo “*evolving*”, con un incremento progresivo del componente monoclonal en suero hasta el desarrollo de enfermedad sintomática, y el “*no evolving*”, en el cual el componente monoclonal en suero permanece estable.

Hipótesis 1: El comportamiento “*evolving*” del componente monoclonal en suero se asocia a un aumento significativo en el riesgo de progresión a enfermedad sintomática en los pacientes con mieloma quiescente.

La inmunoparesia (supresión de 1 o más de las inmunoglobulinas no involucradas) es un fenómeno frecuente en el mieloma quiescente (más del 80% de los pacientes), con supresión de las dos inmunoglobulinas en aproximadamente 50% de los casos. La inmunoparesia ha sido asociada con un aumento del riesgo de progresión a enfermedad sintomática. El desarrollo reciente del ensayo HLC (par de cadena pesada/ligera) en suero permite la cuantificación de ambos pares de un determinado isotipo de inmunoglobulina (e.g. IgGκ e IgGλ). Esto hace posible la evaluación de un nuevo tipo de inmunoparesia: la inmunoparesia del mismo isotipo o *isotype-matched* (por ejemplo, la supresión de IgGκ en un paciente con gammapatía IgGλ). La inmunoparesia del mismo isotipo ha sido descrita como un factor de riesgo independiente para la progresión de pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto y un factor de mal pronóstico en pacientes con mieloma múltiple de reciente diagnóstico o recaído.

Hipótesis 2: La inmunoparesia del mismo isotipo constituye, al igual que la inmunoparesia clásica, un factor de riesgo de progresión a enfermedad sintomática en los pacientes con mieloma quiescente.

No todos los pacientes con mieloma quiescente y un perfil genómico similar progresan a mieloma múltiple, lo que implica que alteraciones no genómicas (como las que afectan al microambiente tumoral) podrían jugar un papel fundamental en la progresión de la enfermedad. Los mecanismos de la inmunidad innata y adquirida pueden prevenir el crecimiento de las células plasmáticas clonales en los estadios asintomáticos, pero estudios recientes utilizando tecnologías de célula única describen un microambiente permisivo desde estadios tan tempranos como la gammapatía monoclonal de significado incierto. La progresión desde el estadio de mieloma quiescente a mieloma múltiple está asociada a una reducción de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en monocitos, un aumento de los linfocitos T reguladores y pérdida de células citotóxicas de memoria con predominio de células efectoras con un fenotipo anérgico. La información acerca de las alteraciones inmunes en el mieloma quiescente está, sin embargo, limitada a series muy pequeñas o referida a poblaciones celulares en sangre periférica.

Hipótesis 3: El mieloma quiescente se asocia a alteraciones cuantitativas y funcionales en el microambiente inmune a nivel medular que pueden explicar el comportamiento clínico heterogéneo de este grupo de pacientes.

Objetivos

1. Determinar el riesgo de progresión a enfermedad sintomática de acuerdo al comportamiento “*evolving*” o “*no evolving*”, así como la relación de estos subgrupos con otros factores de riesgo de progresión en pacientes con mieloma quiescente.
2. Evaluar prospectivamente la prevalencia y la gravedad de la inmunoparesia determinada mediante el análisis de pares de cadena pesada/ligera (HLC), su asociación con otros factores de riesgo de progresión a enfermedad sintomática y su valor pronóstico, en el suero de pacientes con mieloma quiescente al diagnóstico.
3. Caracterizar la composición del microambiente inmune que acompaña a las células plasmáticas neoplásicas en pacientes con mieloma quiescente de reciente diagnóstico, evaluando la expresión génica de la población CD138 negativa (no tumoral), correlacionando las características del microambiente tumoral con el comportamiento clínico y los factores de riesgo de progresión a enfermedad sintomática.

Materiales, métodos y resultados

En esta sección se describen los pacientes, materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos planteados.

Para ello, se incluyen los tres artículos científicos originales redactados y publicados como consecuencia del trabajo realizado.

Cada uno de los artículos referidos está precedido de un breve resumen en castellano para facilitar una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

El patrón “*evolving*” del componente monoclonal en pacientes con mieloma quiescente: impacto en el riesgo de progresión precoz.

Introducción

El mieloma quiescente (MQ) es una fase asintomática del mieloma múltiple (MM). Históricamente, ha sido definido de acuerdo al *International Myeloma Working Group* (IMWG) por la presencia de un componente monoclonal en suero (CMs) ≥ 30 g/L y/o $\geq 10\%$ de células plasmáticas en médula ósea (BMPC) en ausencia de daño de órgano blanco (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas). El MQ constituye una entidad clínica heterogénea, con algunos pacientes presentando un curso clínico indolente (similar a una gammapatía monoclonal de significado incierto) y otros con un comportamiento clínico más agresivo (mieloma temprano). Los factores que actualmente se asocian al riesgo de progresión están principalmente basados en la carga tumoral (CMs y BMPC) y/o estado inmunológico (inmunoparesia y cociente de cadenas ligeras libres -FLC ratio-). Los dos modelos de estratificación de riesgo más utilizados son los propuestos por la *Mayo Clinic* (basado en el CMs, BMPC y FLC ratio) y por el grupo español (basado en el cociente de células plasmáticas (CP) de fenotipo anormal / CP normales en médula ósea y en la presencia de inmunoparesia), con importantes discordancias entre ambos cuando son aplicados en la práctica clínica.

El comportamiento del CMs ha sido reconocido como otro posible factor de riesgo para la progresión. De esta manera, Rosiñol *et al.* describieron dos tipos de MQ: el llamado “*evolving*” y el “*no-evolving*”. Los pacientes con MQ de tipo *evolving* presentaron un incremento progresivo en el CMs hasta el desarrollo de MM, mientras que los pacientes de tipo *no-evolving* presentaron un CMs estable hasta el desarrollo de MM de manera abrupta. El subtipo *evolving* se asoció a un tiempo de progresión a enfermedad sintomática significativamente más corto.

El objetivo del presente estudio fue investigar el impacto del patrón *evolving* del CMs y otros factores en el riesgo de progresión a enfermedad sintomática en una serie de

pacientes diagnosticados de MQ, de acuerdo a criterios actualizados, en una única institución y con un largo seguimiento.

Pacientes y métodos

Se analizaron retrospectivamente 206 pacientes diagnosticados de MQ entre 1973 y 2012, de acuerdo a la definición del IMWG del 2003. El subtipo “*evolving*” fue definido como un incremento progresivo de, al menos, 10% en el CMs durante los primeros 12 meses desde el diagnóstico cuando el CMs inicial era ≥ 30 g/L, o durante un período de tres años (con un incremento progresivo en cada determinación anual) si el CMs inicial era < 30 g/L. Los pacientes con un CMs inicial ≥ 30 g/L fueron seguidos cada 3 meses, mientras que los pacientes con un CMs < 30 g/L tuvieron un control inicial a los 6 meses desde el diagnóstico, seguido de controles anuales. Otras variables evaluadas como predictivas de la progresión fueron: CMs (\geq o < 30 g/L), porcentaje de BMPC (≥ 20 o $< 20\%$), inmunoparesia, albumina sérica (≤ 35 o > 35 g/L), isotipo del CMs (IgA u otro), proteinuria de cadenas ligeras y la categoría pronóstica según el sistema de estratificación de la *Mayo Clinic*. El objetivo principal del estudio fue la progresión a enfermedad sintomática, y el subtipo *evolving* fue analizado como una variable tiempo dependiente.

Resultados

La mediana de seguimiento de la cohorte de 206 pacientes fue de 6,8 años desde el diagnóstico de MQ. La mediana de supervivencia fue de 11,8 años (95% CI 9,8-16,2), con 90 pacientes fallecidos durante el seguimiento y 116 censurados vivos. En total, 107 pacientes (52%) progresaron a enfermedad sintomática (106 a MM y 1 a amiloidosis AL) luego de una mediana de tiempo desde el diagnóstico de 2,8 años (IQR: 0,6-11,3).

Los factores asociados con un aumento del riesgo de progresión a enfermedad sintomática al momento del diagnóstico fueron la cuantía del CMs, el porcentaje de BMPC, la presencia de inmunoparesia y el grupo de riesgo de acuerdo al sistema de estratificación de la *Mayo Clinic*.

El subtipo *evolving* fue reconocido en 25% de los pacientes (47 de 185 pacientes en los que pudo ser evaluado). Cuarenta y dos (89%) de ellos progresaron a MM durante el seguimiento, y 5 fueron censurados vivos sin haber presentado progresión. La mediana de tiempo desde el reconocimiento del subtipo *evolving* y la progresión a enfermedad sintomática fue de 1,1 años (95% CI 0,5-2) y 71% de los pacientes habían progresado al cumplirse el tercer año.

El reconocimiento del subtipo *evolving* drásticamente empeoró la estimación de riesgo hecha al diagnóstico. De esta manera, la infiltración medular por CP (BMPC \geq 20%), la cuantía del componente monoclonal (CMs \geq 30 g/L) o la presencia de inmunoparesia, relevantes al momento del diagnóstico, perdieron significancia una vez reconocido el subtipo *evolving*, que pasó de esta manera a ser la única variable estadísticamente relevante. En promedio, el *hazard ratio* para la progresión a enfermedad sintomática aumentó a 5,1 (95% CI 3,4-7,6) luego del reconocimiento del comportamiento *evolving*. La supervivencia luego de la progresión fue significativamente más corta en los pacientes con una fase previa *evolving* (mediana de 3,4 años, 95% CI 1,8-5,1) con respecto a los que no la habían presentado (mediana de 6,1 años, 95% CI 3,5-10,9).

Discusión

Los estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado que más del 50% de los pacientes con MQ *evolving* presentaban un antecedente de GMSI, también con un patrón *evolving* del CMs. Este subtipo de MQ se asoció a un patrón diferente de anomalías genéticas, presentando cambios ya descritos en pacientes con MM sintomático *de novo*. Estos hallazgos nos llevan a la hipótesis de que los pacientes con un patrón *evolving* podrían compartir mecanismos patogénicos con el MM, constituyendo el MQ *evolving* un paso transitorio entre la GMSI y la enfermedad sintomática. La GMSI y el MQ no *evolving* representarían un fenotipo más frecuente, necesitando un evento oncogénico adicional para iniciar la transformación maligna.

Este estudio confirma el impacto pronóstico del patrón *evolving* en el riesgo de progresión a enfermedad sintomática, en una serie amplia de pacientes con MQ diagnosticados de acuerdo a los criterios modificados por el IMWG en el 2003. En el análisis multivariado, el patrón *evolving* demostró ser el factor de riesgo más importante para la progresión. Es más, el impacto pronóstico de factores de riesgo ya bien establecidos al diagnóstico (cuantía del CMs, BMPC e inmunoparesia) estuvo restringido a los pacientes con un comportamiento no *evolving*. El impacto pronóstico del patrón *evolving* se mantuvo aún tras la progresión a MM, lo que podría reflejar diferentes mecanismos involucrados en el control de la enfermedad y la sensibilidad a drogas asociados a este comportamiento biológico. La estratificación clínica basada en el comportamiento del CMs podría ser la base para el diagnóstico precoz de la enfermedad sintomática o la selección de pacientes que puedan beneficiarse del tratamiento temprano en el marco de ensayos clínicos.

En conclusión, en la presente serie de pacientes con MQ y un seguimiento prolongado, el patrón *evolving* predijo el mayor riesgo de progresión precoz a enfermedad sintomática, independientemente de los factores de riesgo tradicionales al momento del diagnóstico. La presencia del subtipo *evolving* debería ser rutinariamente evaluada durante el seguimiento de estos pacientes, permitiendo la identificación temprana de estos pacientes como posibles candidatos a tratamiento.



Multiple myeloma, gammopathies

Evolving M-protein pattern in patients with smoldering multiple myeloma: impact on early progression

Carlos Fernández de Larrea¹ · Ignacio Isola¹ · Arturo Pereira² · Ma Teresa Cibeira¹ · Laura Magnano³ · Natalia Tovar¹ · Luis-Gerardo Rodríguez-Lobato¹ · Xavier Calvo³ · Juan I. Aróstegui⁴ · Tania Díaz¹ · Ester Lozano¹ · María Rozman³ · Jordi Yagüe⁴ · Joan Bladé¹ · Laura Rosiñol¹

Received: 26 September 2017 / Revised: 23 November 2017 / Accepted: 13 December 2017 / Published online: 2 February 2018
© Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature 2018

Abstract

Smoldering multiple myeloma (SMM) is a biologically heterogeneous, clinically defined entity with a variable rate of progression to symptomatic multiple myeloma (MM). Reliable markers for progression are critical for the development of potential therapeutic interventions. We retrospectively evaluated the predictive value of the evolving pattern of serum M-protein among other progression risk factors in 206 patients with SMM diagnosed between 1973 and 2012. Median time from recognition of evolving type to progression into symptomatic MM was 1.1 years (95% CI 0.5–2.0) and progression rate at 3 years was 71%. Development of the evolving type drastically worsened the prognostic estimation made at diagnosis for every covariate predictive of progression (serum M-protein size, bone marrow plasma cell infiltration, immunoparesis and Mayo Clinic risk). On average, the hazard ratio for progression to symptomatic MM increased to 5.1 (95% CI 3.4–7.6) after recognition of the evolving type. In conclusion, in patients with SMM the evolving pattern accurately predicts the risk of early progression to symptomatic disease, thereby allowing the identification of ultra-high risk patients who would be candidates for immediate therapy.

These authors contributed equally: Carlos Fernández de Larrea and Ignacio Isola.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0013-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Joan Bladé
jblade@clinic.cat

- ¹ Department of Hematology, Amyloidosis and Myeloma Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain
- ² Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain
- ³ Department of Hematopathology, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain
- ⁴ Department of Immunology, Amyloidosis and Myeloma Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

Introduction

Smoldering multiple myeloma (SMM) is an asymptomatic phase of multiple myeloma (MM) [1, 2]. It has been historically defined by the International Myeloma Working Group (IMWG) as the presence of a serum M-protein (MP) of ≥ 30 g/L and/or $\geq 10\%$ bone marrow plasma cells (BMPC) in the absence of end-organ damage (hypercalcemia, renal insufficiency, anemia or bone lesions) [3].

SMM constitutes a heterogeneous clinical entity with some patients showing an indolent course (“monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)-like”) while others have a more aggressive behavior (“early myeloma”). The current factors associated with the risk of progression are mainly based on tumor load (M-protein size and BMPC infiltration) and/or immunological status (immunoparesis and serum free light-chain -FLC- ratio) [4]. The two most widely used risk stratification models are the proposed by the Mayo Clinic [5, 6] (based on M-protein size, percentage of BMPC and FLC ratio) and the Spanish Group [7, 8] (based on the ratio of plasma cells with abnormal immunophenotype to normal plasma cells in the bone marrow and the presence of immunoparesis), with significant discordances between them [9].

The behavior of the serum M-protein level has been recognized as another possible risk factor for progression. Thus, Rosiñol et al. [10] described two types of SMM: the so-called evolving and the non-evolving. Patients with the evolving type had a progressive increase in the serum M-protein until symptomatic myeloma developed, whereas the non-evolving type had a stable serum M-protein value until the development of symptomatic myeloma abruptly occurred. The evolving type was associated with a significantly shorter time to progression to symptomatic disease.

The aim of the current study was to investigate the impact of the evolving pattern of serum M-protein and other factors on the risk of progression to symptomatic MM in a series of patients diagnosed with SMM according to more recent criteria and a long follow-up from a single institution.

Subjects and methods

Patients

We retrospectively analyzed a series of 206 patients with newly diagnosed SMM seen at our institution from January 1973 to December 2012. All patients met the IMWG 2003 definition of SMM: $\geq 10\%$ BMPCs and/or serum M-protein ≥ 30 g/L plus absence of hypercalcemia (calcium > 11.5 mg/dL), renal failure (creatinine > 2 mg/dL), anemia (hemoglobin < 10 g/dL) or bone lesions attributable to the plasma cell disorder. Patients with an IgM monoclonal protein were excluded. The Ethics Committee of Hospital Clinic of Barcelona provided institutional review board-approval for this study.

Definition of the “evolving” type and baseline parameters

The “evolving” type was defined as a progressive increase of at least 10% in the M-protein size within the first 12 months from diagnosis when baseline M-protein was ≥ 30 g/L [10] or over a period of 3 years (with a progressive increase in the M-protein size in each of the annual measurements) in patients with an initial M-protein < 30 g/L [11] (Supplementary Table 1). Patients with an initial M-protein ≥ 30 g/L were followed every 3 months, while patients with an M-protein < 30 g/L had a follow up visit after 6 months and annually thereafter. A serum electrophoresis, 24-h urine protein excretion and urine electrophoresis (if the total urine protein was higher than the 200 mg/24 h) was performed at each visit. Immunoparesis was defined as a decrease below normal levels of at least one of the uninvolved immunoglobulins. Bone marrow aspirates obtained at diagnosis were reviewed independently by two observers; plasma cell percentages were estimated from a 500-cell count by each

examiner and the mean of the two values was considered for the analysis.

Statistical analysis

The main endpoint was progression to symptomatic MM. Factors predicting progression were analyzed by Cox multivariate regression. Variables at diagnosis and cut-off values investigated as predictors for progression were selected among those identified by previous authors and included the M-protein size (≥ 30 vs. < 30 g/L), proportion of BMPC (≥ 20 vs. $< 20\%$), immunoparesis, serum albumin (≤ 35 vs. > 35 g/L), isotype of the M-component (IgA vs. other), light chain proteinuria, and the Mayo Clinic prognostic categories. The evolving type was analyzed as a time-dependent covariate. Age and gender were included in the multivariate analysis as possible confounders. The proportional hazards assumption was checked for all these variables by graphical means and the Grambsch-Therneau test [12].

Continuous and count data were summarized as median and interquartile range (IQR). Categorical data were represented as proportions. The 95% confidence interval (CI) was used to inform about the precision of estimations (e.g., median survival). Statistical comparisons of demographic and clinical features were performed by using the χ^2 test for categorical variables, and the Mann–Whitney U test for continuous or ordered data. All the statistical analyses were done with IBM SPSS Statistics 22.0 and Stata 11 (www.stata.com).

Graphical representation of evolving type as a time-dependent covariate with two levels was done by the Simon–Makuch method implemented in Stata. In this method, the starting point (t_0) switches from diagnosis to the landmark time when the covariate level changes (diagnosis of evolving type in this case), and the number of patients at risk is calculated over the follow-up for each level of the covariate [13].

Results

Clinical characteristics and outcome

A total of 206 patients (75 M/131 F; median age 64 years, range 32–92) were available for analysis. Patient characteristics at SMM diagnosis are shown in Table 1. The median follow-up for the cohort was 6.8 years from the diagnosis of SMM. The median survival was 11.8 years (95% CI 9.8–16.2) with 90 patients dying during the follow-up period and 116 censored alive. In total, 107 patients (52%) progressed to symptomatic disease (106 to MM and 1 to AL amyloidosis) after a median of 2.8 years after the diagnosis of SMM (IQR: 0.6–11.3).

Table 1 Baseline characteristics of patients with smoldering multiple myeloma

	Patients <i>N</i> = 206
Median age, years (range)	64 (32–92)
Female gender, <i>N</i> (%)	131 (64)
Serum M-protein, g/L; median (range)	24.4 (0–55)
M-protein type, <i>N</i> (%)	
IgG	145 (70)
IgA	56 (27)
Light chain only	2 (1)
Biclonal	3 (2)
Light chain type, <i>N</i> (%)	
Kappa	123 (60)
Lambda	81 (39)
Biclonal	2 (1)
Presence of urine M-protein, <i>N</i> (%)	61 (40)
Immunoparesis, <i>N</i> (%)	87 (53)
BMPC (%), median (range)	15 (2–85)
SMM diagnostic criteria, <i>N</i> (%)	
1. MP \geq 30 g/L and BMPC \geq 10%	64 (31)
2. MP < 30 g/L and BMPC \geq 10%	131 (64)
3. MP \geq 30 g/L and BMPC < 10%	9 (5)

MP serum monoclonal protein, BMPC bone marrow plasma cell percentage

Figure 1 illustrates the disease course of 185 patients who had available serial M-protein measurements and enough follow up to evaluate the evolving pattern. As it can be seen, the evolving pattern was recognized in 47 patients while 49 progressed abruptly to symptomatic MM and 18 died without prior evolving phase or progression.

Prognostic factors at diagnosis and features at progression

At diagnosis, factors associated with increased risk of progression to symptomatic MM included the size of the M-protein, the percentage of BMPC, presence of immunoparesis, and the Mayo Clinic risk group (Table 2). Hypoalbuminemia, IgA isotype, and light chain proteinuria did not result in an increased risk of progression. Of the 206 patients analyzed in the study, 8 (3.9 %) had 60% or more BMPC at diagnosis. Among the 7 patients with BMPC \geq 60%, 3 progressed to MM within 2 years (HR 2.37, P = 0.042), 1 after 3.6 years, 1 after 5.4 years and 2 did not progress to symptomatic disease during follow up (2.4 and 8 years).

At the time of progression, clinical findings were mainly anemia (52%) and skeletal lytic lesions (40%). Renal insufficiency or extramedullary plasmocytomas were identified in 4 patients (4%), while hypercalcemia was present in

Table 2 Unadjusted hazard rate of factors at diagnosis of SMM predicting transformation into symptomatic MM

Factor	Hazard rate (95% CI)	<i>P</i> -value
Serum M-protein \geq 30 g/L	2.67 (1.82–3.93)	<0.001
Bone marrow plasma cells \geq 20%	3.70 (2.51–5.46)	<0.001
Serum albumin <35 g/L	1.77 (0.85–3.67)	0.12
Immunoparesis	2.20 (1.36–3.57)	0.001
IgA isotype (vs. other)	1.33 (0.88–2.02)	0.17
Light chain proteinuria	1.56 (0.96–2.52)	0.07
Mayo Clinic risk group	2.34 (1.60–3.40)	<0.001

only 3 patients (3%). The median survival after progression was 4 years (95% CI 2.6–5.4).

Evolving pattern and clinical features at progression

An evolving type was recognized in 25% of patients (47 out of 185 assessable patients). IgA isotype was more frequent in patients with an evolving pattern than in those with non-evolving SMM, but not reaching statistical significance (38 vs. 24%; P = 0.061). At the study closing date, 42 (89%) of these 47 patients had progressed to symptomatic MM and 5 were censored alive without progression (Fig. 1). Median time from recognition of evolving type to progression into symptomatic MM was 1.1 years (95% CI 0.5–2.0) and 71% patients had progressed by the third year (Fig. 2).

The recognition of an evolving type drastically worsened the prognostic estimation made at diagnosis for every covariate predictive of progression (Figs. 3, 4, and 5). Thus, the significance of the percentage of BMPC infiltration (\geq 20%), the size of the serum M-protein (\geq 30 g/L) or the presence of immunoparesis, relevant at the time of diagnosis, were not significant anymore at the time of recognition of the evolving pattern, as this last factor became the only statistically relevant variable. On average, the hazard ratio for progression to symptomatic MM increased to 5.1 (95% CI 3.4–7.6) after the recognition of the evolving type.

There was no statistical difference between the clinical pattern of progression (such as anemia, renal failure, extramedullary disease, hypercalcemia, and new lytic lesions) between patients with evolving and no evolving SMM. Median survival after progression was significantly shorter in patients who had a previous evolving phase (median 3.4 years, 95% CI 1.8–5.1) than in those who had not (median 6.1 years; 95% CI 3.5–10.9; P = 0.01) (Fig. 6).

Discussion

The evolving type SMM was first described by Rosiñol et al. [10] in a group of 53 patients with SMM diagnosed

Fig. 1 Flowchart showing the evolution of patients diagnosed with smoldering multiple myeloma according to their M-protein pattern

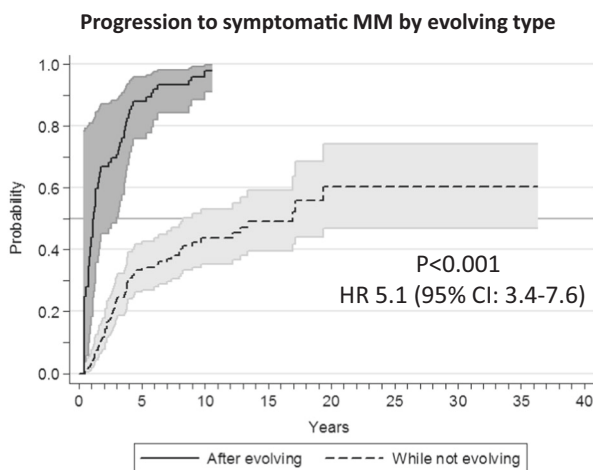
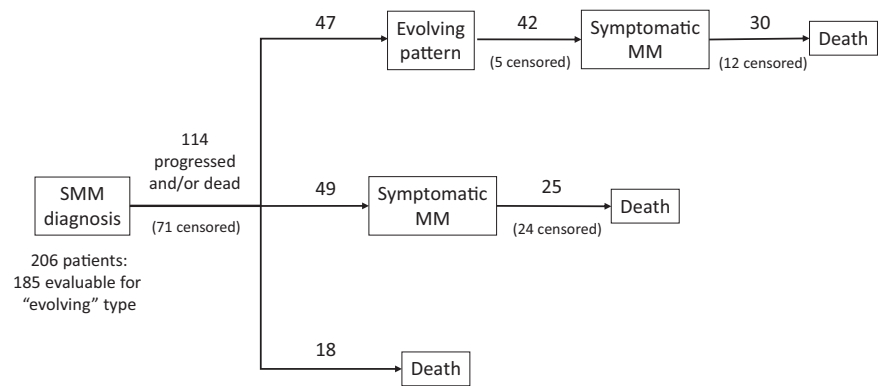


Fig. 2 Progression to symptomatic multiple myeloma according to SMM subtype: evolving versus non-evolving

according to established criteria prior to the IMWG consensus of 2003, thus fulfilling the original description of this entity (BMPC $\geq 10\%$ and M-protein ≥ 30 g/L) [14]. This pattern of evolution, defined as an increase in the M-protein level in each of the first two consecutive follow-up visits, was present in 46% of SMM patients and was associated with a higher frequency of IgA isotype and significantly shorter median time to progression compared to the non-evolving type (1.3 vs. 3.9 years, respectively). The actuarial probability of progression at 2 and 5 years for the evolving and the non-evolving type was 66 and 88 vs. 12 and 58%, respectively. Most of the patients in the series progressed clinically with increasing anemia and/or skeletal involvement, with none of them developing renal impairment, hypercalcemia, or extramedullary plasmacytomas at the time of progression. The evolving type of MGUS, defined as a progressive increase in the serum M-protein level in each of the annual consecutive measurements during a period of 3 years, was also described by our group in 8% of a series of 359 patients with MGUS [11]. With an actuarial probability of progression at 20 years of 80%, the evolving pattern emerged as the most important risk factor for

malignant transformation, with a much higher relative risk than tumor burden markers (serum M-protein size and proportion of BMPC).

Of interest, the work done by our group has shown that more than 50% of patients with evolving SMM had a previous long-lasting MGUS, also with an evolving behavior [10]. This subtype of SMM was even correlated with a different pattern of genetic abnormalities observed by comparative genomic hybridization, with evolving SMM presenting changes reported in patients with symptomatic de novo multiple myeloma (high frequency of chromosomal losses and 1q gains) [15]. These findings led us to the hypothesis that patients with an evolving pattern could share pathogenic mechanisms with multiple myeloma, evolving SMM being a transient step between MGUS and symptomatic disease. Non-evolving MGUS or SMM would represent a more frequent phenotype (for unknown reason until now), needing a second oncogenic event to initiate the malignant transformation. It is clear that more biological studies to determine the genetic, epigenetic, and immunological abnormalities associated with the evolving behavior are needed.

The present study confirms the prognostic impact of the evolving pattern on the probability of progression to symptomatic myeloma, in a large series of SMM patients defined according to the modified diagnostic criteria by the IMWG in 2003 [3]. At multivariate analysis, the evolving pattern was the strongest risk factor for progression, with a higher hazard ratio than other well recognized prognostic factors, such as the baseline size of serum M-protein, the percentage of BMPC and immunoparesis. Moreover, the prognostic impact of these three factors was not statistically significant for progression to symptomatic disease if the evolving pattern was diagnosed, their relevance being mainly restricted to the non-evolving patients. The ominous impact of the evolving pattern remains even after the progression to symptomatic MM. Therefore, the mechanisms involved in the disease control and/or the sensitivity to the drugs of the malignant plasma cells could be differentially expressed between the two pattern groups and last for the whole evolution of the disease.

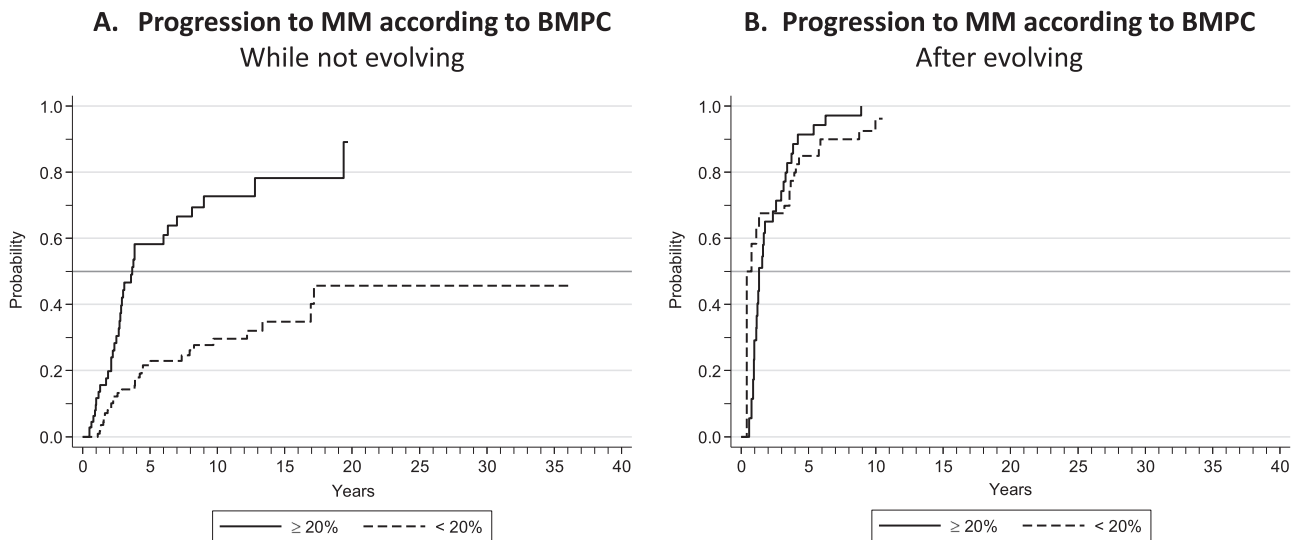


Fig. 3 Risk of progression to symptomatic multiple myeloma according to bone marrow plasma cell infiltration, while not evolving (a) and after recognition of evolving subtype (b)

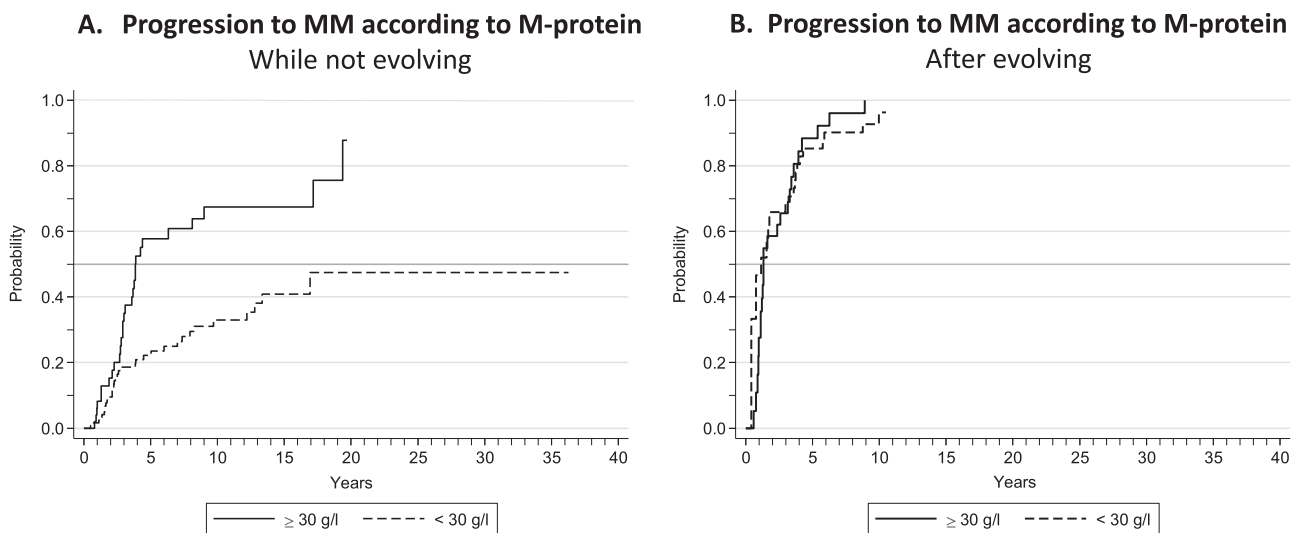
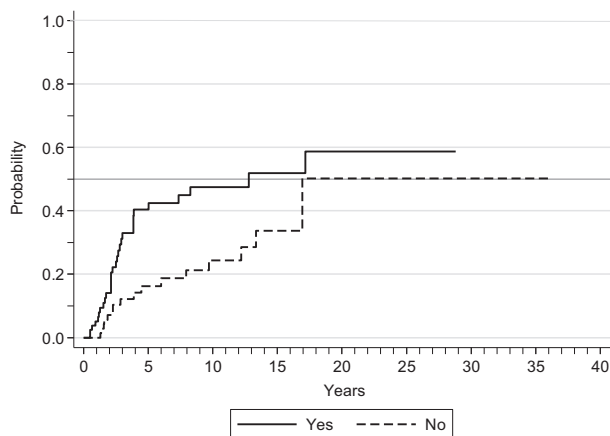


Fig. 4 Risk of progression to multiple myeloma according to size of serum M-component, while not evolving (a) and after recognition of evolving subtype (b)

Ravi et al. [16] recently identified evolving changes in hemoglobin and M-protein as independent predictors of early progression in another single-center cohort of patients with SMM. In this study, the percentage of SMM patients with an “evolving” behavior was 30.5%, similar to the 25% described in our series. Individuals displaying both an increase in M-protein ($\geq 10\%$ within the first 6 months from diagnosis if baseline M-protein ≥ 3 g/dL or $\geq 25\%$ within the first 12 months for any level of baseline M-protein) and a decrease of hemoglobin (at least 0.5 g/dL within the first 12 months) had $>80\%$ risk of progression to symptomatic MM within 2 years of diagnosis.

The recognition of SMM and MGUS [17] may provide a unique therapeutic window to prevent or delay the progression or even cure the disease before further clonal heterogeneity, immune dysfunction, and microenvironment dysregulation develop [18]. In this regard, there is already a clinical trial showing the benefit of early intervention in progression-free survival and overall survival in a high-risk SMM population [19]. The major barrier to early therapy is the current inability to accurately define the group of patients who would benefit from it and avoid potential overtreatment [20]. Our clinical stratification based on the dynamic of the serum M-spike could be the basis for either early diagnosis of symptomatic myeloma (ultra high-risk

A. Progression to MM according to immunoparesis While not evolving



B. Progression to MM according to immunoparesis After evolving

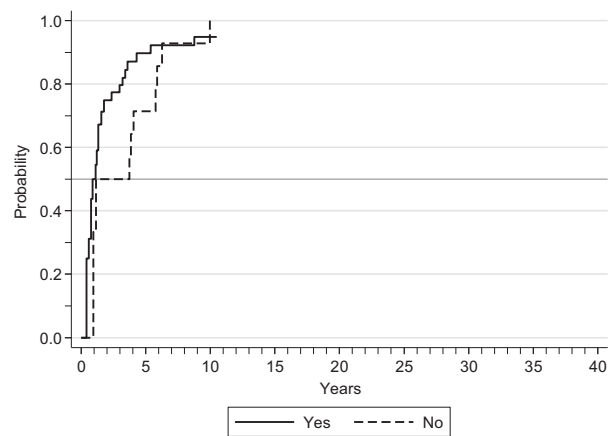
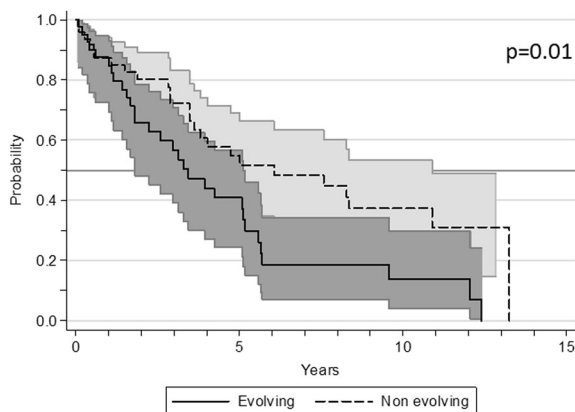


Fig. 5 Risk of progression to symptomatic multiple myeloma according to presence of immunoparesis, while not evolving (**a**) and after recognition of evolving subtype (**b**)

Survival after transformation into symptomatic MM



Median survival: 3.4 (95% CI: 1.8-5.1) yrs vs. 6.1 (95% CI: 3.5-10.9) yrs

Fig. 6 Survival after progression to symptomatic multiple myeloma according to the previous evolving type

group) or selection of patients for clinical trials (high-risk group). Median time to progression for previously published high-risk SMM models is presented in Supplementary Table 2.

Newly described predictors of progression in SMM, such as genomic profiles [21] and quantification of circulating clonal plasma cells [22], may become a standard in the future. However, these tools are not yet available for the majority of centers. The main advantage of our risk model is that it involves variables that are part of common clinical practice worldwide. An important limitation of this study is the difficulty associated with the evaluation of M-protein level variations in patients with a small size M-protein (<30 g/L) based on serum protein electrophoresis. Thus, it could be interesting to investigate the evolving pattern according

to the newer and more precise M-protein measuring assays (i.e., immunoglobulin heavy chain/light chain pairs, Hevy-lite™) [23, 24].

As recommended in the most recent IMWG consensus [25], reliable biomarkers associated with roughly an 80% probability of progression within 2 years would identify patients that should be regarded as having symptomatic multiple myeloma and offered therapy. This threshold would indicate a median time to development of end-organ damage of about 12 months, making a delay of therapy unreasonable. In a Mayo Clinic study [26], 3% of SMM patients presented with a BMPC infiltration of at least 60% and this was associated with a high risk (95%) of progression to symptomatic disease within 2 years from diagnosis (median time to progression of 7 months). A serum involved to uninvolved FLC ratio of at least 100 was noted in 15% of SMM patients at the same institution [27], also with a high risk of progression (72%) to symptomatic disease within the first 2 years. Finally, in 149 patients with SMM studied in Heidelberg by whole-body MRI [28], the presence of more than one focal lesion was identified in 15% of them. In this group of patients, the median time to progression was 13 months, and 70% had progressed by 2 years. These findings led to the incorporation of these novel biomarkers in the revised IMWG diagnostic criteria for multiple myeloma [25]. Because of the retrospective nature of this study resulting in a long term follow-up, newly described risk factors for progression of SMM such as the proportion of abnormal plasma cells by flow cytometry, FLC ratio and presence of focal lesions by MRI imaging have not been assessed. In our series, evolving type was recognized in 25% of patients, with a median time from recognition of evolving type to progression into

symptomatic MM of only 1 year and with a five-fold increase of the risk of progression. Moreover, the recognition of the evolving type drastically worsened the prognostic estimation made at diagnosis based on known risk factors for progression (baseline serum M-protein size, BMPC infiltration, and immunoparesis).

In conclusion, in the present series of patients with SMM with a long follow-up, the evolving pattern accurately predicts the risk of early progression to symptomatic disease independently of the standard risk-factors at diagnosis. Evolving type should be routinely investigated during the follow-up of the disease, allowing the prompt identification of these patients as candidates for immediate therapy.

Acknowledgements We would like to thank Esther Bladé for her technical support in this research. This work has been supported in part by grants PI16/0423 and PI12/1093 from Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” and 2014SGR-552 from Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (Generalitat de Catalunya).

Author contributions C.F.L. and I.I. designed the study, collected and analyzed data, performed statistical analysis, wrote and reviewed the paper; A.P. analyzed data, performed statistical analysis, wrote and reviewed the paper; M.C., L.G.L.R., and N.T. collected data and reviewed the paper; X.C. and L.M. collected data, reviewed bone marrow aspirates and reviewed the paper; M.R. reviewed bone marrow aspirates and reviewed the paper; J.I.A., E.L., T.D., and J.Y. collected data, performed laboratory assays and reviewed the paper; L.R. and J. B. analyzed data and reviewed the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010;24:1121–27.
- Ravindran A, Bartley AC, Holton SJ, Gonsalves WI, Kapoor P, Siddiqui MA, et al. Prevalence, incidence and survival of smoldering multiple myeloma in the United States. *Blood Cancer J*. 2016;6:e486.
- 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;121:749–57.
- 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*. 2010;28:690–97.
- Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin P, Hodnefield J, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2007;356:2582–90.
- Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 2008;111:785–89.
- Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007;110:2586–92.
- Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Las Heras N, de Coca AG, et al. Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of the monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol*. 2010;148:110–14.
- Cherry BM, Korde N, Kwok M, Manasanch EE, Bhutani M, Mulquin M, et al. Modeling progression risk for smoldering multiple myeloma: results from a prospective clinical study. *Leuk Lymphoma*. 2013;54:2215–18.
- Rosiñol L, Bladé J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Montoto S, et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol*. 2003;123:631–36.
- Rosiñol L, Cibeira MT, Montoto S, Rozman M, Esteve J, Filella X, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc*. 2007;82:428–34.
- Grambsch PM, Therneau TM. Proportional Hazards Tests and Diagnostics based on Weighted Residuals. *Biometrika*. 1994;81:515–26.
- Schultz LR, Peterson EL, Breslau N. Graphing survival curve estimates for time-dependent covariates. *Int J Methods Psychiatr Res*. 2002;11:68–74.
- Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1980;302:1347–49.
- Rosiñol L, Carrió A, Bladé J, Queralt R, Aymerich M, Cibeira MT, et al. Comparative genomic hybridization identifies two variants of smoldering multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005;130:729–32.
- Ravi P, Kumar S, Larsen JT, Gonsalves W, Buadi F, Lacy MQ, et al. Evolving changes in disease biomarkers and risk of early progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2016;6:e454.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346:564–69.
- Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. *Blood*. 2015;125:3069–75.
- Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2013;369:438–47.
- Caers J, Fernández de Larrea C, Leleu X, Heusschen R, Zojer N, Decaux O, et al. The Changing landscape of smoldering multiple myeloma: a European perspective. *Oncologist*. 2016;21:333–42.
- Dhodapkar MV, Sexton R, Waheed S, Usmani S, Papanikolaou X, Nair B, et al. Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood*. 2014;123:78–85.
- Gonsalves WI, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Dingli D, Timm MM, Morice WG, et al. Quantification of circulating clonal plasma cells via multiparametric flow cytometry identifies patients with smoldering multiple myeloma at high risk of progression. *Leukemia*. 2016;31:130–35.
- Katzmann JA, Rajkumar SV. A window into immunoglobulin quantitation and plasma cell disease: antigen epitopes defined by the junction of immunoglobulin heavy and light chains. *Leukemia*. 2013;27:1–2.

24. Magnano L, Fernández de Larrea C, Elena M, Cibeira MT, Tovar N, Aróstegui JI, Pedrosa F, et al. Prognostic impact of serum heavy/light chain pairs in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma: long-term results from a single institution. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016;16:e71–7.
25. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15:e538–48.
26. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;365:474–75.
27. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27:941–46.
28. Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, Bächerle T, Ayyaz S, Heiss C, et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28:1606–10.

Supplementary Table 1. Definition of the evolving type

Baseline M-protein	Evolving type
Serum M-protein \geq 30 g/L	Progressive increase of at least 10% in the M-protein size within 12 months of diagnosis
Serum M-protein < 30 g/L	Increase of at least 10% over a period of 3 years with a progressive increase in each of the annual measurements

Supplementary Table 2. Comparison of median time to progression for previously published high risk SMM models

Risk model	Median time to progression (months)
MAYO CLINIC 2008 ¹ (MP ≥30 g/L + BMPC ≥ 10% + FLC ratio <0.125 or >8)	22.8
PETHEMA ² (≥95% aberrant BMPC + immunoparesis)	34
BMPC ≥ 60% ³	7
FLC ratio ≥ 100 ⁴	15
MAYO CLINIC 2016 ⁵ (BMPC ≥20%, evolving MP, evolving Hb)	12
Evolving MP (BARCELONA)	13.2*

* Median time to progression from recognition of evolving type.

Abbreviations: MP, serum monoclonal protein; BMPC, bone marrow plasma cells; FLC, serum free light chains; Hb, hemoglobin.

1- Dispenzieri et al. Blood 2008; **111**:785-789.

2- Pérez-Persona et al. Blood 2007; **110**:2586-2592.

3- Rajkumar et al. NEJM 2011; **365**:474-475.

4- Larsen et al. Leukemia 2013; **27**:941-946.

5- Ravi et al. Blood Cancer Journal 2016; **6**:e454.

La inmunoparesia definida por la supresión del par de cadenas pesada/ligera en los pacientes con mieloma quiescente demuestra especificidad de isotipo inicial y afecta a otros isotipos en estadios avanzados.

Introducción

El reciente desarrollo de la determinación de pares de cadena pesada/ligera (HLC) en suero permite la medición de ambos pares de uno de los isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, la cuantificación de IgG λ e IgG κ en un paciente con gammapatía IgG λ). La introducción de esta prueba HLC hizo posible la evaluación del efecto supresor del clon maligno en el par policlonal del mismo isotipo, permitiendo el estudio de un nuevo tipo de inmunoparesia: la inmunoparesia isotipo específica o *isotype-matched immunoparesis* (IMI). Este fenómeno ha sido descrito como un factor de riesgo independiente para predecir la progresión a enfermedad sintomática de pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), y se ha asociado con una supervivencia más corta en pacientes con mieloma múltiple (MM) recaído o refractario.

La inmunoparesia, definida de acuerdo a la medición de inmunoglobulinas (Ig) totales (reducción por debajo de la normalidad de una de las Ig de un isotipo diferente), ha demostrado constituir un factor de riesgo independiente para la progresión de los pacientes con MQ. Sin embargo, la información con respecto a la inmunoparesia definida de acuerdo a los estudios con HLC es escasa. En un estudio prospectivo de 50 pacientes con MQ, la IMI resultó ser más prevalente que la supresión de Ig de un isotipo diferente, y se asoció con características biológicas relacionadas a un pronóstico adverso. Utilizando la determinación de HLC, la supresión de pares de HLC de un isotipo diferente (IgA λ e IgA κ , o IgM λ e IgM κ) se asoció significativamente con un tiempo a la progresión más corto de los pacientes con GMSI/MQ IgG, en una serie pequeña de una única institución.

El objetivo de este estudio es caracterizar prospectivamente la prevalencia y gravedad de la inmunoparesia determinada por la medición de los pares de HLC, su asociación con otros factores de riesgo de progresión y su significado pronóstico, en pacientes con MQ diagnosticados en una única institución.

Materiales y métodos

El grupo de estudio consistió en 53 pacientes con MQ de reciente diagnóstico en nuestra institución, entre 2014 y 2019. La presencia de IMI fue definida mediante el ensayo de HLC en suero, como una concentración por debajo del rango de normalidad del par policlonal con el mismo isotipo del CMs (por ejemplo, supresión de IgGk en un paciente con MQ IgGλ). Adicionalmente, la inmunoparesia HLC (HLC IP) se definió como la supresión de cualquier Ig con un isotipo de cadena pesada diferente (por ejemplo, supresión de IgAλ, IgAk, IgMλ, o de IgMk en un paciente con MQ IgGλ). La inmunoparesia clásica (CIP) fue definida como la presencia de una o ambas Ig policlonales totales por debajo del intervalo de referencia (por ejemplo, supresión de IgA y/o IgM en un paciente con MQ IgG). Se definió inmunoparesia *grave* como la reducción de los valores de Ig por debajo del 50% del límite inferior del rango de normalidad.

Para evaluar la inmunoparesia de manera cuantitativa, expresamos el valor de cada par HLC policlonal como el % de su respectivo límite inferior de normalidad, utilizando la siguiente fórmula:

(Valor del par HLC policlonal (por ejemplo, IgGλ en un paciente con MQ IgGk)) / límite inferior del rango de normalidad del par HLC policlonal correspondiente (por ejemplo, 1,91 para IgGλ) x 100

De manera adicional, se utilizó la plataforma nCounter (Nanostring Technologies) para evaluar el perfil de transcripción immune (ARN mensajero) de la fracción de médula ósea CD138 negativa (no tumoral, utilizando previamente separación inmunomagnética de las células tumorales CD138 positivas) de 6 pacientes con IMI

grave y 6 pacientes con IMI grave y HLC IP grave. Se utilizó para este fin el *PanCancer Immune Profiling Panel*, que evalúa la expresión de 730 genes asociados con el sistema inmune en neoplasias.

Resultados

Nueve pacientes (17%) fueron clasificados como de alto riesgo de acuerdo al modelo de la *Mayo Clinic*, y 23 (43%) de acuerdo al modelo español PETHMA. Utilizando el modelo de estratificación revisado del *International Myeloma Working Group* (IMWG), 17 pacientes (32%) fueron clasificados como de bajo riesgo, 17 (32%) como de riesgo intermedio y 19 (36%) como de alto riesgo. Los modelos de la *Mayo Clinic* y el español coincidieron en la clasificación de 17 de los 48 pacientes evaluables (35% de concordancia), mientras que la concordancia entre el modelo español y el del IMWG fue del 48%. La determinación de Ig identificó la presencia de CIP de al menos un isotipo en 29/53 pacientes con MQ (54%), que fue grave en 19/53 (36%).

La determinación de HLC identificó la presencia de IMI en 42/53 (79%) pacientes con MQ, y fue grave en 27 (51%). La IP de isotipos no involucrados (HLC IP) estuvo presente en 37/51 pacientes con MQ (72%), y resultó grave en 20 (39%). Por su parte, la IgM HLC IP fue identificada en 18 pacientes (36%), siendo grave en 11 de ellos (22%). Todos los pacientes con inmunoparesia identificada por la determinación de Ig totales (CIP), a excepción de uno, también demostraron IP de acuerdo a la determinación de HLC, pero no en el sentido inverso, con una discordancia significativa en la gravedad de la inmunoparesia.

Once pacientes presentaron IMI grave sin HLC IP grave, mientras que solo dos pacientes con HLC IP grave no mostraron IMI grave. En el caso de los 11 pacientes con HLC IP grave de IgM, todos ellos presentaron además IMI y HLC IP grave del otro isotipo de cadena pesada no involucrado. En el caso de los MQ IgG, los niveles de los pares no clonales de HLC fueron más bajos para los pares del mismo isotipo (mediana de 54% para IgG no clonal frente a 88% para IgA frente a 177% para IgM), con resultados

similares en el caso de los MQ IgA (mediana de 81% para IgG frente a 24% para IgA no clonal frente a 100% para IgM).

En el análisis de la frecuencia de los diferentes tipos de inmunoparesia de acuerdo al grupo de riesgo del IMWG, la mayor parte de los pacientes con MQ de bajo riesgo (65%) no presentaban inmunoparesia grave, mientras que la mayoría de los pacientes de alto riesgo presentaron HLC IP grave (59%). Los pacientes con IMI grave presentaron niveles significativamente más altos de CMs, así como un menor porcentaje de CP de fenotipo normal, con una tendencia a tener elevación del cociente de FLC (FLCr) y de la infiltración medular por CP (%BMPC). Por su parte, los pacientes con IMI grave y HLC IP de isotipos no involucrados grave demostraron un porcentaje de CP de fenotipo normal significativamente más bajo, así como cocientes de FLC y %BMPC significativamente más altos que los pacientes que presentaban únicamente IMI grave. De los 8 pacientes con un comportamiento *evolving* del CMs, 7 tenían IMI grave al diagnóstico; el caso restante la desarrolló durante el seguimiento.

Con una mediana de seguimiento de 2,5 años, 12 pacientes con MQ progresaron a enfermedad sintomática. Nueve de ellos presentaron IMI grave al diagnóstico y la mantuvieron durante el seguimiento. De los tres restantes, uno desarrolló IMI grave durante el seguimiento y otro demostró una disminución constante de la Ig del mismo isotipo hasta valores límites. La IMI grave y la supresión grave de cualquiera de los dos pares de HLC IgM se asociaron significativamente con un menor tiempo a la progresión a enfermedad sintomática.

No se constataron diferencias entre los pacientes con IMI grave y los pacientes que presentaban IMI grave junto a HLC IP grave, en la expresión de genes correspondientes a linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T Th2, linfocitos Tregs, mastocitos, macrófagos, células dendríticas o neutrófilos. Los pacientes con ambos tipos de inmunoparesia mostraron una expresión más elevada de genes asociados con linfocitos T CD8+ y Th1, así como genes asociados con funciones citolíticas (*GZMA*, *GZMH*, *GZMM*, *PRF1*, *GNLY*) y genes involucrados con la regulación y la disfunción/agotamiento de los linfocitos T (*LAG-3*, *CD96*, *TGIT*).

Discusión

Este estudio es el primero en analizar la profundidad de la inmunoparesia para diferentes isotipos de Ig, utilizando la determinación de HLC de manera prospectiva, en pacientes con MQ. Mientras los hallazgos confirman la alta prevalencia de IMI en los pacientes con MQ, una observación novedosa es la menor prevalencia de IP grave de los isotipos no involucrados (casi siempre acompañada de IMI) y los niveles proporcionalmente más bajos de Ig con el mismo isotipo del CMs en comparación con los de diferentes isotipos. Los hallazgos de nuestro estudio parecen indicar una especificidad de isotipo en los mecanismos iniciales de supresión de Ig policlonales. Otro hallazgo relevante fue que todos los pacientes con IP grave de IgM tenían también IMI grave y supresión grave del resto de isotipo de Ig.

La comparación del microambiente tumoral entre los pacientes con IMI y los pacientes con IMI e IP de un isotipo no involucrado demostró diferencias significativas, con una expresión más alta de genes relacionados con una respuesta inmune citotóxica en el segundo grupo.

Como ya se ha descrito en pacientes con GMSI y MM, en nuestra serie la IMI grave se asoció significativamente con características biológicas adversas y con un tiempo de progresión a enfermedad sintomática más corto, subrayando la importancia de la IMI en el pronóstico a lo largo de los distintos estadios de la enfermedad. Los pacientes con IP grave de isotipos no involucrados presentaron factores pronósticos aún más adversos que los pacientes que presentaban únicamente IMI. La supresión grave de los pares HLC de IgM se asoció significativamente con tiempo a la progresión más corto, como ya se ha descrito en GMSI.

La observación de que dos de los tres pacientes sin IMI grave que progresaron a enfermedad sintomática demostraron una disminución del par HLC del mismo isotipo al acercarse el momento de la progresión, apunta a un posible papel de los cambios evolutivos en los niveles de los pares HLC como marcador pronóstico.

En conclusión, la mayor prevalencia de IMI con respecto a la supresión de los isotipos de Ig no involucrados, así como los niveles proporcionalmente más bajos de las Ig del isotipo involucrado, apoyan la especificidad de isotipo de los mecanismos tempranos responsables de la IP en los pacientes con MQ IgG e IgA. Tanto la IMI como la IP de isotipos no involucrados se asociaron con otros factores de riesgo de progresión, pero la segunda (sobre todo en el caso de IgM) parece desarrollarse en estadios más avanzados de la enfermedad y podría corresponder a mecanismos diferentes. Estos hallazgos, mediante el uso de la determinación de HLC en suero, podrían resultar de interés tanto al momento de la evaluación inicial como durante el seguimiento de los pacientes con MQ.



Immunoparesis defined by heavy/light chain pair suppression in smoldering multiple myeloma shows initial isotype specificity and involves other isotypes in advanced disease

Ignacio Isola¹ · David F. Moreno¹ · Esther Moga² · Mari-Pau Mena¹ · Natalia Tovar¹ · Luis Gerardo Rodríguez-Lobato¹ · Aina Oliver-Caldés¹ · M. Carmen Salgado³ · Fara Brasó-Maristany⁴ · Jordi Yagüe⁵ · M. Teresa Cibeira¹ · Aleix Prat⁴ · Laura Rosiñol¹ · Joan Bladé¹ · Carlos Fernández de Larrea¹

Received: 12 April 2021 / Accepted: 23 August 2021 / Published online: 31 August 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Smoldering multiple myeloma (SMM) is an asymptomatic and biologically heterogeneous plasma cell disorder, with a highly variable clinical course. Immunoparesis, defined by total immunoglobulin measurements, has been shown to be an independent risk factor for progression to symptomatic disease. The heavy/light chain (HLC) assay allows precise measurement of the polyclonal immunoglobulin of the same isotype, enabling the evaluation of isotype-matched immunoparesis (IMI). In this study, we prospectively characterized immunoparesis, as determined by HLC measurements, in 53 SMM patients. Severe IMI was present in 51% of patients, while severe IP of uninvolved isotypes (HLC IP) was present in 39%. Most of the patients with severe HLC IP presented with severe IMI, but not the other way around. Isotype specificity of immune suppression was suggested by lower relative values of isotype-matched HLC pairs, both for IgG and IgA SMM. Severe IMI was associated with other risk factors for progression while patients with severe IMI and severe HLC IP showed an even higher risk profile. Both severe IMI and severe IgM HLC IP showed a significantly shorter time to progression. Finally, gene expression analysis demonstrated differences in the bone marrow microenvironment between patients with IMI and IMI plus HLC IP, with an increased expression of genes associated with cytolytic cells. In conclusion, our data supports isotype specificity of early immunoglobulin suppression mechanisms. While suppression of both involved and uninvolved isotypes is associated with risk of progression, the later appears to develop with more advanced disease and could be mediated by different mechanisms.

Keywords Smoldering myeloma · Multiple myeloma · Monoclonal gammopathy of undetermined significance · Immunoparesis · Heavy/light chain pair

✉ Carlos Fernández de Larrea
cfernan1@clinic.cat

¹ Amyloidosis and Myeloma Unit, Department of Hematology, Hospital Clínic of Barcelona, August Pi I Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

² Department of Immunology, Hospital de La Santa Creu I Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Amyloidosis and Myeloma Unit, Department of Biochemistry, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Department of Medical Oncology, Hospital Clínic of Barcelona, August Pi I Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Translational Genomics and Targeted Therapies in Solid Tumors, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵ Amyloidosis and Myeloma Unit, Department of Immunology, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain

Introduction

Asymptomatic monoclonal gammopathies, such as monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM), are clinical conditions that usually precede symptomatic multiple myeloma (MM). Risk stratification is crucial, particularly in the case of SMM, an entity that includes patients with a true asymptomatic malignancy destined to progress in a short period of time for whom chemoprevention trials are encouraged [1].

The Mayo Clinic and the Spanish Group have developed different risk stratification models that can identify patients with SMM and a 2-year risk of progression to MM $\geq 50\%$ [2, 3]. The Mayo Clinic model includes the serum M-protein (≥ 3 g/dL), bone marrow plasma cell infiltration (%BMPC, $\geq 10\%$), and the ratio of involved to uninvolved serum free light chains (FLCr, ≥ 8), while the Spanish model uses the proportion of BMPC with aberrant phenotype by flow cytometry ($\geq 95\%$) and the reduction in uninvolved immunoglobulins (immunoparesis) to identify high-risk patients. The International Myeloma Working Group (IMWG) has recently reported the “2/20/20” risk stratification model (based on a M-protein > 2 g/dL, the presence of BMPC $> 20\%$, and a FLCr > 20), in which patients with 2 or 3 risk factors have a 50% risk of progression at 2 years from diagnosis [4]. Additional risk factors for progression have been described by other groups, including positive uptake on positron emission tomography-computed tomography (PET-CT) [5], type of M-protein [6], cytogenetic abnormalities [7], evolving changes in M-protein and hemoglobin [8, 9], genetic signatures [10] and Bence-Jones proteinuria [11], among others.

The recently developed heavy/light chain pair (HLC) assay allows the measurement of both pairs of a specific isotype of immunoglobulin, e.g., quantification of IgG λ and IgG κ in a patient with IgG λ monoclonal gammopathy. The introduction of the HLC assay made possible the evaluation of the suppressive effect of the malignant clone on the isotype-matched polyclonal pair, enabling the study of a new type of immune suppression: isotype-matched immunoparesis (IMI). This phenomenon has been reported as being an independent risk factor in predicting malignant MGUS transformation [12] and poor survival in patients with newly diagnosed and relapsed/refractory MM [13, 14].

Immunoparesis defined by total immunoglobulin (Ig) measurements (reduction below the lower normal limit of an Ig of a different isotype) has been shown to be an independent risk factor for progression to symptomatic disease of SMM patients [3]. However, data regarding HLC defined immunoparesis in SMM is scarce. In a prospective

series of 50 patients with SMM, IMI proved to be more prevalent than suppression of Ig of different isotypes and was related to adverse biological features [15]. Using the HLC assay, suppression of HLC pairs of a different isotype (IgA λ and IgA κ , or IgM λ and IgM κ) was significantly associated with a shorter time to progression of IgG MGUS/SMM patients in a small series from a single institution [16].

The aim of this study was to prospectively characterize the prevalence and severity of immunoparesis as determined by HLC measurements, its association with other risk factors for progression and its prognostic significance, in patients with SMM diagnosed at a single institution.

Methods

The study group consisted of 53 patients with newly diagnosed SMM at our institution from January 2014 to March 2019. Serum samples collected at the time of diagnosis and at follow-up visits (when available) were obtained prospectively and frozen for later analysis. Clinical and laboratory data at diagnosis and during follow-up, related to the monoclonal gammopathy, were recorded.

Diagnostic samples were tested for serum free light chain (FLC) concentrations (κ FLC and λ FLC) using Freelite™ assays (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK) and HLC concentrations (IgG κ , IgG λ , IgA κ , IgA λ , IgM κ , and IgM λ) using Hevylite™ assays (The Binding Site Group Ltd.) on a BN™II System nephelometer (Siemens, Munich, Germany). Total immunoglobulins (IgG, IgA, and IgM) were measured on a Dimension Vista nephelometer (Siemens, Munich, Germany). Follow-up samples were tested for FLC and HLC pair concentrations, but only of the pair corresponding to the involved isotype (e.g., IgG κ /IgG λ pair in patients with IgG κ SMM). Serum protein electrophoresis (SPE) and immunofixation electrophoresis (IFE) were carried out using standard laboratory procedures.

Isotype-matched immunoparesis (IMI) was defined by the HLC assay as a concentration below the lower limit of the reference range of the polyclonal pair with the same isotype as the M-protein (e.g., IgG κ suppression in a patient with IgG λ SMM). Additionally, HLC immunoparesis (HLC IP) was defined as the suppression of any Ig with a different heavy chain (e.g., IgA λ , IgA κ , IgM λ , or IgM κ suppression in a patient with IgG λ SMM). Classical immunoparesis (CIP) was defined as either one or both of the two polyclonal total immunoglobulins being below the lower limit of the reference range (e.g., suppression of IgA and/or IgM in a patient with IgG SMM). Severe immunoparesis was defined by reduction of values by 50% or more below the lower limit of normal.

We assessed “quantitative immunoparesis” by expressing the value of each polyclonal HLC pair as the % of its respective lower limit of normal, using the following formula:

(Level of the polyclonal HLC pair (e.g., IgG λ in a patient with IgG κ SMM)/lower limit of the HLC pair reference range (e.g., 1.91 for IgG λ)) \times 100.

Total immunoglobulins and FLC reference ranges used were those established by the Immunology Laboratory of our institution, while HLC reference ranges were provided by the manufacturer (Supplementary Table S1).

Sample collection and clinical record review were performed after informed written consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Study protocol was approved by the Institutional Review Board at our institution. Patients were diagnosed according to standard International Myeloma Working Group (IMWG) criteria [17].

Differences in time to progression (TTP) between patient groups were analyzed using Kaplan–Meier survival curves with the log-rank test used to indicate significance. Statistical differences for numerical values were calculated using Mann–Whitney *U* test, ANOVA test or unpaired two-tailed *t*-tests. Survival graphs were generated using GraphPad Prism 9 software (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

We used the nCounter platform (Nanostring Technologies) to assess immune transcriptomic profiles in the CD138 – bone marrow cell fraction of 6 patients with severe IMI and 6 patients with severe IMI + severe HLC IP. CD138-depleted BM cell fraction was isolated with anti-CD138 mAb-coated immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) using an AutoMacs cell sorter (Miltenyi Biotec). Total RNA from the CD138 – BM cell fraction was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, Oslo, Norway). A minimum of 100 ng of total RNA was analyzed at the nCounter platform (Nanostring Technologies) using the PanCancer Immune Profiling Panel, which assesses the expression of 730 immune-associated genes and 40 housekeeping genes. Expression counts were then normalized using the nSolver 4.0 software and custom scripts in R 3.6.3. Unpaired significance analysis of microarrays (SAM), using false discovery rate (FDR), were used to identify differential gene expression across sample groups.

Results

Patient characteristics and classical immunoparesis

Baseline characteristics for the 53 patients with SMM are presented in Table 1. Nine SMM patients (17%) were classified as high risk by the Mayo Clinic model [2] and 23 (43%) were classified as high risk by the Spanish model [3]. According to the IMWG revised risk stratification

Table 1 Baseline patient characteristics

	SMM
Number of patients	53
Age (years)*	72 (60–79)
Gender, male/female	24/29
Isotype	
IgG	31 (58)
IgA	20 (38)
Biclonal	2 (4)
Serum M-protein g/L*	19.8 (13.2–26.7)
Serum FLCr*	8.3 (3.2–34.3)
BMPC (%)*	17 (12–22.5)
Normal BMPC (%)* [†]	3 (0.4–10)

*Measurements are median (interquartile range)

[†]Percentage of bone marrow plasma cells with normal phenotype by flow cytometry

model [4], 17 patients (32%) were classified as low risk, 17 patients (32%) as intermediate risk, and 19 patients (36%) as high risk. Concordance between the three risk models is represented in Supplementary Figure S1. The Mayo Clinic and the Spanish PETHEMA model concurred in the classification of 17 out of the 48 evaluable patients (35% rate of agreement), while the IMWG model and the Spanish model concurred in the classification of 23 out of 48 patients (48% rate of agreement). Total serum Ig measurements identified classical immunoparesis (CIP) of at least one isotype in 29/53 SMM patients (54%), which was severe in 19/53 (36%).

Immunoparesis determined by HLC pair measurements

HLC measurements identified isotype-matched immunoparesis (IMI) in 42/53 (79%) SMM patients and was severe in 27 (51%). HLC immunoparesis of uninvolved isotypes (HLC IP) was present in 37/51 (72%) of patients with SMM and was severe in 20 (39%). IgM HLC IP was present in 18 patients with SMM (36%) and was severe in 11 of them (22%) (Table 2, Supplementary Figure S2). All but one of the patients identified as having immunoparesis by total Ig measurements (CIP) were also identified by HLC suppression (HLC IP), but not the other way around, with discordance in the severity of the immunoparesis (Supplementary Figure S2).

Eleven SMM patients presented severe IMI without severe HLC IP. On the other hand, only two patients with severe HLC IP presented without severe IMI. In the case of the 11 patients that showed severe immunoparesis of any IgM HLC pair, they all had concomitant severe IMI and IP

Table 2 Frequency of immunoparesis

Type	SMM	
	Total	Severe
IMI	42/53 (79%)	27/53 (51%)
HLC IP	37/51 (72%)	20/51 (39%)
HLC IP IgM	18/50 (36%)	11/50 (22%)
CIP	29/53 (54%)	19/53 (36%)

Isotype-matched immunoparesis (IMI), concentration below the lower limit of the reference range of the polyclonal HLC pair with the same heavy chain as the M-protein (e.g., IgG κ suppression in a patient with IgG λ SMM); *HLC uninvolved isotype (HLC IP)*, concentration below the lower limit of the reference range of any HLC pair with a different heavy chain (e.g., IgA κ in a patient with IgG λ SMM); *HLC IgM immunoparesis (HLC IP IgM)*, concentration below the lower limit of the reference range of any HLC pair with an IgM heavy chain; *Classical immunoparesis (CIP)*, either one or both of the two polyclonal total immunoglobulins being below the lower limit of the reference range (e.g., IgA and/or IgM in a patient with IgG SMM). Severe immunoparesis was defined by values suppressed by 50% or greater below the lower limit of normal

of the other uninvolved heavy chain isotype (Supplementary Figure S2).

Isotype specificity of immune suppression was evident when we analyzed “quantitative immunoparesis” (Fig. 1). In the case of IgG SMM, levels of the non-clonal HLC pairs (expressed as a % of its respective lower limit of normal, see “Methods” section) were lower for the isotype-matched pairs (median 54% for non-clonal IgG vs. 88% for IgA vs. 177% for IgM). IgA SMM patients showed similar results (median 81% for IgG vs. 24% for non-clonal IgA vs. 100% for IgM).

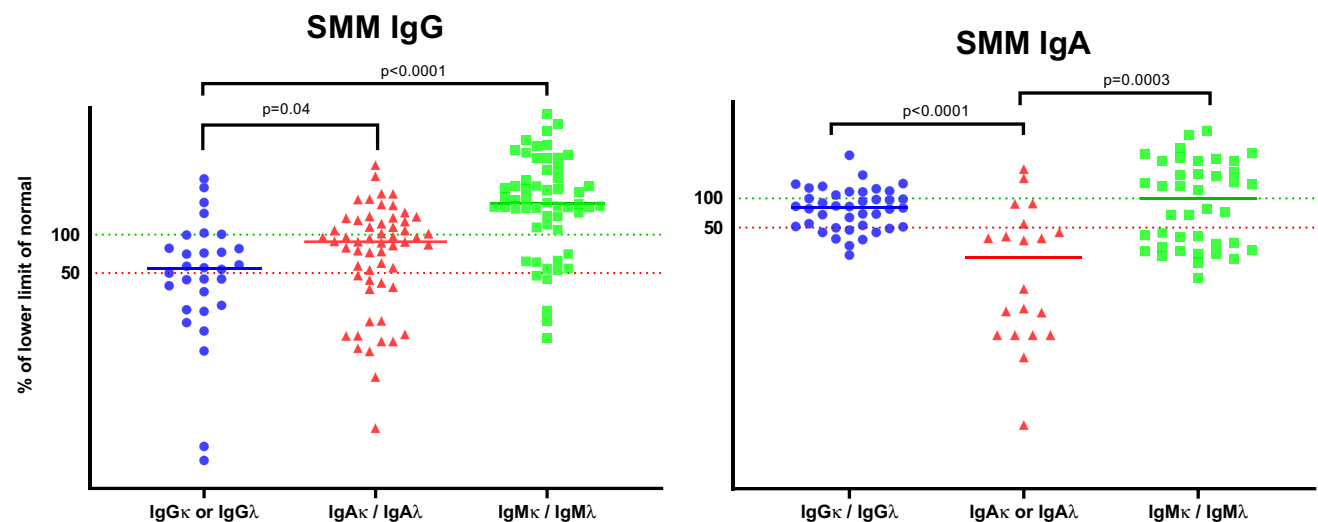


Fig. 1 Quantitative immunoparesis: levels of the HLC pairs corresponding to non-clonal isotypes expressed as % of the lower limit of normal (level of polyclonal HLC pair/lower limit of normal of the HLC pair \times 100) in patients with IgG SMM (median 54% vs. 88% vs.

Immunoparesis and risk factors for progression to symptomatic disease

Analyzing the frequency of the different types of immunoparesis according to the IMWG risk group, most of the patients with low-risk SMM ($n = 11$, 65%) had no severe immunoparesis, while most high-risk patients had severe HLC IP ($n = 10$, 59%) (Fig. 2A). The association of baseline prognostic variables with severe IMI and severe IMI + severe HLC IP is presented in Fig. 2B. Patients with severe IMI showed significantly higher serum M-protein levels and lower % of normal phenotype BMPC, with a trend towards higher FLC ratios and BMPC infiltration. Patients with severe IMI and severe HLC IP of uninvolved isotypes showed significantly lower % of normal phenotype BMPC, higher FLC ratios and %BMPC than patients with only severe IMI. Of the eight patients demonstrating an evolving behavior of the M-protein [8], seven had severe IMI at diagnosis and one developed it during follow-up.

With a median follow-up of 2.5 years, twelve patients with SMM progressed to symptomatic disease; 9 of them showed severe IMI at diagnosis and maintained it. Of the other three, one developed severe IMI during follow-up, one showed a consistent decrease of the isotype-matched Ig with borderline severe suppression, and one could not be evaluated at follow-up (Supplementary Figure S3). Severe IMI and severe suppression of any IgM HLC pair were significantly associated with a shorter time to progression (TTP) to symptomatic disease (Fig. 3) while severe HLC

177%) and IgA SMM (median 81% vs. 24% vs. 100%). Horizontal lines represent median values. p values were calculated using the Mann–Whitney test

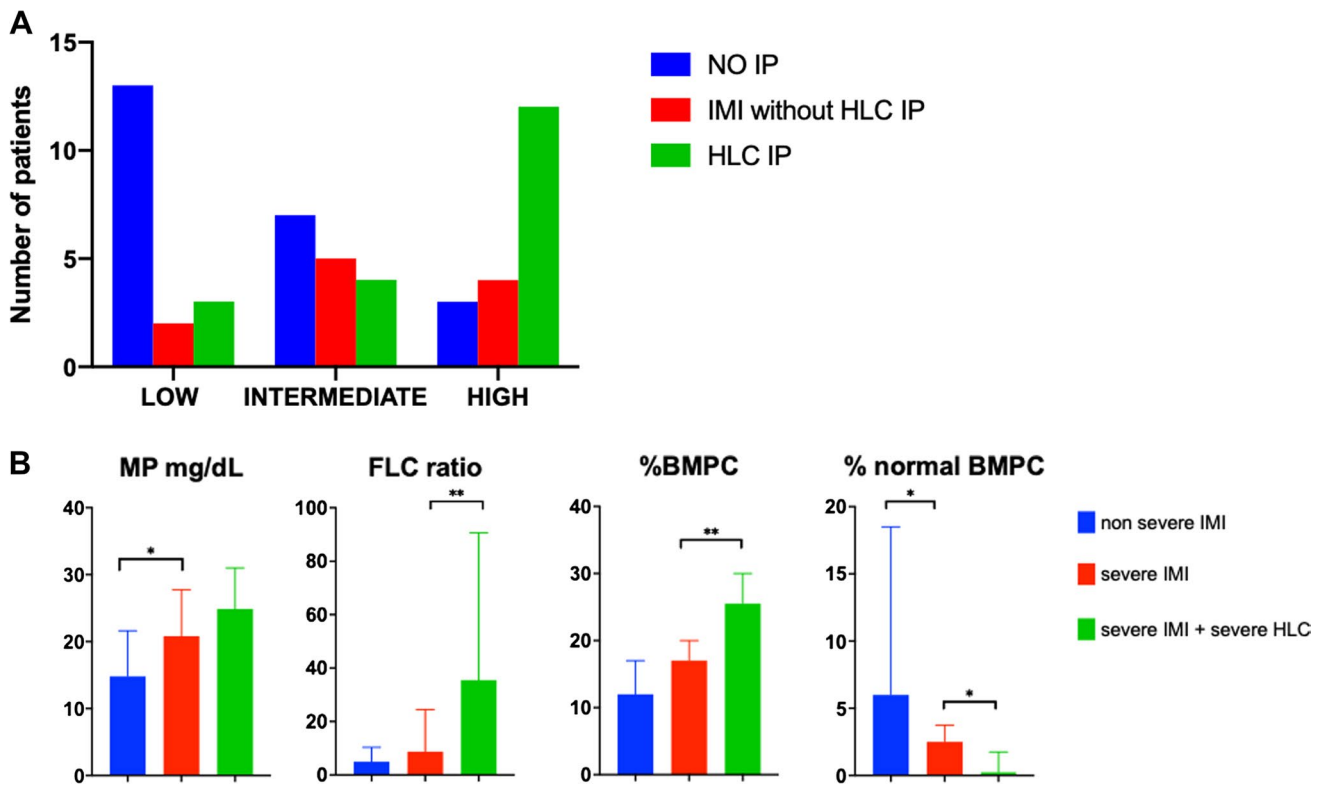


Fig. 2 **A** Immunoparesis according to SMM risk category. Risk stratification was based on the IMWG model. NO IP, absence of severe immunoparesis (IP); IMI without HLC IP, severe isotype-matched IP without severe IP of a different isotype; HLC IP, severe IP of a different isotype. **B** Comparison of serum M-protein (median mg/dL: 14.8 vs. 20.8 vs. 24.88), FLC ratio (median: 4.97 vs. 8.67 vs. 35.6), % BMPC (median: 12 vs. 17 vs.26), and % of normal phenotype BMPC

(median: 6 vs. 2.5 vs. 0.25) between patients without severe isotype-matched immunoparesis (IMI), patients with severe IMI without severe immunoparesis of uninvolved isotypes (HLC IP), and patients with severe IMI + severe HLC IP. Bar graphs show median ± interquartile range. *p* values were calculated using the Mann–Whitney test (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01)

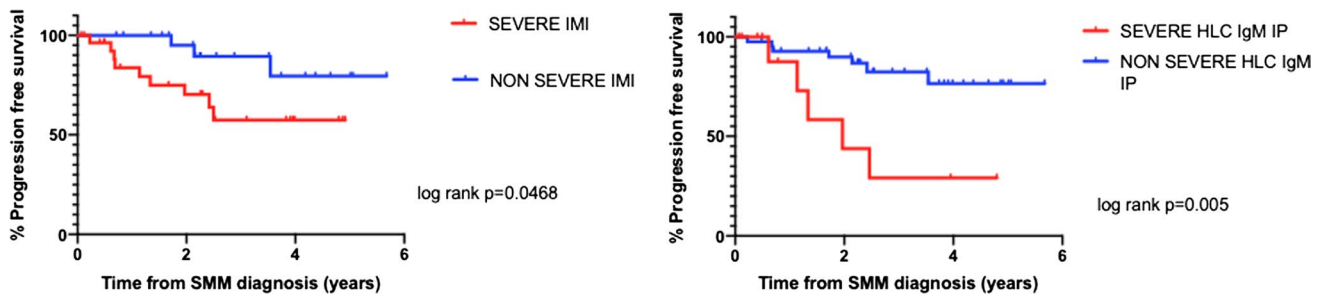


Fig. 3 Progression-free survival according to the absence or presence of severe isotype-matched immunoparesis (IMI), HR (95% CI): 3.16 (1.02–9.85). Progression-free survival according to the absence or

presence of severe immunoparesis of any IgM HLC pair (HLC IgM IP), HR (95% CI): 4.52 (0.87–23.4)

IP of uninvolved isotypes was associated with a non-significant trend towards a shorter TTP [median TTP not reached vs. 2.46 years, log rank *p* = 0.06, HR (95% CI): 2.78 (0.77–10.04)]. Patients with severe IMI alone did not have a significantly longer TTP than patients with severe IMI + severe HLC IP of uninvolved isotypes

[median TTP not reached vs. 2.46 years, log rank *p* = 0.42, HR (95% CI): 1.74 (0.47–6.45)] or severe IMI + severe IgM HLC suppression [median TTP not reached vs. 1.97 years, log rank *p* = 0.109, HR (95% CI): 2.79 (0.68–11.46)].

Gene expression profile of the tumor microenvironment in SMM patients with immunoparesis

In a final set of experiments, we evaluated the expression of immune-related genes in the CD138 – fraction from diagnostic bone marrow samples from 6 patients with severe isotype-matched immunoparesis (IMI) and 6 patients with severe IMI and severe immunoparesis of uninvolved isotypes (HLC IP). We studied gene expression signatures associated with specific immune cell types (Supplementary Table S2) [18]. While there were no significant differences in the expression of genes corresponding to NK cells, T CD4+ cells, Th2 cells, Tregs, mast cells, macrophages, dendritic cells, or neutrophils, patients with IMI+HLC IP showed higher expression of genes associated with T CD8+ cells and Th1 cells than patients with only severe IMI. The “cytolytic score,” based on the expression of highly specific genes associated with cytolytic effector functions (*GZMA*, *GZMH*, *GZMM*, *PRF1*, and *GZLY*) [19] was also significantly higher in the IMI+HLC IP group of patients (Fig. 4). Among the upregulated genes in the IMI+HLC IP group, we also found immune checkpoints involved in T-cell regulation and linked to T-cell dysfunction/exhaustion (LAG-3, CD96, TIGIT) [20–22]. TIGIT expression, in particular, has been associated with upregulation of genes involved in T-cell function and cytotoxicity in the BM of patients with MM, suggesting that it may play a role restraining immune activation involving Tregs and T cell exhaustion [21]. Upregulated genes in patients with IMI+HLC IP as

compared to those with only IMI are detailed in Supplementary Figure S4.

Discussion

Our study is the first, to our knowledge, to analyze the depth of immunoparesis for different antibody isotypes using the HLC assay prospectively in patients with SMM. While our findings confirm the previously reported high prevalence of isotype-matched immunoparesis in patients with SMM [15, 16], a striking observation in this series was both the lower prevalence of severe immunoparesis of the uninvolved isotypes (almost always accompanied by severe IMI) and the lower proportional levels of Ig of the involved isotype and different light chain compared to Igs of a different isotype. The higher prevalence of IMI over classical IP has been previously described in MGUS [23, 24] and was thought to be possibly related to the higher sensitivity of the Hevylite assay. The finding in our study, however, seems to indicate isotype specificity in the early mechanisms involved in suppression of polyclonal immunoglobulin production.

The mechanisms of suppression of normal Ig in plasma cell dyscrasias remain poorly understood. The decrease in polyclonal Igs found in patients with MM and less frequently observed in MGUS/SMM has been related to the reduction in normal bone marrow plasma cells. However, it has been shown in MM that both parameters appear to be independently associated with patient outcome [25]. The depletion of normal plasma cells is suggested to result from

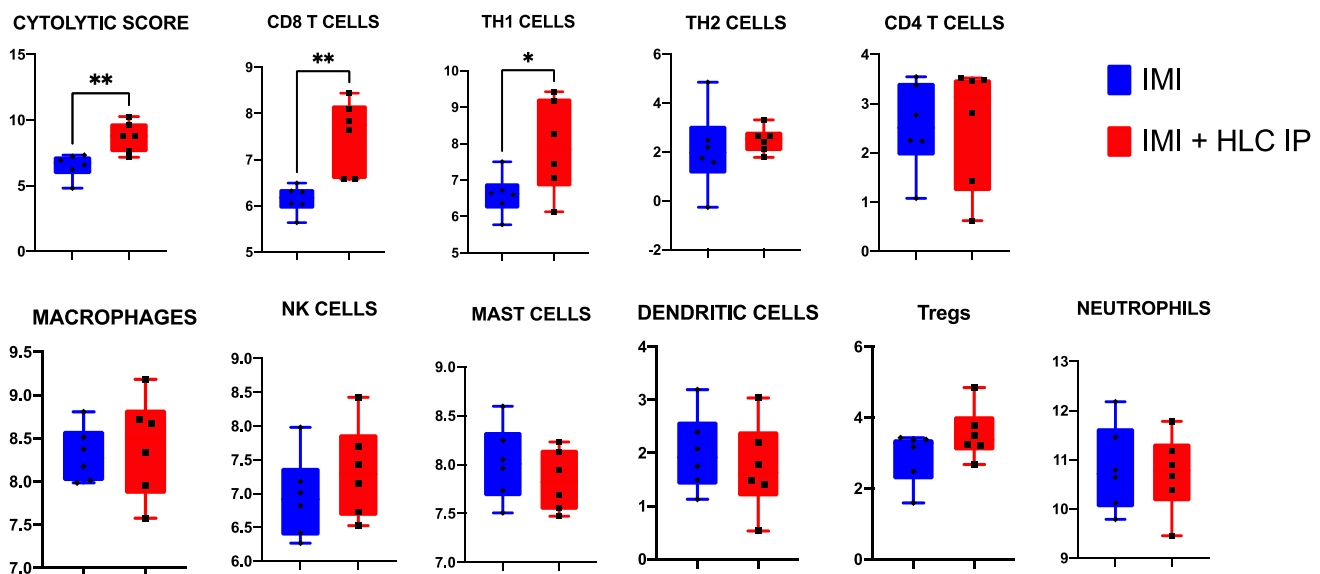


Fig. 4 Scores corresponding to gene expression signatures associated with specific immune cell types in the CD138 – cell fraction of diagnostic bone marrow samples. IMI, severe isotype-matched immuno-

paresis; IMI+HLC IP, severe isotype-matched+severe immunoparesis of a different isotype. *p* values were determined using unpaired two-tailed *t*-tests (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01)

progressive competition and replacement by clonal plasma cells in BM niches [26]. Nonetheless, this mechanism fails to explain the apparent isotype specificity of Ig suppression noted in our series.

Wang and Young [27] were the first to report the isotype specificity of Ig suppression in IgG MGUS when they found a greater reduction of polyclonal IgG than in IgA or IgM patients. The lack of correlation between the M-protein and the polyclonal immunoglobulin led them to preclude a negative feedback mechanism solely dependent on the increase in the catabolic rate of IgG immunoglobulins. T cells bearing surface receptors of the respective monoclonal isotype have been observed in mouse models with plasmacytomas [28, 29] and Tregs have been attributed to suppress immunoglobulin production and secretion in a manner that could be isotype specific [30, 31]. The fact that severe immunoparesis is also described in patients with light chain only MM suggests the existence of suppressive mechanisms independent of the heavy chain isotype of the M-protein [32].

A striking finding of this study was that all patients with severe IgM immunoparesis had concomitant severe IMI and suppression of the other uninvolved isotype. In the case of IgM immunoparesis, the mechanisms involved would have to affect IgM plasma cells distant from the bone marrow (lymph nodes and spleen). The B-cell maturation antigen (BCMA) has been shown to sequester B-cell ligands, such as B-cell activating factor (BAFF), preventing plasma cell development and antibody production in mice [33]. An inverse relationship between serum BCMA levels and levels of uninvolved Ig has been reported in patients with MM [34].

The comparison of the tumor microenvironment between patients with isotype-matched immunoparesis and patients with IMI plus immunoparesis of a different isotype showed significant differences, with a higher expression of genes related to a cytotoxic immune response in the second group. Although these results could point to the existence of alternative suppressive mechanisms, they are based on a small number of samples and require further examination.

As previously described in MGUS [12] and in MM [13, 14], in our series severe IMI was significantly associated with adverse biological features and with a shorter time to progression to symptomatic disease, highlighting the prognostic importance of IMI throughout the disease course. Interestingly, patients with severe HLC IP of uninvolved isotypes were characterized by even more adverse prognostic features than patients with severe IMI alone. Severe suppression of IgM HLC pairs was significantly associated with shorter TTP, as previously reported in MGUS/SMM [16], a finding that has also been linked to survival outcomes in newly diagnosed MM [32]. Progression to symptomatic disease was not significantly

different between patients with severe IMI alone and patients with severe IMI plus suppression of uninvolved isotypes (both isotypes or IgM), but this analysis was limited by the small number of patients and the fact that some of the patients with classical immunoparesis were enrolled in clinical trials and consequently censored for further analysis.

The observation that two of the three patients without severe IMI that progressed to symptomatic disease showed a decrease of the isotype-matched Ig closer to progression could point to the value of the evolving changes in HLC values as a prognostic marker, both for the involved and uninvolved isotypes. Larger prospective studies are needed to further clarify this matter.

In concordance with previous reports [35], our analysis revealed significant discrepancies between the clinical models currently used to assess risk of progression from SMM to symptomatic disease. This finding highlights the need for the study of new risk factors and biomarkers, such as isotype-matched immunoparesis, to more accurately characterize the risk of transformation to MM and to help us understand the different mechanisms involved in the pathogenesis of the disease.

In conclusion, the greater prevalence of IMI over suppression of uninvolved isotypes along with the lower proportional values for isotype-matched immunoglobulins supports an isotype specificity of early suppression mechanisms in the case of IgG and IgA SMM. Both IMI and IP of uninvolved isotypes are associated with other recognized risk factors for progression, but the later (especially in the case of IgM) appears to develop with more advanced disease and could correspond to different suppression mechanisms. These findings could be of interest both at the time of the initial evaluation and during follow-up of patients with SMM using the serum heavy/light chain pair assay.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04653-2>.

Acknowledgements We are very thankful to The Binding Site Group Ltd. (Birmingham, UK) for the technical and material support about HLC concentration using Hevylite™ assays.

Author contribution II designed and performed the research, collected and analyzed data, and wrote the manuscript. DM, MM, FB, and EM performed the research and analyzed data. NT, LGR, AO, MCS, JY, MTC, LR, and JB collected data. AP contributed essential tools for research and analysis. CFL designed the research and analyzed the data. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

Funding This work was supported in part by grants PI16/00423, PI19/00669, and PI20/00436 from Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)-Una manera de Hacer Europa) and 2017SGR00792 (AGAUR; Generalitat de Catalunya).

Availability of data and material The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval Study protocol was approved by the Institutional Review Board at Hospital Clínic of Barcelona.

Consent to participate Sample collection and clinical record review were performed after informed written consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Consent for publication Sample collection and clinical record review were performed after informed written consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Conflict of interest C.F.L. has received research grants and consultancy by The Binding Site. All other authors declare no conflict of interest.

References

- Kapoor P, Rajkumar SV (2019) Smoldering multiple myeloma: to treat or not to treat. *Cancer J* 25(1):65–71. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000350>
- 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 (2008) Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 111(2):785–789. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-108357>
- Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martín-Núñez G, Alonso JM, de Las HN, Hernández JM, Martín A, López-Berges C, Orfao A, San Miguel JF (2007) New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 110(7):2586–2592. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-088443>
- Mateos MV, Kumar S, Dimopoulos MA, González-Calle V, Kastritis E, Hajek R, De Larrea CF, Morgan GJ, Merlini G, Goldschmidt H, Gheraldes C, Gozzetti A, Kyriakou C, Garderet L, Hansson M, Zamagni E, Fantl D, Leleu X, Kim BS, Esteves G, Ludwig H, Usmani S, Min CK, Qi M, Ukropec J, Weiss BM, Rajkumar SV, Durie BGM, San-Miguel J (2020) International Myeloma Working Group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood Cancer J* 10(10):102. <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00366-3>
- Zamagni E, Nanni C, Gay F, Pezzi A, Patriarca F, Bellò M, Rambaldi I, Tacchetti P, Hillengass J, Gamberi B, Pantani L, Magarotto V, Versari A, Offidani M, Zannetti B, Carobolante F, Balma M, Musto P, Rensi M, Mancuso K, Dimitrakopoulou-Strauss A, Chauviè S, Rocchi S, Fard N, Marzocchi G, Storto G, Ghedini P, Palumbo A, Fanti S, Cavo M (2016) 18F-FDG PET/CT focal, but not osteolytic, lesions predict the progression of smoldering myeloma to active disease. *Leukemia* 30(2):417–422. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.291>
- Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Larson DR, Plevak MF, Jelinek DF, Fonseca R, Melton LJ 3rd, Rajkumar SV (2007) Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 356(25):2582–2590. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070389>
- Rajkumar SV, Gupta V, Fonseca R, Dispenzieri A, Gonsalves WI, Larson D, Ketterling RP, Lust JA, Kyle RA, Kumar SK (2013) Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 27(8):1738–1744. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.86>
- Fernández de Larrea C, Isola I, Pereira A, Cibeira MT, Magnano L, Tovar N, Rodríguez-Lobato LG, Calvo X, Aróstegui JI, Díaz T, Lozano E, Rozman M, Yagüe J, Bladé J, Rosiñol L (2018) Evolving M-protein pattern in patients with smoldering multiple myeloma: impact on early progression. *Leukemia* 32(6):1427–1434. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0013-4>
- Ravi P, Kumar S, Larsen JT, Gonsalves W, Buadi F, Lacy MQ, Go R, Dispenzieri A, Kapoor P, Lust JA, Dingli D, Lin Y, Russell SJ, Leung N, Gertz MA, Kyle RA, Bergsagel PL, Rajkumar SV (2016) Evolving changes in disease biomarkers and risk of early progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Cancer J* 6(7):e454. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.65>
- Dhodapkar MV, Sexton R, Waheed S, Usmani S, Papanikolaou X, Nair B, Petty N, Shaughnessy JD Jr, Hoering A, Crowley J, Orlowski RZ, Barlogie B (2014) Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood* 123(1):78–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515239>
- González-Calle V, Dávila J, Escalante F, de Coca AG, Aguilera C, López R, Báez A, Alonso JM, Hernández R, Hernández JM, de la Fuente P, Puig N, Ocio EM, Gutiérrez NC, García-Sanz R, Mateos MV (2016) Bence Jones proteinuria in smoldering multiple myeloma as a predictor marker of progression to symptomatic multiple myeloma. *Leukemia* 30(10):2026–2031. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.123>
- Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Benson JT, Colby CL, Dispenzieri A, Landgren O, Kumar S, Bradwell AR, Cerhan JR, Rajkumar SV (2013) Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 27(1):208–212. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.189>
- Ludwig H, Milosavljevic D, Berlanga O, Zojer N, Hübl W, Fritz V, Harding S (2016) Suppression of the noninvolved pair of the myeloma isotype correlates with poor survival in newly diagnosed and relapsed/refractory patients with myeloma. *Am J Hematol* 91(3):295–301. <https://doi.org/10.1002/ajh.24268>
- Chakraborty R, Rybicki L, Nakashima MO, Dean RM, Faiman BM, Samaras CJ, Rosko N, Dysert H, Valent J, Anwer F (2020) Characterisation and prognostic impact of immunoparesis in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* 189(6):1074–1082. <https://doi.org/10.1111/bjh.16488>
- Costello R, Espana K, Korde N, Kwok M, Zingone A, Yancey MA, Mulquin M, Maric I, Calvo K, Tembhare PR, Yuan C, Stetler-Stevenson M, Landgren O (2011) Hevylite™ assays detect a hidden immunoparesis associated with adverse biology in myeloma precursor disease: a prospective clinical study. *Blood* 118(21):5065
- Magnano L, Fernández de Larrea C, Elena M, Cibeira MT, Tovar N, Aróstegui JI, Pedrosa F, Rosiñol L, Filella X, Yagüe J, Bladé J (2016) Prognostic impact of serum heavy/light chain pairs in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma: long-term results from a single institution. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 16(6):e71-7. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.02.034>
- International Myeloma Working Group (2003) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 121(5):749-57.

18. Paré L, Pascual T, Seguí E, Teixidó C, Gonzalez-Cao M, Galván P, Rodríguez A, González B, Cuatrecasas M, Pineda E, Torné A, Crespo G, Martín-Algarra S, Pérez-Ruiz E, Reig Ó, Viladot M, Font C, Adamo B, Vidal M, Gaba L, Muñoz M, Victoria I, Ruiz G, Viñolas N, Mellado B, Maurel J, García-Corbacho J, Molina-Vila MÁ, Juan M, Llovet JM, Reguart N, Arance A, Prat A (2018) Association between PD1 mRNA and response to anti-PD1 monotherapy across multiple cancer types. *Ann Oncol* 29(10):2121–2128. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy335>
19. Dufva O, Pölönen P, Brück O, Keränen MAI, Klievink J, Mehtonen J, Huuhtanen J, Kumar A, Malani D, Siitonen S, Kankainen M, Ghimire B, Lahtela J, Mattila P, Vähä-Koskela M, Wennerberg K, Granberg K, Leivonen SK, Meriranta L, Heckman C, Leppä S, Nykter M, Lohi O, Heinäniemi M, Mustjoki S (2020) Immunogenomic landscape of hematological malignancies. *Cancer Cell* 38(3):380–399.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.002>
20. Chung DJ, Pronschinske KB, Shyer JA, Sharma S, Leung S, Curran SA, Lesokhin AM, Devlin SM, Giralt SA, Young JW (2016) T-cell exhaustion in multiple myeloma relapse after autotransplant: optimal timing of immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 4(1):61–71. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CCR-15-0055>
21. Lozano E, Mena MP, Díaz T, Martín-Antonio B, León S, Rodríguez-Lobato LG, Oliver-Caldés A, Cibeira MT, Bladé J, Prat A, Rosiñol L, Fernández de Larrea C (2020) Nectin-2 expression on malignant plasma cells is associated with better response to TIGIT blockade in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 26(17):4688–4698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3673>
22. Blake SJ, Dougall WC, Miles JJ, Teng MW, Smyth MJ (2016) Molecular pathways: targeting CD96 and TIGIT for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 22(21):5183–5188. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0933>
23. Jiménez Juana J, Pais Tiago M, Barbosa Nuno, Campos Maria Luisa, Díaz Maria Antonia Peñalver, de Larramendi Carmen H (2018) Severe isotype-matched immunosuppression (IMI) as a potential risk factor for progression of MGUS patients. *J Appl Lab Med* 2(5):700–710
24. Pika T, Lochman P, Sandecka V, Maisnar V, Minarik J, Tichy M, Zapletalova J, Solcova L, Scudla V, Hajek R (2015) Immunoparesis in MGUS - relationship of uninvolved immunoglobulin pair suppression and polyclonal immunoglobuline levels to MGUS risk categories. *Neoplasma* 62(5):827–832. https://doi.org/10.4149/neo_2015_100
25. Paiva B, Vidriales MB, 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, González Y, Bladé J, Lahuerta JJ, Orfao A, San-Miguel JF; GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups (2009) The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood*. 114(20):4369–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-221689>.
26. Paiva B, Pérez-Andrés M, Vidriales MB, Almeida J, de las Heras N, Mateos MV, López-Corral L, Gutiérrez NC, Blanco J, Oriol A, Hernández MT, de Arriba F, de Coca AG, Terol MJ, de la Rubia J, González Y, Martín A, Sureda A, Schmidt-Hieber M, Schmitz A, Johnsen HE, Lahuerta JJ, Bladé J, San-Miguel JF, Orfao A; GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas); Myeloma Stem Cell Network (MSCNET) (2011) Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia*. 25(4):697–706. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.320>.
27. Wang L, Young DC (2001) Suppression of polyclonal immunoglobulin production by M-proteins shows isotype specificity. *Ann Clin Lab Sci* 31(3):274–278
28. Hoover RG, Lynch RG (1980) Lymphocyte surface membrane immunoglobulin in myeloma. II. T cells with IgA-Fc receptors are markedly increased in mice with IgA plasmacytomas. *J Immunol* 125(3):1280–8.
29. Hoover RG, Dieckgraefe BK, Lake J, Kemp JD, Lynch RG (1982) Lymphocyte surface membrane immunoglobulin in myeloma. III. IgA plasmacytomas induce large numbers of circulating, adult-thymectomy-sensitive, theta +, Lyt-1–2+ lymphocytes with IgA-Fc receptors. *J Immunol* 129(6):2329–31.
30. Milburn GL, Lynch RG (1982). Immunoregulation of murine myeloma in vitro. II. Suppression of MOPC-315 immunoglobulin secretion and synthesis by idiotype-specific suppressor T cells. *J Exp Med* 155(3):852–62. <https://doi.org/10.1084/jem.155.3.852>
31. Waldschmidt TJ, Williams KR, Lynch RG (1987) Isotype-specific recognition and regulation by T cells studied with tumor models. *Int Rev Immunol* 2(2):203–220. <https://doi.org/10.3109/08830188709044754>
32. Heaney JJJ, Campbell JP, Iqbal G, Cairns D, Richter A, Child JA, Gregory W, Jackson G, Kaiser M, Owen R, Davies F, Morgan G, Dunn J, Drayson MT (2018) Characterisation of immunoparesis in newly diagnosed myeloma and its impact on progression-free and overall survival in both old and recent myeloma trials. *Leukemia* 32(8):1727–1738. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0163-4>
33. Sanchez E, Li M, Kitto A, Li J, Wang CS, Kirk DT, Yellin O, Nichols CM, Dreyer MP, Ahles CP, Robinson A, Madden E, Waterman GN, Swift RA, Bonavida B, Boccia R, Vescio RA, Crowley J, Chen H, Berenson JR (2012) Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. *Br J Haematol* 158(6):727–738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09241>
34. Sanchez E, Gillespie A, Tang G, Ferros M, Harutyunyan NM, Vardanyan S, Gottlieb J, Li M, Wang CS, Chen H, Berenson JR (2016) Soluble B-cell maturation antigen mediates tumor-induced immune deficiency in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 22(13):3383–3397. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2224>
35. Cherry BM, Korde N, Kwok M, Manasanch EE, Bhutani M, Mulquin M, Zuchlinski D, Yancey MA, Maric I, Calvo KR, Braylan R, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Tembhare P, Zingone A, Costello R, Roschewski MJ, Landgren O (2013) Modeling progression risk for smoldering multiple myeloma: results from a prospective clinical study. *Leuk Lymphoma* 54(10):2215–2218. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.764419>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

IMMUNOPARESIS DEFINED BY HEAVY/LIGHT CHAIN PAIR SUPPRESSION IN SMOLDERING MULTIPLE MYELOMA SHOWS INITIAL ISOTYPE SPECIFICITY AND INVOLVES OTHER ISOTYPES IN ADVANCED DISEASE

SUPPLEMENTARY TABLE S1

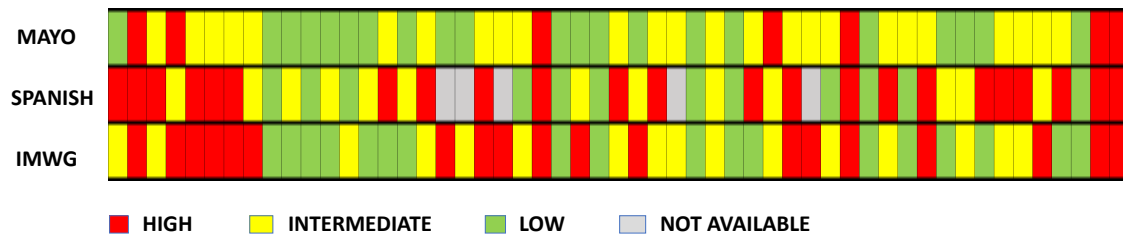
Reference ranges for total immunoglobulins, free light chains and heavy-light chain pairs in serum

TEST	REFERENCE RANGE
IgG	6.8 – 15.3 g/L
IgA	0.66 – 3.65 g/L
IgM	0.36 – 2.61 g/L
κ FLC	3.30 – 19.40 mg/L
λ FLC	5.71 – 26.30 mg/L
κ/λ ratio	0.26 – 1.65
IgG Kappa	3.84 – 12.07 g/L
IgG Lambda	1.91 – 6.74 g/L
IgGκ / IgGλ ratio	1.12 - 3.21
IgA Kappa	0.57 – 2.08 g/L
IgA Lambda	0.44 – 2.04 g/L
IgAκ/ IgAλ ratio	0.78 – 1.94
IgM Kappa	0.19 – 1.63 g/L
IgM Lambda	0.12 – 1.01 g/L
IgMκ / IgMλ ratio	1.18 – 2.74

Reference ranges for total immunoglobulins and FLC are from the Hospital Clínic laboratory. HLC pair reference ranges are from the manufacturer (The Binding Site Group Ltd, Birmingham UK).

SUPPLEMENTARY FIGURE S1

Classification of SMM patients according to the three risk models (Mayo Clinic, Spanish, revised IMWG)

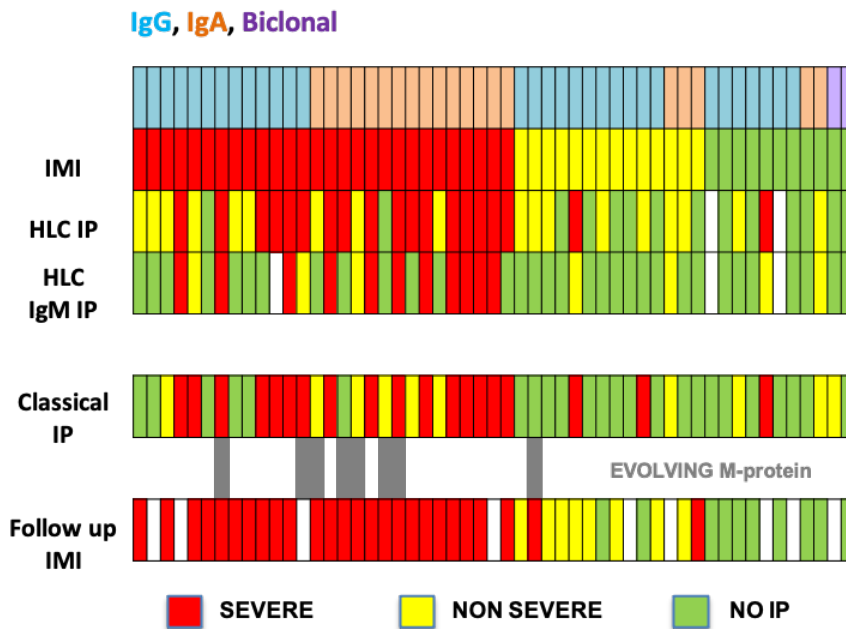


Mayo Clinic model (M-protein $\geq 3\text{g/dL}$, bone marrow plasma cells - BMPC $\geq 10\%$ and ratio of involved to uninvolved serum free light chains - FLCr ≥ 8): 0-1 risk factors = low risk, 2 risk factor = intermediate risk, 3 risk factors = high risk.

Spanish model (proportion of BMPC with aberrant phenotype on flow cytometry $\geq 95\%$ and immunoparesis): 0 risk factors = low risk, 1 risk factor = intermediate risk, 2 risk factors = high risk.

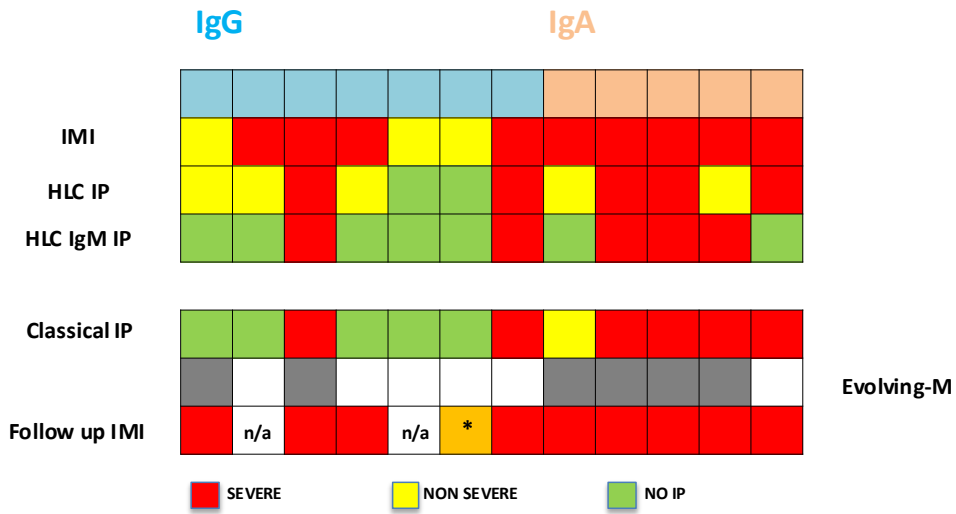
International Myeloma Working Group "2/20/20" (BMPC $> 20\%$, M-protein $> 2\text{g/dL}$ and FLCr > 20): 0 risk factors = low risk, 1 risk factor = intermediate risk, 2-3 risk factors = high risk.

SUPPLEMENTARY FIGURE S2



Clinical heatmap showing the different types of immunoparesis in the SMM cohort (IMI: isotype-matched immunoparesis, HLC IP: suppression of HLC pairs of a different isotype, HLC IgM: suppression of HLC pairs of the IgM isotype, Classical: suppression of total Ig concentration of a different isotype, Follow up IMI: isotype-matched immunoparesis in follow up samples).

SUPPLEMENTARY FIGURE S3



Clinical heatmap showing the different types of immunoparesis and evolving M-protein behavior in patients who progressed to symptomatic disease during follow-up. IMI: isotype-matched immunoparesis, HLC IP: immunoparesis of uninvolved isotypes, HLC IgM IP: immunoparesis of IgM isotypes, follow-up IMI: isotype-matched immunoparesis in follow-up samples. n/a: not available, *Consistent decrease of isotype matched HLC pair, borderline severe IMI.

SUPPLEMENTARY TABLE S2

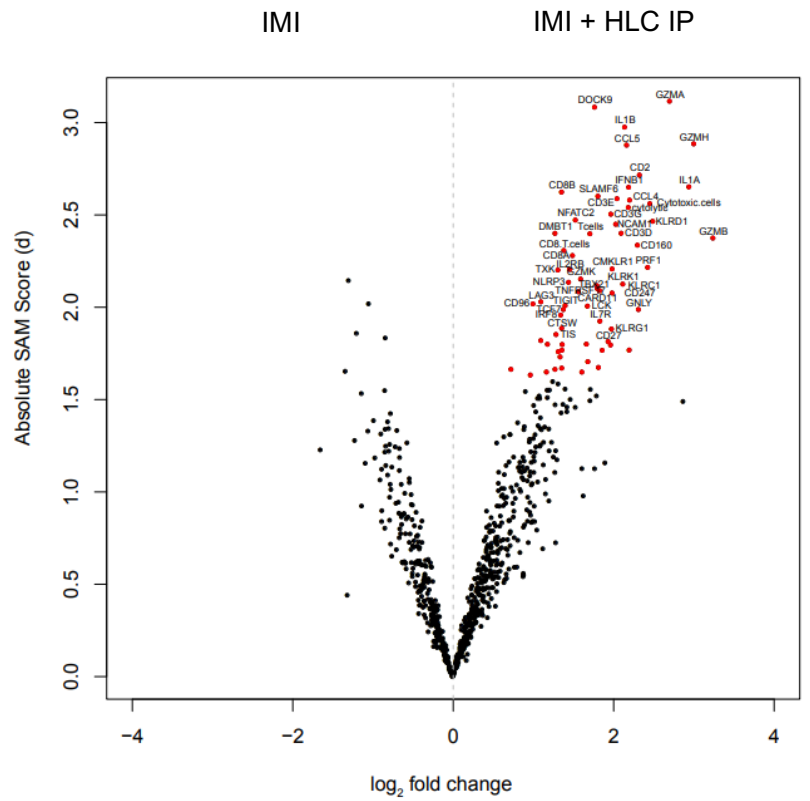
Gene expression signatures associated with specific cell types

CD8 T cells	<i>PRF1, CD8A, GZMM, CD8B, FLT3LG</i>
Cytotoxic cells	<i>KLRK1, GZMH, KLRB1, KLRD1, GZMA</i>
Dendritic cells (DC)	<i>CD1E, CD1B, CCL17, CCL22, CD1A</i>
Regulatory T cells (Tregs)	<i>FOXP3</i>
Th2 cells	<i>PMCH</i>
CD4 activated cells	<i>ATF2, NUP107</i>
NK cells	<i>SPN, XCL2, NCR1</i>
Th1 cells	<i>CTLA4, LTA, CD38, IFNG, CD38, CCL4</i>
T cells	<i>CD3G, CD96, SH2D1A, CD6, CD3D, LCK, CD2, CD3E</i>
Mast cells	<i>CTSG, MS4A2</i>
Neutrophils	<i>CSF3R</i>
Cytolytic score	<i>GZMA, GZMH, GZMM, PRF1, GNLY</i>

SUPPLEMENTARY FIGURE S4

Top most differentially expressed genes between SMM patients with severe IMI and SMM patients with severe IMI + severe HLC IP of a different isotype

GENE	D-SCORE	q-value(%)
GZMA	3.12	0.00
DOCK9	3.09	0.00
IL1B	2.98	0.00
GZMH	2.89	0.00
CCL5	2.88	0.00
CD2	2.72	0.00
IL1A	2.66	0.00
IFNB1	2.65	0.00
CD8B	2.63	0.00
SLAMF6	2.60	0.00
CD3E	2.59	0.00
CCL4	2.58	0.00
CD3G	2.51	0.00
NFATC2	2.47	0.00
KLRD1	2.47	0.00
NCAM1	2.45	0.00
CD3D	2.40	0.00
DMBT1	2.40	0.00
GZMB	2.38	0.00
CD160	2.34	0.00
CD8A	2.28	0.00
PRF1	2.22	0.00
CMKLR1	2.21	0.00
IL2RB	2.21	0.00
TXK	2.20	0.00
GZMK	2.16	0.00
NLRP3	2.14	0.00
KLRK1	2.13	0.00
TBX21	2.12	0.00
TNFRSF17	2.10	2.28
KLRC1	2.09	2.28
CARD11	2.09	2.28
CD247	2.08	2.28
LAG3	2.03	2.28
CD96	2.02	2.28
TIGIT	2.01	2.28
LCK	2.01	2.28



El análisis de la expresión génica del microambiente medular revela diferentes subtipos inmunes asociados con la progresión a enfermedad sintomática en el mieloma quiescente

Introducción

Uno de los grandes desafíos en la evaluación del riesgo de progresión del mieloma quiescente (MQ) es la determinación del impacto de la heterogeneidad del microambiente medular en el comportamiento biológico de este grupo de pacientes. Dada la relevancia del microambiente para la supervivencia de las células plasmáticas, y la ausencia de un claro “*second hit*” molecular asociado a la progresión del MQ a mieloma múltiple (MM), resulta atractiva la posibilidad de identificar biomarcadores inmunes asociados a la progresión a enfermedad sintomática que nos permitan identificar a pacientes que puedan beneficiarse de un tratamiento precoz. El objetivo de este estudio es comprender la composición y los niveles funcionales de las células de la médula ósea que rodean a las células plasmáticas malignas, correlacionar estos datos moleculares con los diferentes comportamientos clínicos de los pacientes con MQ, e identificar moléculas y subtipos celulares asociados con la progresión del MQ a MM sintomático.

Materiales y métodos

Se analizaron muestras de médula ósea (MO) al diagnóstico de 28 pacientes con MQ. Se estudiaron también, con fines comparativos, muestras de 22 pacientes con GMSI, 22 pacientes con MM (12 en fase de enfermedad refractaria o recaídos y 10 pacientes con MM de reciente diagnóstico (5 de estos últimos correspondían a pacientes también analizados en la fase de MQ)). La fracción CD138 negativa de la MO fue aislada utilizando microesferas inmunomagnéticas acopladas con anticuerpos contra CD138. La expresión de ARN fue analizada utilizando la tecnología nCounter™.

Resultados

Sobreexpresión de genes asociados con citotoxicidad y linfocitos T en pacientes con MQ frente a pacientes con GMSI.

En primer lugar, se compararon los resultados del estudio de expresión génica de la fracción CD138 negativa de la MO de 28 pacientes con MQ con 22 pacientes con GMSI. La mayor parte de los pacientes con MQ mostraron un perfil genético distintivo en la clasificación no supervisada. Dentro de los 127 genes diferencialmente expresados en el MQ, solo 4 estuvieron regulados a la baja (*FLT3*, *ARG1*, *FCER1A* y *S100A12*). Los genes más regulados al alza en los pacientes con MQ incluyeron moléculas asociadas al MM (*SLAMF7*, *TNFSF13*), moléculas claves en los procesos de citotoxicidad (*GZMB*, *GZMA*, *GZMH*, *GZML*, *GZMM*), moléculas asociadas al sistema de antígenos (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) e interleuquinas involucradas en las funciones de linfocitos T (*IFNL1*, *IL15*, *IL1A*, *IL32*, *TGFB1*, *IL1B*). También encontramos sobreexpresión de genes correspondientes a moléculas inhibitoras como *LAG-3*, *TIGIT* e *IDO-1*, que podrían afectar la respuesta inmune anti-mieloma en el caso del MQ.

Genes asociados con funciones de linfocito NK y T en pacientes con MQ frente a pacientes con MM sintomático.

En el análisis de clasificación no supervisado, los pacientes con MQ no mostraron un perfil de expresión génica claramente distintivo que los diferenciara de los pacientes con MM, poniendo de manifiesto la heterogeneidad genética que caracteriza al MQ. Dentro de los genes significativamente más representados en el grupo de MQ, se incluyeron aquellos asociados a funciones de linfocitos NK (*KLRB1*, *LILRB1*, *KLRD1*, *IRF1*, *KLRC1*). En este sentido, la regulación al alza de receptores inhibitorios como *KLRB1* (CD161), *LILRB1* (CD85j) y *KLRD1* (CD94) podría indicar alteraciones en la citotoxicidad NK. También observamos un aumento en *checkpoints* inmunes inhibitorios que pueden expresarse tanto en linfocitos T como linfocitos NK, como *LAG-3*, y supresores de la inmunidad antitumoral, como *IDO1*. En los pacientes con MM encontramos un nivel de expresión más elevado de genes previamente asociados con esta enfermedad

(*NCAM1*, *ATM*, *CD163*, *IL32*) y de genes altamente expresados en linfocitos T reguladores (Tregs) como *MFGE8*, *NT5E* (CD73) y *TIGIT*.

De los 10 pacientes con MQ que progresaron a MM durante el seguimiento, 5 tuvieron muestras disponibles de MO para el análisis tras la progresión. El análisis por pares de las muestras previo y tras la progresión reveló un número más bajo de genes diferencialmente expresados. Dentro de los 54 genes con una mayor expresión en la fase de MQ se encontraron varios miembros de la familia TNF (*TNFRSF9* (CD137), *TNFSF8*, *TNFRSF14*, *TNFRSF1A*), pero también los receptores inhibidores *ITIM*, *PVR* y *LILRB3*.

En conjunto, los hallazgos de este análisis podrían indicar un enriquecimiento de los genes asociados con una respuesta inmune citotóxica en los pacientes con MQ. Al mismo tiempo, la mayor expresión de receptores inhibidores sugiere un fenotipo exhausto de este compartimiento citotóxico.

La expresión de genes asociados con funciones citotóxicas de los linfocitos T se correlaciona con los factores de transcripción Tbet y Eomes en el MQ.

Al comparar las diferencias del microambiente tumoral en el MQ con la GMSI y el MM, hallamos que en ambos casos el tipo celular más relevante fueron los linfocitos T citotóxicos CD8+. La expresión de moléculas clave en citotoxicidad, tales como Tbet (*TBX21*), perforina (*PRF1*), granzima B (*GZMB*) y granulisina (*GNLY*), estaban significativamente incrementadas en los pacientes con MQ, comparados con aquellos con MM sintomático. Aunque estas moléculas también están involucradas en la citotoxicidad NK, observamos un incremento similar en moléculas con un papel importante en las funciones de los linfocitos T, como *CD3zeta* (CD127) y los receptores co-estimuladores *CD28* y *CD6*. La expresión de los factores de transcripción *Tbet* y *Eomes* se correlacionó, en el caso de los pacientes con MQ, con moléculas involucradas en citotoxicidad (*PRF1*, *GZMB*, *GNLY*) así como también con genes importantes para la función de los linfocitos T (*IFNG*, *IL-7*, *IL-7R*, *IL2RG*, *CD247* y *CD28*). El receptor *NCR1* (también conocido como NKp46, LY94) también se correlacionó con la expresión de

estos genes, lo que sugiere que los linfocitos NK también podrían jugar un papel en la citotoxicidad anti-mieloma en el caso del MQ. Como era de esperar, las moléculas citotóxicas no se correlacionaron con genes involucrados en las funciones de los linfocitos T reguladoras (*NRP1*, *ENTPD1* (CD39) y *CXCL12*). Los pacientes con MQ demostraron un amplio rango de expresión de los genes analizados, sugiriendo la existencia de diferentes subgrupos con diferencias en la composición y activación de las células inmunes del microambiente medular.

El análisis del perfil de expresión génica identificó distintos grupos dentro de los pacientes con MQ con diferencias en la composición celular inmune y los marcadores de activación.

El análisis no supervisado de la expresión génica utilizando el panel *PanCancer Immune* clasificó a los 28 pacientes con MQ en 4 grupos. Dentro de los genes con mayor expresión diferencial en el grupo 1 (n=7) se encontraron citoquinas y quimioquinas (*CCL11*, *CCL13*, *CCL16*, *CCL17*, *CCL21*, *CCL24*, *CXCL13*, *CX3CL1*, *XCR1*, *IFNL1*, *IFNL2*, *IL13*, *IL17A*, *IL25*, *LTB*, *TGFB2*, *TNFSF13*) y receptores de citoquinas (*TNFRSF12A*, *IL17RB*). En contraste, los pacientes del grupo 2 (n=8) mostraron un perfil de expresión notablemente enriquecido en marcadores y señalización de linfocitos T y NK (*PRF1*, *GZMA/B/H/K*, *GNLY*, *CD2*, *CD3D/E*, *KLRD1*, *KLRF1*, *KLRB1*, *KLRK1*, *CD274* (PD-L1), *LAG3*) y señalización mediada por interferón (*IFNG*, *MX1*, *ISG15*, *STAT1/2/4*). El análisis de firmas asociadas con subtipos específicos de células inmunes demostró que el grupo 2 estaba caracterizado por transcritos asociados a células citotóxicas. También analizamos la firma de inflamación tumoral (TIS), que contiene genes respondedores a IFN- γ asociados a la activación de linfocitos T, que han demostrado predecir la respuesta al bloqueo de PD-1 en múltiples tumores sólidos. La puntuación TIS se correlacionó con las firmas correspondientes a los linfocitos T CD8+ y a las células citotóxicas, y fue significativamente más alto en los pacientes del grupo 2.

El análisis de expresión génica en el grupo 2 comparado con el grupo 3 (n=10) mostró un aumento significativo en los genes asociados con funciones de linfocitos T y NK. Además, la mayor parte de los genes que se encontraban sobreexpresados en los

pacientes con MQ en comparación con las GMSI, mostraron también una mayor expresión en el grupo 2 comparado con el grupo 3. Esto sugiere que los pacientes del grupo 3 son más similares, en cuanto al perfil inmune, a las GMSI que a los MQ.

Aunque los pacientes del grupo 2 mostraron una firma inmune asociada con una importante respuesta citotóxica, también presentaron una mayor expresión de *checkpoints* inmunes inhibidores (*CD96*, *LAG3*, *BTLA*, *KLRB1*), lo que cuestiona el posible impacto de esta firma inmune en la progresión a enfermedad sintomática.

Los pacientes con MQ y una menor expresión de moléculas asociadas con citotoxicidad mostraron una supervivencia libre de progresión significativamente más larga.

Se analizó la relación entre los parámetros clínicos utilizados para determinar el riesgo de progresión en pacientes con MQ y los perfiles de expresión génica inmune. Los pacientes con MQ y un patrón *evolving* del CMs mostraron un incremento de los genes asociados con MM (*SLAMF7*, *CD79a*, *CD79b*) y de *AXL*. Algunas de estas moléculas se encuentran expresadas en las células plasmáticas (CP), por lo que no podemos descartar la interferencia de CP residuales en el análisis. En los pacientes con MQ de alto riesgo, los genes con una expresión significativamente más elevada incluyeron moléculas asociadas al MM (*TNFRSF17*, *NCAM1*, *IRF4*, *CD79B*), moléculas de citotoxicidad (*KLRC1*, *GZMA*) y *AXL*.

La mediana de seguimiento para los pacientes con MQ fue de 5,3 años. Diez pacientes con MQ progresaron a enfermedad sintomática, con una mediana en el tiempo a la progresión (TTP) de 1,9 años. Los pacientes con MQ que progresaron demostraron una expresión significativamente mayor de 63 genes, entre los que se encontraron moléculas involucradas en la activación inmune (como *TNF*, *IL-1B* y *GZMM*). La mayor parte de los genes regulados al alza en los pacientes con MQ de alto riesgo estaban incluidos en la lista de genes significativamente más expresados en el grupo 2. Los pacientes del grupo 3, con una menor expresión de genes de citotoxicidad y una firma inmune más parecida a las GMSI, demostraron una supervivencia libre de progresión

(PFS) significativamente más larga que los otros grupos. Algunos de los genes estudiados se asociaron con PFS más corta, como *TNF*, *TNFAIP3*, *GZMM* y *TNFRSF14*. De manera inversa, la expresión de transcritos correspondientes a *MAPK14*, *LTF*, *SMAD3*, *FOS*, *PSEN1* y *THBS1* se asociaron a una PFS más prolongada.

En conjunto, los resultados podrían indicar que genes asociados a un fenotipo exhausto de linfocitos T citotóxicos se encuentran más expresados en pacientes con MQ de alto riesgo, mientras que algunos miembros de la superfamilia TNF estarían asociados con la progresión a enfermedad sintomática.

Discusión

Los resultados de este estudio revelan una mayor expresión de genes asociados con citotoxicidad en pacientes con MQ, comparados con aquellos afectos de una GMSI o de MM sintomático. Sin embargo, también encontramos sobreexpresión de moléculas inhibitoras como *LAG-3*, *TIGIT* e *IDO-1*, que podrían afectar la respuesta inmune contra las células del mieloma en el caso del MQ. Los pacientes con MQ demostraron una amplia heterogeneidad en el compartimento inmune, que permitió la identificación de 4 grupos en base al perfil de expresión génica. Los pacientes incluidos en el grupo 2 presentaron una expresión más alta de moléculas citotóxicas (*GZMB*, *PRF*, *GNLY*, *IFNG*) pero también de moléculas inhibitoras (*LAG3*, *KLRC1*, *CD96*, *BTLA*), sugiriendo la presencia de linfocitos T exhaustos. No todos los *checkpoints* inmunes inhibitorios se encontraron diferencialmente expresados en los pacientes con MQ. Por ejemplo, *PD-1* no estaba significativamente sobreexpresado en el microambiente de los pacientes con MQ, sugiriendo que esta molécula podría no jugar un protagonismo crucial en la progresión a MM. Este resultado sería consistente con los resultados negativos obtenidos en los ensayos clínicos utilizando el bloqueo de la señalización vía PD-1/PD-L1 en MM y MQ. Por el contrario, los pacientes con MQ del grupo 2 mostraron un aumento significativo del receptor inhibidor ITIM *TIGIT*, un hallazgo consistente con datos previos de nuestro grupo demostrando que el bloqueo de *TIGIT* podría ser una estrategia terapéutica en el caso de CP que expresen Nectina-2. El papel de la

interacción de TIGIT y Nectina-2 en la progresión del MQ y su utilidad como diana terapéutica permanece por clarificar.

Finalmente, el análisis de muestras pareadas demostró una regulación al alza de varios miembros de la familia TNF (*TNFRSF9, TNFSF8, TNFRSF14, TNFRSF1A*) en el estadio de MQ en comparación con el de mieloma activo. También encontramos una asociación entre la mayor expresión de los miembros de la familia TNF (*TNF, TNFAIP3, TNFRSF14*) y una PFS más corta en los pacientes con MQ, sugiriendo que un microambiente pro-inflamatorio podría contribuir a la progresión de la enfermedad, en lugar de generar una respuesta anti-mieloma eficiente. De esta manera, la inflamación crónica y el agotamiento de los linfocitos T citotóxicos podrían explicar, en parte, el ineficiente control de la expansión de las CP malignas en algunos pacientes con MQ. En este estudio encontramos un aumento de la expresión de varios *checkpoints* inmunes inhibitorios (*TIGIT, CD96, BTLA, LAG3, KLRC1*) en pacientes con MQ de alto riesgo, algunos de ellos actualmente diana en ensayos clínicos para pacientes con MM.



Gene Expression Analysis of the Bone Marrow Microenvironment Reveals Distinct Immunotypes in Smoldering Multiple Myeloma Associated to Progression to Symptomatic Disease

OPEN ACCESS

Edited by:

Antonio Maurizi,
University of L'Aquila, Italy

Reviewed by:

Laurent Garderet,
Assistance Publique Hopitaux De
Paris, France

Ourania Tsitsilonis,

National and Kapodistrian University of
Athens, Greece

*Correspondence:

Carlos Fernández de Larrea
cfeman1@clinic.cat
Ester Lozano
elozano@ub.edu

†These authors have contributed
equally to this work and share
last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity
and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 10 October 2021

Accepted: 05 November 2021

Published: 22 November 2021

Citation:

Isola I, Brasó-Maristany F, Moreno DF,
Mena M-P, Oliver-Calders A,
Paré L, Rodríguez-Lobato LG,
Martin-Antonio B, Cibeira MT, Bladé J,
Rosñol L, Prat A, Lozano E and
Fernández de Larrea C (2021) Gene
Expression Analysis of the Bone
Marrow Microenvironment Reveals
Distinct Immunotypes in Smoldering
Multiple Myeloma Associated to
Progression to Symptomatic Disease.
Front. Immunol. 12:792609.
doi: 10.3389/fimmu.2021.792609

Ignacio Isola¹, Fara Brasó-Maristany², David F. Moreno¹, Mari-Pau Mena¹,
Aina Oliver-Calders¹, Laia Paré², Luis Gerardo Rodríguez-Lobato¹,
Beatriz Martín-Antonio¹, María Teresa Cibeira¹, Joan Bladé¹, Laura Rosñol¹, Aleix Prat²,
Ester Lozano^{1,3†} and Carlos Fernández de Larrea^{1,4*†}

¹ Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain, ² Department of Medical Oncology, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, ³ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, and Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain, ⁴ Experimental and Clinical Hematology Program (PHEC), Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Barcelona, Spain

Background: We previously reported algorithms based on clinical parameters and plasma cell characteristics to identify patients with smoldering multiple myeloma (SMM) with higher risk of progressing who could benefit from early treatment. In this work, we analyzed differences in the immune bone marrow (BM) microenvironment in SMM to better understand the role of immune surveillance in disease progression and to identify immune biomarkers associated to higher risk of progression.

Methods: Gene expression analysis of BM cells from 28 patients with SMM, 22 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and 22 patients with symptomatic MM was performed by using Nanostring Technology.

Results: BM cells in SMM compared to both MGUS and symptomatic MM showed upregulation of genes encoding for key molecules in cytotoxicity. However, some of these cytotoxic molecules positively correlated with inhibitory immune checkpoints, which may impair the effector function of BM cytotoxic cells. Analysis of 28 patients with SMM revealed 4 distinct clusters based on immune composition and activation markers. Patients in cluster 2 showed a significant increase in expression of cytotoxic molecules but also inhibitory immune checkpoints compared to cluster 3, suggesting the presence of cytotoxic cells with an exhausted phenotype. Accordingly, patients in cluster 3 had a significantly longer progression free survival. Finally, individual gene expression analysis showed that higher expression of TNF superfamily members (TNF, TNFAIP3, TNFRSF14) was associated with shorter progression free survival.

Conclusions: Our results suggest that exhausted cytotoxic cells are associated to high-risk patients with SMM. Biomarkers overexpressed in patients with this immune gene profile in combination with clinical parameters and PC characterization may be useful to identify SMM patients with higher risk of progression.

Keywords: smoldering multiple myeloma, immunotherapy, immune checkpoints, TIGIT, prognostic factors, bone marrow microenvironment

INTRODUCTION

Smoldering multiple myeloma (SMM) is a pre-malignant condition that precedes symptomatic MM and is defined by a serum monoclonal immunoglobulin (M-protein) of ≥ 3 g/dL and/or an urinary monoclonal protein ≥ 500 mg per 24 h, and/or 10–60% clonal bone marrow plasma cells (BMPC), in the absence of end-organ damage (1, 2). Since only a fraction of SMM patients will progress to active MM, the initiation of an early anti-myeloma treatment is a subject of intense discussion. Based on the revised International Myeloma Working Group (IMWG) criteria, asymptomatic patients with ultra-high risk SMM are currently considered to have active MM and treatment is recommended (2, 3). We previously defined two subsets of patients with SMM: 1- the ‘evolving’ variant of SMM, characterized by a progressive increase in the M-protein size until symptomatic myeloma develops and a shorter time to progression and 2- the non-evolving pattern, with a long-lasting stable M-protein and a longer time to progression (4). The actuarial transformation rates at 10 years of follow-up were 55 and 10% in patients with ‘evolving’ and ‘non-evolving’ pattern, respectively (1, 4). In line with these results, we recently evaluated progression risk factors in 206 patients with SMM, demonstrating that median time from recognition of evolving type to progression into symptomatic MM was 1.1 years and progression rate at 3 years was 71% (5). Therefore, confirmation of an evolving behavior drastically worsened the prognostic estimation made at diagnosis for every covariate predictive of progression (serum M-protein size, BMPC infiltration, immunoparesis and Mayo Clinic risk score) (5). Accordingly, the revised IMWG risk stratification model for SMM (“2/20/20”) identified three independent factors predicting progression risk at 2 years: serum M-protein > 2 g/dL, involved to uninvolved free light-chain (FLC) ratio > 20 , and BMPC infiltration $> 20\%$ (6).

One of the main challenges of assessing progression risk is to take into account the BM heterogeneity in molecular and cellular patterns that leads to the different clinical behavior of patients included under the designation of SMM (7). Given the relevance of microenvironment for malignant PC survival and the absence of a clear molecular “second hit” between SMM and symptomatic MM (8), it is crucial to find new immune biomarkers associated to the risk of progression to

symptomatic MM that allow us to evaluate the need for an early intervention (9, 10). In this study we aim to investigate whether molecular and cellular mechanisms in the BM immune microenvironment may explain the heterogeneity observed in the clinic. Our goal is to better understand the composition and functional levels of BM cells surrounding malignant PC and correlate this molecular data with clinical behavior to identify key molecules and cell types associated to progression from SMM to active myeloma.

MATERIALS AND METHODS

Patient Cohorts

BM aspiration samples were collected from 28 patients with SMM at diagnosis (patient characteristics are summarized in **Table 1**). In addition, for comparison purposes we also studied BM samples from 22 patients with MGUS and from 22 patients with symptomatic MM (12 refractory/relapsed MM patients and 10 newly diagnosed untreated patients, 5 of them corresponding to patients also analyzed at the SMM stage who later progressed, allowing a paired comparison).

All patients were diagnosed at the Amyloidosis and Myeloma Unit in the Department of Hematology (Hospital Clínic of Barcelona). Sample collection and clinical record review were performed after informed written consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Study protocol was approved by the Institutional Review Board at Hospital Clínic of Barcelona. Patients were diagnosed according to standard International Myeloma Working Group criteria.

The “evolving” type was defined as a progressive increase of at least 10% in the M-protein size within the first 12 months from diagnosis when baseline M-protein was ≥ 30 g/L or over a period of 3 years (with a progressive increase in the M-protein size in each of the annual measurements) in patients with an initial M-protein < 30 g/L (4, 11). Immunoparesis was defined as a decrease below normal levels of at least one of the uninvolved serum immunoglobulins. BM aspirates obtained at diagnosis were reviewed independently by two observers; plasma cell percentages were estimated from a 500-cell count by each examiner and the mean of the two values was considered for the analysis.

RNA Isolation

CD138-depleted BM cell fraction was isolated with anti-CD138 mAb-coated immunomagnetic beads using an AutoMacs cell sorter (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purity was assessed

Abbreviations: BM, Bone marrow; ISS, International stage system; MGUS, Monoclonal gammopathies of undetermined significance; MM, Multiple myeloma; NK, Natural killer; PC, Plasma cells; SMM, Smoldering MM; Th, T helper.

TABLE 1 | Patient characteristics.

	MGUS	SMM	MM
Number of patients	22	28	22
Age, median years (range)	70 (40–88)	69 (38–84)	68 (49–80)
Gender, male/female	12/10	11/17	11/11
Isotype (%)			
• IgG	15 (68)	15 (54)	12 (55)
• IgA	7 (32)	11 (39)	10 (45)
• Biclinal		1 (3,5)	
• Light chain		1 (3,5)	
Serum M-protein g/L*	15.3 (13.1–20.6)	20.2 (13.4–32.1)	25.8 (11.6–40.8)
Serum FLCr [†]	2.2 (0.1–8.8)	1.5 (0.7–11.3)	33.4 (2.7–423)
BMPC (%) [*]	5.5 (3–8)	19 (12.5–24.7)	34 (15.5–47)
Abnormal BMPC (%) ^{††}	71.5 (33.2–85.7)	98 (96.7–100)	100 (99–100)
ISS stage (%)	—	—	
I			5 (26)
II			7 (37)
III			7 (37)
Risk Stage (%) [‡]			—
Low	2 (9)	11 (41)	
Intermediate	17 (77)	8 (29.5)	
High	3 (14)	8 (29.5)	

SMM, smoldering multiple myeloma; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM, symptomatic multiple myeloma; FLCr, serum free light chain ratio (κ/λ); BMPC, bone marrow plasma cell count.

ISS, International staging system for multiple myeloma.

*Measurements are median (interquartile range).

[†]Percentage of bone marrow plasma cells with abnormal phenotype by flow cytometry.

[‡]The International Myeloma Working Group (IMWG) SMM revised risk model includes serum M-protein >2 g/dL, involved to uninvolved free light-chain ratio >20 and bone marrow plasma cell infiltration >20%. The Mayo Clinic MGUS revised risk model includes serum FLCr 1.65, non-IgG MGUS and M protein >15 g/L.

after isolation, only samples with <2% of CD138^{neg} cells were included in this study. Total RNA from the CD138^{neg} BM cell fraction was extracted using the TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to manufacturer's instructions.

Gene Expression Analysis

RNA expression was measured with the nCounter technology; preparation and analyses were performed according to the manufacturer's protocol (NanoString Technologies, Inc. Seattle, WA). A minimum of 100 ng of total RNA per sample was loaded and run on the HuV1_Cancer Immune_v1_1_Nanostring for analysis of the NanoString PanCancer Immune Profiling Panel of 730 immune-associated genes and 40 housekeeping genes. Expression counts were then normalized using the nSolver 4.0 software and custom scripts in R 3.6.3. Unpaired significance analysis of microarrays (SAM), using False Discovery Rate [FDR], were used to identify differential gene expression across sample groups. In addition, we calculated scores for immune-related gene expression signatures according to previously published literature, the "Tumor Inflammation Signature" (TIS) reported by Ayers et al. (12) and a previously described "cytolytic score" for hematological malignancies (**Supplementary Table S1**). The gene expression data have been deposited in the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GEO: GSE186537.

Statistical Analysis

Differences in time to progression (TTP) between patient groups were analyzed using Kaplan-Meier survival curves with the log-

rank test used to indicate significance. Statistical differences for numerical values were calculated using the Brown–Forsythe ANOVA test, Mann-Whitney U test and the Kruskal-Wallis test. Spearman r was used to measure markers correlations. Differences were considered statistically significant at P values less than 0.05. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism, v8.0.1 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

RESULTS

Upregulation of Gene Sets Associated With Cytotoxicity and T Cell Functions in Patients With SMM Compared to MGUS

Patients with SMM have a higher number of BMPC than patients with MGUS, which is associated to a higher risk of myeloma progression. In order to evaluate changes in the immune microenvironment associated to the increase in progression risk, we first performed gene expression analysis of CD138-depleted BM cells of 28 patients with SMM compared to 22 patients with MGUS. Most of the patients with SMM showed a distinct gene profile by unsupervised hierarchical clustering (**Figure 1A**). Among the 127 genes differentially expressed in SMM, only 4 genes were downregulated (*FLT3*, *ARG1*, *FCER1A* and *S100A12*) (**Figure 1B** and **Supplementary Table 2**). The top upregulated genes in SMM included molecules associated to myeloma (*SLAMF7* (CS1), *TNFSF13* (APRIL)) key molecules in cytotoxicity (*GZMB*, *GZMA*, *GZMH*, *GNLY*, *HLA-A*, *HLA-B*,

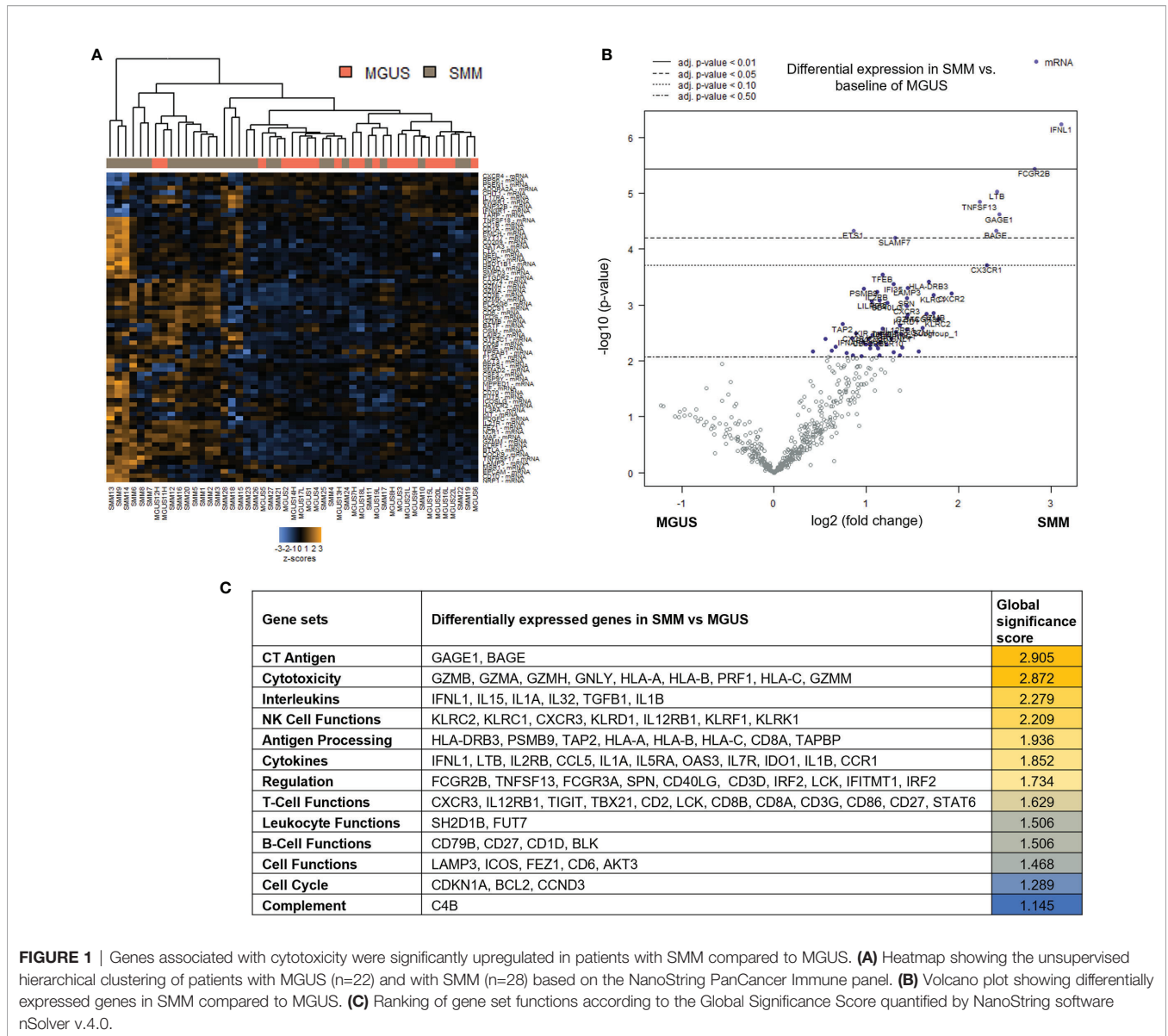


FIGURE 1 | Genes associated with cytotoxicity were significantly upregulated in patients with SMM compared to MGUS. **(A)** Heatmap showing the unsupervised hierarchical clustering of patients with MGUS (n=22) and with SMM (n=28) based on the NanoString PanCancer Immune panel. **(B)** Volcano plot showing differentially expressed genes in SMM compared to MGUS. **(C)** Ranking of gene set functions according to the Global Significance Score quantified by NanoString software nSolver v.4.0.

PRF1, *HLA-C*, *GZMM*) and interleukins playing crucial roles in T cell functions (*IFNL1*, *IL15*, *IL1A*, *IL32*, *TGFB1*, *IL1B*) (Figures 1B, C). Although our results showed an upregulation of genes associated to cytotoxicity in the BM of patients with SMM compared to MGUS, we also found overexpression of inhibitory molecules such as LAG-3, TIGIT and IDO1, which may affect the anti-myeloma immune response in SMM.

Genes Associated With NK and T Cell Functions Were Differentially Expressed in Patients With SMM Compared to Symptomatic MM

To assess changes in immune microenvironment of patients with SMM compared to symptomatic MM, we analyzed gene

expression data from the 28 patients with SMM compared to 22 patients with MM. Unsupervised hierarchical clustering did not show a distinct gene profiling discriminating patients with SMM versus MM underlying the wide heterogeneity found in SMM (Figure 2A). Among the 136 genes differentially expressed in SMM, 30 genes were downregulated and 106 upregulated in SMM compared to MM (Figure 2B and Supplementary Table 2). Global significance score showed that gene sets associated to NK functions were overrepresented in SMM (*KLRB1*, *LILRB1*, *KLRD1*, *IRF1*, *KLRC1*) (Figure 2C). Upregulation of inhibitory receptors such as *KLRB1* (CD161), *LILRB1* (CD85j), and *KLRD1* (CD94) may indicate impairment in NK cell cytotoxicity. Accordingly, we also observed an increase in inhibitory checkpoints that can be expressed in both NK and T cells such as LAG-3 and suppressors of anti-tumor immunity such as IDO1

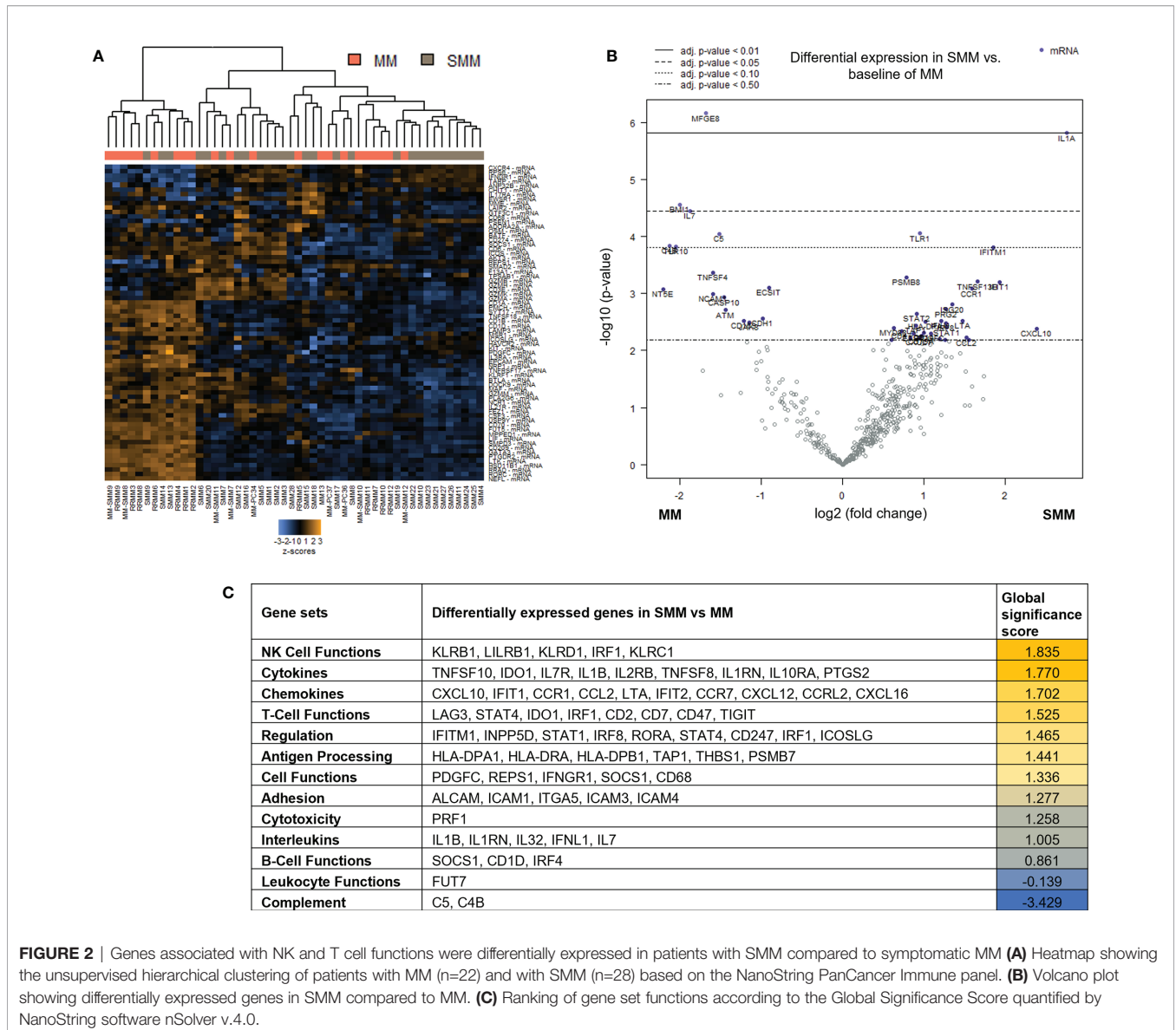


FIGURE 2 | Genes associated with NK and T cell functions were differentially expressed in patients with SMM compared to symptomatic MM (A) Heatmap showing the unsupervised hierarchical clustering of patients with MM (n=22) and with SMM (n=28) based on the NanoString PanCancer Immune panel. (B) Volcano plot showing differentially expressed genes in SMM compared to MM. (C) Ranking of gene set functions according to the Global Significance Score quantified by NanoString software nSolver v.4.0.

(Figure 2C and Supplementary Table 2). In patients with symptomatic MM, we found higher levels of genes previously associated with MM (*NCAM1*, *ATM*, *CD163*, *IL32*) and genes highly expressed in regulatory T cells (Tregs) such as *MPGE8*, *NT5E* (CD73) and *TIGIT*.

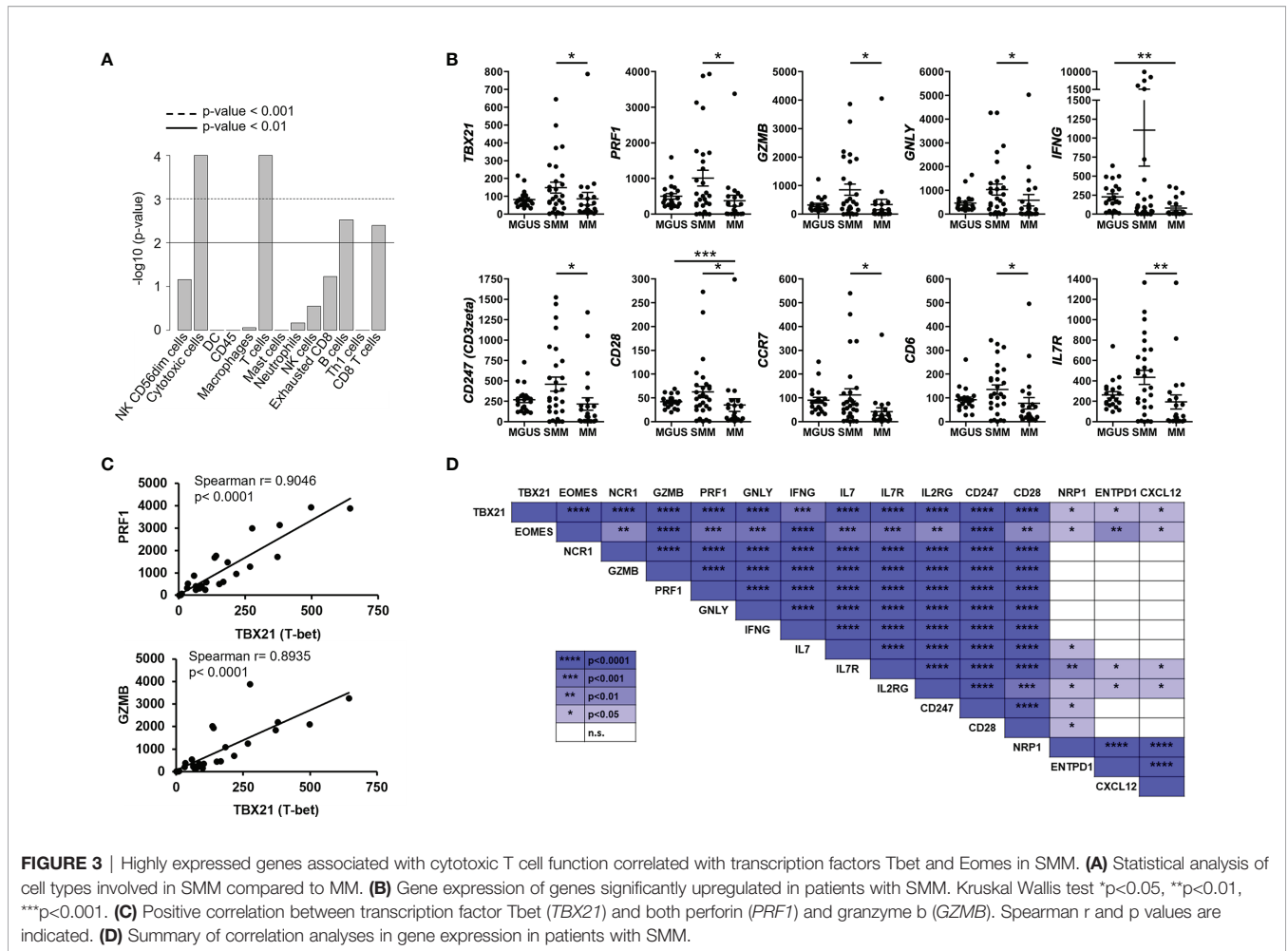
Out of the 10 patients with SMM which progressed to MM during follow up, 5 were available for gene expression analysis after progression. Paired gene expression analysis before and after progression showed a lower number of differentially expressed genes. Interestingly, the 54 upregulated genes in the SMM stage included several members of the TNF family (*TNFRSF9* (CD137), *TNFSF8*, *TNFRSF14*, *TNFRSF1A*) but also the ITIM-bearing inhibitory receptors *PVR* and *LILRB3* (Supplementary Figure S1).

Taken together, our results could be indicative of an enrichment in gene sets associated to cytotoxic immune

response in patients with SMM. However, the upregulation of inhibitory receptors may also suggest an exhausted phenotype in the cytotoxic cell compartment.

Highly Expressed Genes Associated With Cytotoxic T Cell Function Correlated With Transcription Factors Tbet and Eomes in SMM

When comparing the tumor microenvironment in SMM with MGUS and MM, we found that in both cases the most relevant cell type was cytotoxic CD8⁺ T cells (Figure 3A). Indeed, key molecules in cytotoxicity such as Tbet (*TBX21*), perforin (*PRF1*), granzyme b (*GZMB*) and granulysin (*GNLY*) were significantly increased in SMM compared to MM (Figure 3B). Although



these molecules are also important in NK cytotoxicity, we observed an increase in molecules playing crucial roles in T cell functions such as CD3zeta (*CD247*), co-stimulatory receptor CD28 and CD6, consistent with the relevance of cytotoxic CD8⁺ T cells in SMM. Furthermore, expression of transcription factors Tbet and Eomes strongly correlate with key molecules in cytotoxicity such as perforin (*PRF1*), granzyme b (*GZMB*) and granulysin (*GNLY*) in patients with SMM (Figures 3C, D). Both transcription factors also correlate with genes important for T cell function such as *IFNG*, *IL7*, *IL7R*, *IL2RG*, *CD247* and *CD28*. Of note, the natural cytotoxicity triggering receptor 1 *NCR1* (also known as NKp46, LY94) also correlated with these key genes suggesting that NK cells could also play a role in anti-myeloma cytotoxicity in SMM. As expected, cytotoxic molecules did not correlate with genes involved in Treg function such as *NRP1*, *ENTPD1* (*CD39*) and *CXCL12* (Figure 3D). As shown in Figure 3B, patients with SMM showed a wide range of expression levels, suggesting the presence of subgroups with differences in the composition and activation levels of the immune cells in the BM microenvironment.

Gene Profiling of Bone Marrow Cells Identified Distinct Clusters in Patients With SMM Based on Immune Cell Composition and Activation Markers

Unsupervised hierarchical clustering after gene expression analysis with the PanCancer Immune panel classified the 28 SMM patients in four clusters (Figure 4A). Among the top upregulated genes in cluster 1 ($n=7$) we found cytokines and chemokines (*CCL11*, *CCL13*, *CCL16*, *CCL17*, *CCL21*, *CCL24*, *CXCL13*, *CX3CL1*, *XCRI*, *IFNL1*, *IFNL2*, *IL13*, *IL17A*, *IL25*, *LTB*, *TGFB2*, *TNFSF13*) and cytokine receptors (*TNFRSF12A*, *IL17RB*). In contrast, cluster 2 ($n=8$) showed an expression profile notably enriched for T and NK cell markers and signaling (*PRF1*, *GZMA/B/H/K*, *GNLY*, *CD2*, *CD3D/E*, *KLRD1*, *KLRF1*, *KLRB1*, *KLRK1*, *CD274* (PD-L1), *LAG3*) and interferon signaling (*IFNG*, *MX1*, *ISG15*, *STAT1/2/4*) (Figure 4A and Supplementary Table 2). Indeed, the analysis of the expression of gene expression signatures (GES) associated with specific immune cell-types showed that cluster 2 included a distinct immune signature characterized by higher levels of

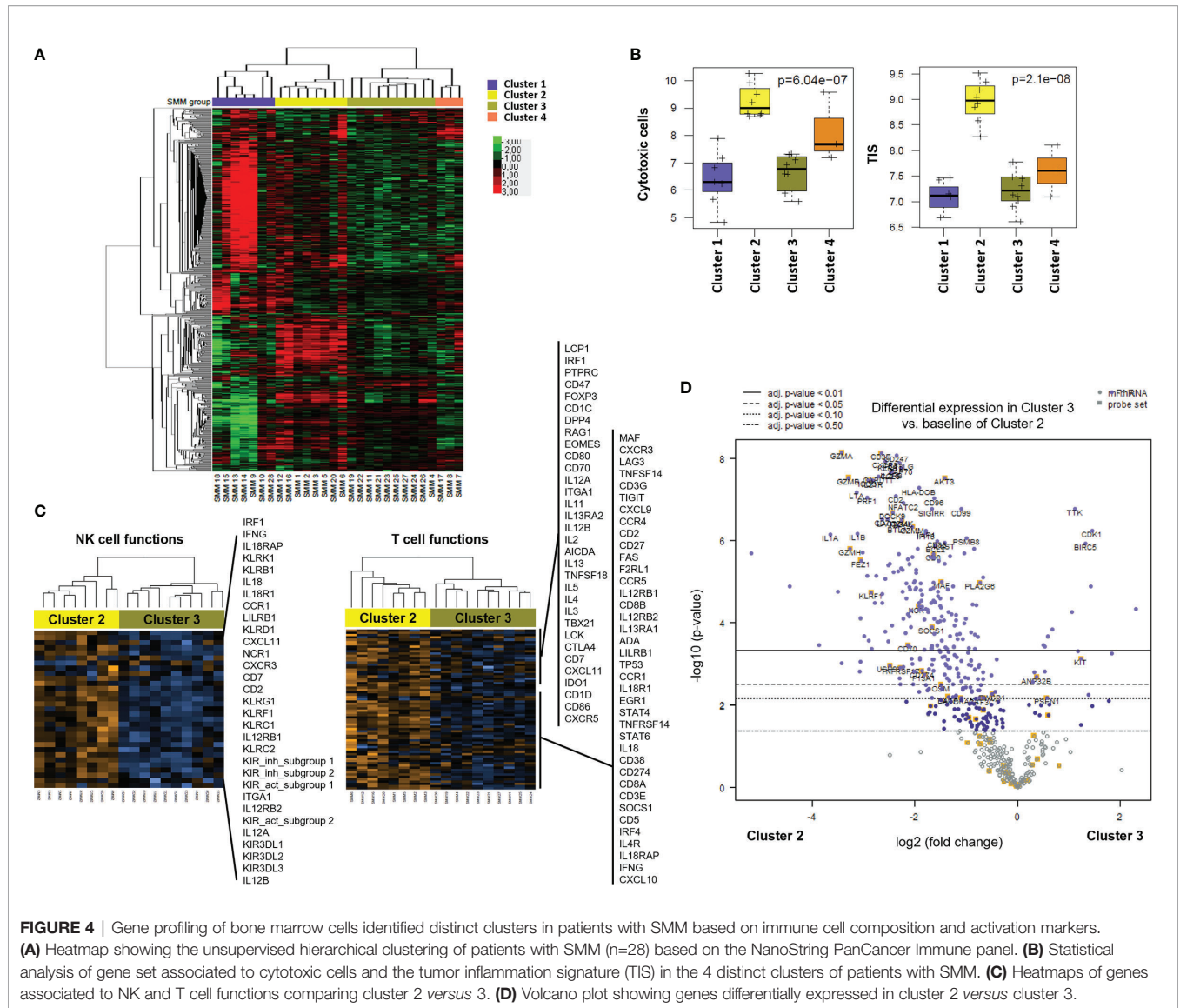


FIGURE 4 | Gene profiling of bone marrow cells identified distinct clusters in patients with SMM based on immune cell composition and activation markers. **(A)** Heatmap showing the unsupervised hierarchical clustering of patients with SMM (n=28) based on the NanoString PanCancer Immune panel. **(B)** Statistical analysis of gene set associated to cytotoxic cells and the tumor inflammation signature (TIS) in the 4 distinct clusters of patients with SMM. **(C)** Heatmaps of genes associated to NK and T cell functions comparing cluster 2 versus 3. **(D)** Volcano plot showing genes differentially expressed in cluster 2 versus cluster 3.

transcripts associated to cytotoxic cells (Figure 4B). We also evaluated the tumor inflammation signature (TIS), which contains IFN- γ responsive genes associated with T cell activation, which has been shown to predict response to Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) blockade across multiple solid tumors (13). The TIS score correlated with the CD8⁺ T cell and cytotoxic cell signatures and was significantly higher in patients from cluster 2 (Figure 4B). Furthermore, gene expression analysis of cluster 2 compared to cluster 3 (n=10) showed a significant increase in genes associated to NK and T cell function in cluster 2 (Figure 4C and Supplementary Table 2). Indeed, most of the genes upregulated in SMM compared to MGUS were upregulated in cluster 2 compared to cluster 3 suggesting that the differences between SMM and MGUS were due to cluster 2 of patients with SMM while cluster 3 of SMM patients were more similar to a MGUS immune profile (Figure 4D). Therefore, although patients from cluster 2

showed an immune signature associated to a strong cytotoxic response, they also upregulated the expression of inhibitory checkpoints (*CD96*, *LAG3*, *BTLA*, *KLRB1*) which raised the question of whether this immune signature has an impact in progression to myeloma.

Patients With SMM in Cluster 3 With Lower Expression of Cytotoxic Associated Molecules Showed Significantly Longer Progression Free Survival

We next analyzed the association between clinical parameters used to assess risk to progression in patients with SMM and their gene immune signatures (Figure 5A). SMM patients with an evolving pattern of the M-protein showed an increase in genes associated to myeloma (*SLAMF7*, *CD79A*, *CD79B*) and *AXL* (Figure 5B and

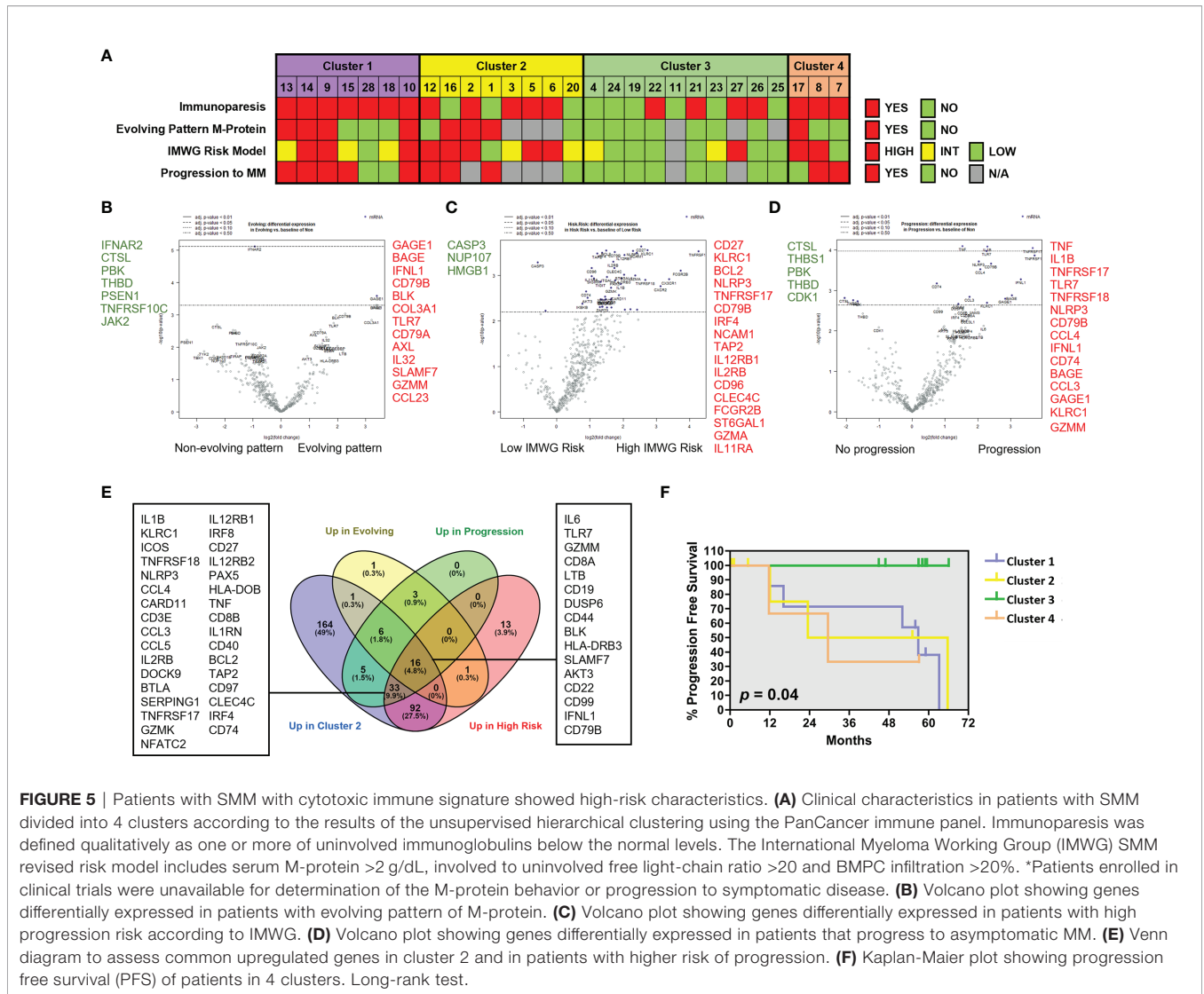


FIGURE 5 | Patients with SMM with cytotoxic immune signature showed high-risk characteristics. **(A)** Clinical characteristics in patients with SMM divided into 4 clusters according to the results of the unsupervised hierarchical clustering using the PanCancer immune panel. Immunoparesis was defined qualitatively as one or more of uninvolvement immunoglobulins below the normal levels. The International Myeloma Working Group (IMWG) SMM revised risk model includes serum M-protein >2 g/dL, involved to uninvolvement free light-chain ratio >20 and BMPC infiltration >20%. *Patients enrolled in clinical trials were unavailable for determination of the M-protein behavior or progression to symptomatic disease. **(B)** Volcano plot showing genes differentially expressed in patients with evolving pattern of M-protein. **(C)** Volcano plot showing genes differentially expressed in patients with high progression risk according to IMWG. **(D)** Volcano plot showing genes differentially expressed in patients that progress to asymptomatic MM. **(E)** Venn diagram to assess common upregulated genes in cluster 2 and in patients with higher risk of progression. **(F)** Kaplan-Meier plot showing progression free survival (PFS) of patients in 4 clusters. Long-rank test.

Supplementary Table 2). Some of these molecules are expressed in a variety of immune cell types but also may be found in PCs, thus we cannot rule out that this high-sensitivity gene expression analysis may detect presence of remaining PCs. However, our experimental approach can still capture major differences in key immune genes of interest. In high-risk SMM patients, 155 upregulated genes included molecules associated to MM (*TNFRSF17*, *NCAM1*, *IRF4*, *CD79B*), cytotoxic molecules (*KLRC1*, *GZMA*) and *AXL* (Figure 5C). The median follow up of the patients with SMM was 5.3 years. Ten patients with SMM progressed to symptomatic MM, with a median time to progression (TTP) of 1.9 years. SMM patients that progressed to MM showed 76 differentially expressed genes when compared to SMM patients who showed no progression during follow up, with an increase in 63 including molecules involved in immune response activation such as *TNF*, *IL-1B* and granzyme M (Figure 5D). Most of the genes upregulated in high-risk patients were included in the list of upregulated genes in cluster 2 (Figure 5E). We next wanted to assess whether distinct clusters

based in immune signatures were associated to differences in progression free survival (PFS). Four patients in cluster 2 were excluded from this analysis since they started treatment in a clinical trial for high-risk SMM patients (GEM-CESAR). As shown in Figure 5F, log-rank test showed that patients in cluster 3 with lower expression of cytotoxic genes and an immune signature more similar to MGUS patients had a significantly longer PFS compared to the other of clusters ($p=0.04$).

Some of the studied genes were independently associated with shorter PFS such as *TNF*, *TNFAIP3*, *GZMM* and *TNFRSF14* (also known as HVEM) (Supplementary Figure 2A). Conversely, high expression of transcripts for *MAPK14*, *LTF*, *SMAD3*, *FOS*, *PSEN1* and *THBS1* were associated with increased progression free survival (Supplementary Figure 2B). Taken together, our results could indicate that genes associated to an exhausted phenotype in cytotoxic T cells are upregulated in high-risk SMM patients while some members of the *TNF* superfamily are significantly associated to myeloma progression.

DISCUSSION

One of the most important challenges in the fight against MM is the assessment of progression risk in patients with asymptomatic conditions that precede this malignancy. Several algorithms have been developed based on clinical and laboratory parameters to identify high-risk patients (5, 6). To better understand the basic mechanisms of myeloma progression in patients with SMM, most of the genetic studies have focused on investigating CD138⁺ PC characteristics such as chromosomal aberrations (14), gene expression profiling (15), whole-exome sequencing of clonal PC (16–18). However, PC extrinsic factors in the BM microenvironment may also play a crucial role in myeloma progression (8). In this regard, several studies have reported impairment of immune cell functions in symptomatic MM compared to MGUS (19, 20). In addition, immune cells from peripheral blood of high-risk SMM patients have shown an impaired immune system that could be reactivated by therapeutic immunomodulation to delay the progression to MM (21). Here, we wanted to investigate the immune cell compartment in the BM of patients with SMM to dissect the immune evasion strategies involved in malignant PC survival, with important clinical implications for patient risk stratification and early treatment.

In this study, we investigated changes in the BM immune microenvironment in SMM that could affect the efficacy of the immune response against malignant PC and, consequently, the time to symptomatic MM progression. Our results showed an upregulation of genes associated to cytotoxicity in SMM compared to both MGUS and symptomatic MM. However, we also found overexpression of inhibitory molecules such as LAG-3, TIGIT and IDO1, which may affect the anti-myeloma immune response in SMM. Patients with SMM showed a wide heterogeneity in their immune compartment (22), which let us to identify 4 clusters based on their gene expression profiles. Importantly, patients in cluster 2 had higher expression of cytotoxic molecules (GZMB, PRF, GNLY, IFNG) but also upregulation of some inhibitory molecules (LAG3, KLRC1, CD96, BTLA), suggesting the presence of exhausted T cells. Consistently, features of exhaustion in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, such as a significant increase in PD-1 and CTLA-4 compared to healthy donors, have been reported in the BM of patients with symptomatic MM (23). Interestingly, a recent analysis based on single-cell RNA sequencing of BM cells from 8 patients with SMM compared to 4 healthy controls also showed an increase in negative immune checkpoints such as LAG-3 and TIGIT (24). Our study, including a larger cohort of patients with SMM and comparing them with asymptomatic MGUS and active MM, revealed distinct clusters in SMM based on their immune signature associated to risk of progression. However, not all inhibitory immune checkpoints were overexpressed in SMM. For instance, PD-1 was not significantly expressed in SMM microenvironment, suggesting that PD-1 may not play a crucial role in myeloma progression. This finding would be consistent with the negative results obtained in clinical trials blocking PD-1 signaling in MM (25) and in SMM (26). On the contrary, patients with SMM in cluster 2 showed a significant increase in the ITIM-bearing inhibitory receptor TIGIT (27, 28) which is consistent with our previous findings demonstrating

that TIGIT blockade can be a useful therapeutic strategy in patients with SMM and active MM with Nectin-2 expressing PC (29). Thus, the role of TIGIT-Nectin-2 interaction in myeloma progression and its relevance as therapeutic target in patients with SMM remains to be elucidated.

Finally, paired gene expression analysis showed several members of the TNF family (*TNFRSF9* (CD137), *TNFSF8*, *TNFRSF14* (HVEM), *TNFRSF1A*) upregulated genes in the SMM stage compared to active MM. In this regard, we also found an association of high expression of TNF superfamily members (*TNF*, *TNFAIP3*, *TNFRSF14* (HVEM)) with a significantly shorter PFS in patients with SMM suggesting that the presence of a pro-inflammatory microenvironment may contribute to myeloma progression instead of generating an efficient anti-myeloma response. Thus, chronic inflammation and exhaustion of cytotoxic T cells may partly explain a defective control of malignant PC growth in SMM. Our findings may contribute to a better understanding of the immune dysfunction mechanisms underlying multiple myeloma progression (30). Since there is no specific treatment for patients with SMM, high-risk patients are treated with agents approved for symptomatic MM. In MM, several immunotherapies have been approved against CD38 (31), signaling lymphocytic activation molecule F7 (SLAMF7) and B cell maturation antigen (BCMA) (32, 33). In this study, we found several inhibitory immune checkpoints (TIGIT, CD96, BTLA, LAG3, KLRC1) upregulated in high-risk SMM patients, some of them being currently tested in clinical trials for patients with relapsed refractory MM, such as dual blockade of TIGIT and LAG-3 (NCT04150965). Further research is needed to evaluate the relevance of these molecules as potential therapeutic targets to avoid myeloma progression in SMM.

CONCLUSIONS

In summary, our results provide insight into the composition and activation levels of the BM immune cells from distinct clusters of patients with SMM which may have an impact in progression to symptomatic disease. Gene expression profiling of BM cells surrounding malignant PC revealed changes in genes associated to exhausted cytotoxic T cells that can be relevant as biomarkers to better characterize the progression risk of asymptomatic patients with SMM. Furthermore, our findings could be useful to guide the implementation of current approved treatments and to develop new targeted immunotherapies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: GEO, GSE186537.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Board at Hospital Clínic of

Barcelona (HCB/2019/0382). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

II performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. FB-M analyzed gene expression results. DM, AO-C, LR-L, MC, JB, and LR recruited patients and collect clinical data. M-PM, BM-A, LP, and EL performed experiments and data analysis. AP provided reagents and helped with Nanostring technology. EL and CF designed research, analyzed data and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported in part by Grants PI16/00423, PI19/00669 and PI20/00436 from Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)-Una manera de Hacer Europa) and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, de Larrea CF. Pathogenesis and Progression of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Leukemia* (2008) 22:1651–7. doi: 10.1038/leu.2008.203
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma. *Lancet Oncol* (2014) 15:e538–48. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
- Caers J, Garderet L, Kortüm KM, O'Dwyer ME, van de Donk NWCJ, Binder M, et al. European Myeloma Network Recommendations on Tools for the Diagnosis and Monitoring of Multiple Myeloma: What to Use and When. *Haematologica* (2018) 103:1772–84. doi: 10.3324/haematol.2018.189159
- Rosiñol L, Bladé J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Montoto S, et al. Smoldering Multiple Myeloma: Natural History and Recognition of an Evolving Type. *Br J Haematol* (2003) 123:631–6. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04654.x
- de Larrea CF, Isola I, Pereira A, Cibeira MT, Magnano L, Tovar N, et al. Evolving M-Protein Pattern in Patients With Smoldering Multiple Myeloma: Impact on Early Progression. *Leukemia* (2018) 32:1427–34. doi: 10.1038/s41375-018-0013-4
- Mateos M-V, Kumar S, Dimopoulos MA, González-Calle V, Kastritis E, Hajek R, et al. International Myeloma Working Group Risk Stratification Model for Smoldering Multiple Myeloma (SMM). *Blood Cancer J* (2020) 10:102. doi: 10.1038/s41408-020-00366-3
- Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF, et al. Intracanal Heterogeneity is a Critical Early Event in the Development of Myeloma and Precedes the Development of Clinical Symptoms. *Leukemia* (2014) 28:384–90. doi: 10.1038/leu.2013.199
- Ho M, Goh CY, Patel A, Staunton S, O'Connor R, Godeau M, et al. Role of the Bone Marrow Milieu in Multiple Myeloma Progression and Therapeutic Resistance. *Clin Lymphoma Myeloma Leukemia* (2020) 20(10):E752–68. doi: 10.1016/j.clml.2020.05.026
- Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide Plus Dexamethasone for High-Risk Smoldering

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank all the members of the department of Hematology (Hospital Clinic of Barcelona) and all the patients included in this study for their altruistic help.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.792609/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Genes upregulated in 5 patients with SMM compared to their gene profile after progression to symptomatic MM **(A)** Heatmap showing the unsupervised hierarchical clustering of 5 patients before and after progression. **(B)** Expression of ITIM-bearing receptors, poliovirus receptor (PVR) and leukocyte immunoglobulin like receptor B3 (LILRB3) before and after progression.

Supplementary Figure 2 | Analysis of progression free survival *versus* genes differentially expressed in patients with SMM. **(A)** Kaplan-Maier plot showing progression free survival (PFS) of patients (n=28) *versus* indicated genes. Upregulation of TNF superfamily members were associated to shorter PFS. Long-rank test *p* values are indicated. **(B)** High expression of genes such as MAPK14, Thrombospondin 1 (*THBS1*), transcription factor FOS and SMAD3 were associated to longer PFS. Long-rank test *p* values are indicated.

- Multiple Myeloma. *N Engl J Med* (2013) 369:438–47. doi: 10.1056/nejmoa1300439
- Lonial S, Jacobus S, Fonseca R, Weiss M, Kumar S, Orlowski RZ, et al. Randomized Trial of Lenalidomide *Versus* Observation in Smoldering Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* (2020) 38:1126–37. doi: 10.1200/JCO.19.01740
- Rosiñol L, Cibeira MT, Montoto S, Rozman M, Esteve J, Filella X, et al. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: Predictors of Malignant Transformation and Recognition of an Evolving Type Characterized by a Progressive Increase in M Protein Size. *Mayo Clinic Proc* (2007) 82. doi: 10.4065/82.4.428
- Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- γ -Related mRNA Profile Predicts Clinical Response to PD-1 Blockade. *J Clin Invest* (2017) 127(8):2930–40. doi: 10.1172/JCI91190
- Auslander N, Zhang G, Lee JS, Frederick DT, Miao B, Moll T, et al. Robust Prediction of Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Metastatic Melanoma. *Nat Med* (2018) 24:1545–9. doi: 10.1038/s41591-018-0157-9
- Merz M, Hielscher T, Schult D, Mai EK, Raab MS, Hillengass J, et al. Cytogenetic Subclone Formation and Evolution in Progressive Smoldering Multiple Myeloma. *Leukemia* (2020) 34:1192–6. doi: 10.1038/s41375-019-0634-2
- López-Corral L, Mateos MV, Corchete LA, Sarasquete ME, de la Rubia J, de Arriba F, et al. Genomic Analysis of High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *Haematologica* (2012) 97:1439–43. doi: 10.3324/haematol.2011.060780
- Bolli N, Maura F, Minvielle S, Glaznik D, Szalat R, Fullam A, et al. Genomic Patterns of Progression in Smoldering Multiple Myeloma. *Nat Commun* (2018) 9:3363. doi: 10.1038/s41467-018-05058-y
- Dutta AK, Fink JL, Grady JP, Morgan GJ, Mullighan CG, To LB, et al. Subclonal Evolution in Disease Progression From MGUS/SMM to Multiple Myeloma Is Characterised by Clonal Stability. *Leukemia* (2019) 33:457–68. doi: 10.1038/s41375-018-0206-x
- Bustoros M, Sklaventis-Pistofidis R, Park J, Redd R, Zhitomirsky B, Dunford AJ, et al. Genomic Profiling of Smoldering Multiple Myeloma Identifies Patients at a High Risk of Disease Progression. *J Clin Oncol* (2020) 38(21):2380–9. doi: 10.1200/JCO.20.00437

19. Dosani T, Carlsten M, Maric I, Landgren O. The Cellular Immune System in Myelomagenesis: NK Cells and T Cells in the Development of Myeloma [Corrected] and Their Uses in Immunotherapies. *Blood Cancer J* (2015) 5: e306. doi: 10.1038/bcj.2015.32
20. Bailur JK, McCachren SS, Doxie DB, Shrestha M, Pendleton K, Nooka AK, et al. Early Alterations in Stem-Like/Marrow-Resident T Cells and Innate and Myeloid Cells in Preneoplastic Gammopathy. *JCI Insight* (2019) 4(11): e127807. doi: 10.1172/jci.insight.127807
21. Paiva B, Mateos MV, Sanchez-Abarca LI, Puig N, Vidriales MB, López-Corral L, et al. Immune Status of High-Risk Smoldering Multiple Myeloma Patients and its Therapeutic Modulation Under Lenex: A Longitudinal Analysis. *Blood* (2016) 127(9):1151–62. doi: 10.1182/blood-2015-10-662320
22. McCachren SS, Dhodapkar KM, Dhodapkar MV. Co-Evolution of Immune Response in Multiple Myeloma: Implications for Immune Prevention. *Front Immunol* (2021) 12:632564. doi: 10.3389/fimmu.2021.632564
23. Zelle-Rieser C, Thangavadivel S, Biedermann R, Brunner A, Stoitzner P, Willenbacher E, et al. T Cells in Multiple Myeloma Display Features of Exhaustion and Senescence at the Tumor Site. *J Hematol Oncol* (2016) 9:116. doi: 10.1186/s13045-016-0345-3
24. Zavidij O, Haradhvala NJ, Mouhieddine TH, Sklaventis-Pistofidis R, Cai S, Reidy M, et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals Compromised Immune Microenvironment in Precursor Stages of Multiple Myeloma. *Nat Cancer* (2020) 1:493–506. doi: 10.1038/s43018-020-0053-3
25. Mateos MV, Orłowski RZ, Ocio EM, Rodríguez-Otero P, Reece D, Moreau P, et al. Pembrolizumab Combined With Lenalidomide and Low-Dose Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Phase I KEYNOTE-023 Study. *Br J Haematol* (2019) 186(5):e117–21. doi: 10.1111/bjh.15946
26. Manasanch EE, Han G, Mathur R, Qing Y, Zhang Z, Lee H, et al. A Pilot Study of Pembrolizumab in Smoldering Myeloma: Report of the Clinical, Immune, and Genomic Analysis. *Blood Adv* (2019) 3(15):2400–8. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000300
27. Chauvin JM, Zarour HM. TIGIT in Cancer Immunotherapy. *J Immuno Ther Cancer* (2020) 8:e000957. doi: 10.1136/jitc-2020-000957
28. Blake SJ, Dougall WC, Miles JJ, Teng MWL, Smyth MJ. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* (2016) 22(21):5183–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0933
29. Lozano E, Mena MP, Diaz T, Martin-Antonio B, Leon S, Rodríguez-Lobato LG, et al. Nectin-2 Expression on Malignant Plasma Cells is Associated With Better Response to TIGIT Blockade in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* (2020) 26(17):4688–98. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3673
30. D'Souza C, Prince HM, Neeson PJ. Understanding the Role of T-Cells in the Antimyeloma Effect of Immunomodulatory Drugs. *Front Immunol* (2021) 12:632399. doi: 10.3389/fimmu.2021.632399
31. van de Donk NWCJ, Usmani SZ. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front Immunol* (2018) 9:2134. doi: 10.3389/fimmu.2018.02134
32. Lejeune M, Köse MC, Duray E, Einsele H, Beguin Y, Caers J. Bispecific, T-Cell-Recruiting Antibodies in B-Cell Malignancies. *Front Immunol* (2020) 11:762. doi: 10.3389/fimmu.2020.00762
33. Shah N, Aiello J, Avigan DE, Berdeja JG, Borrello IM, Chari A, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer Consensus Statement on Immunotherapy for the Treatment of Multiple Myeloma. *J ImmunoTher Cancer* (2020) 8:e000734. doi: 10.1136/jitc-2020-000734

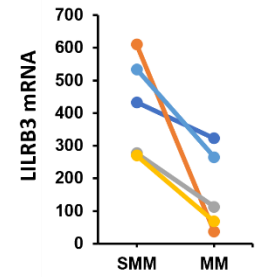
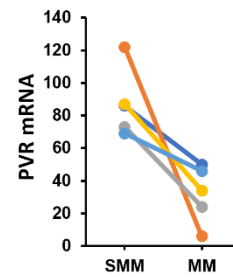
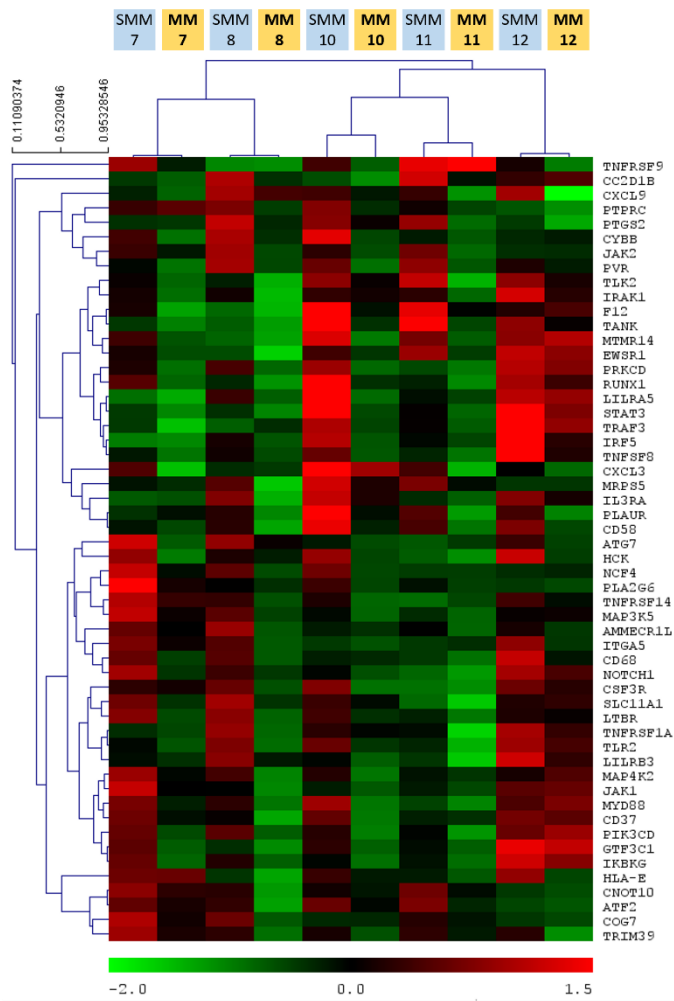
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Isola, Brasó-Maristany, Moreno, Mena, Oliver-Calders, Paré, Rodríguez-Lobato, Martin-Antonio, Cibeira, Bladé, Rosiñol, Prat, Lozano and Fernández de Larrea. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

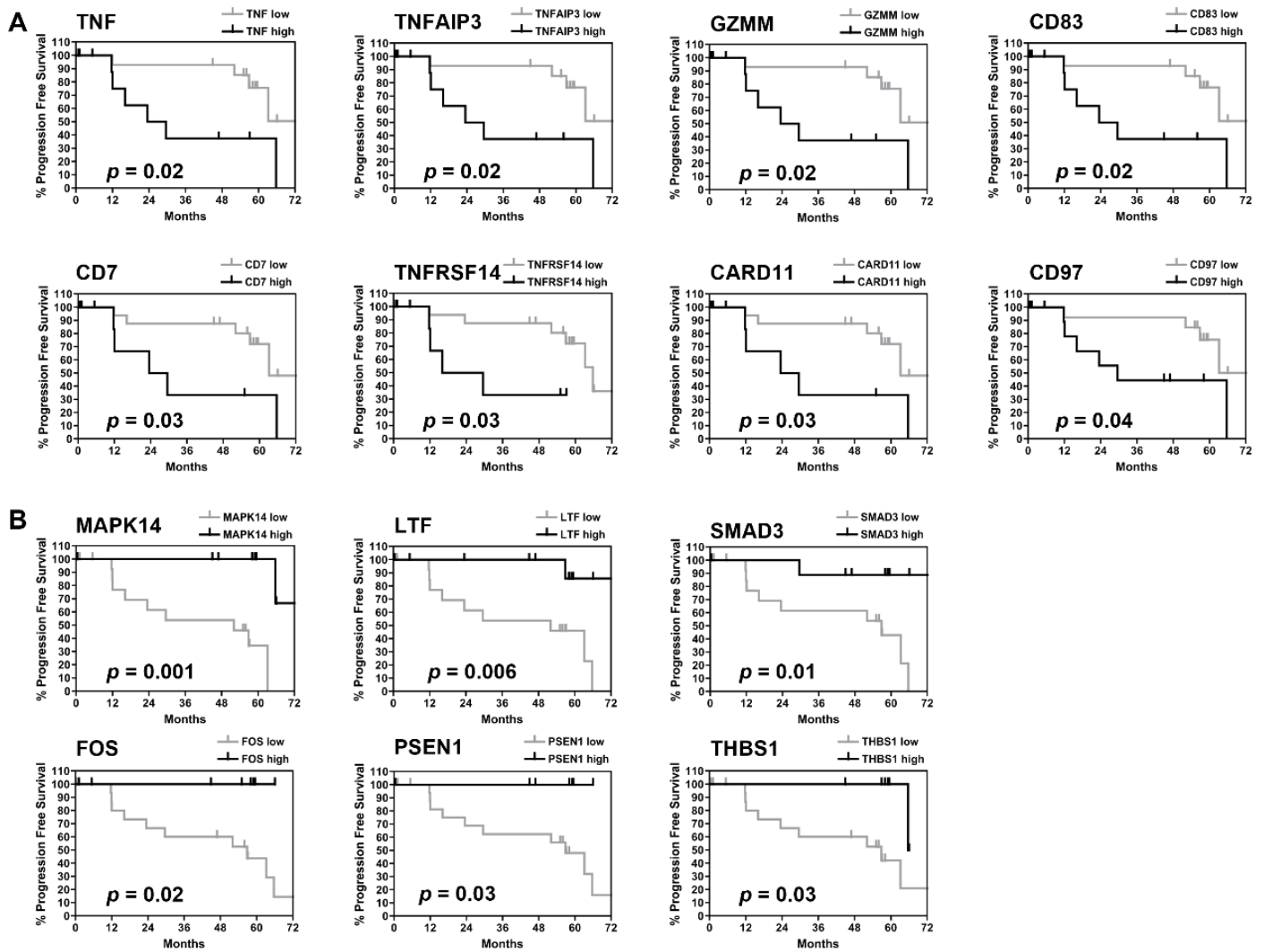
Supplementary Table 1

CD8 T cells	<i>PRF1,</i> <i>CD8A,</i> <i>GZMM,</i> <i>CD8B,</i> <i>FLT3LG</i>
Cytotoxic cells	<i>KLRK1,</i> <i>GZMH,</i> <i>KLRB1,</i> <i>KLRD1,</i> <i>GZMA</i>
Dendritic cells (DC)	<i>CD1E,</i> <i>CD1B,</i> <i>CCL17,</i> <i>CCL22,</i> <i>CD1A</i>
Regulatory T cells (Tregs)	<i>FOXP3</i>
Th2 cells	<i>PMCH</i>
CD4 activated cells	<i>ATF2,</i> <i>NUP107</i>
NK cells	<i>SPN,</i> <i>XCL2,</i> <i>NCR1</i>
Th1 cells	<i>CTLA4,</i> <i>LTA,</i> <i>CD38,</i> <i>IFNG,</i> <i>CD38,</i> <i>CCL4</i>
T cells	<i>CD3G,</i> <i>CD96,</i> <i>SH2D1A,</i> <i>CD6,</i> <i>CD3D,</i> <i>LCK, CD2,</i> <i>CD3E</i>
TIS	<i>CD3D,</i> <i>IDO1,</i> <i>CIITA,</i> <i>CD3E,</i> <i>CCL5,</i> <i>GZMK,</i> <i>CD2, HLA-</i> <i>DRA,</i> <i>CXCL13,</i> <i>IL2RG,</i> <i>NKG7,</i> <i>HLA-E,</i> <i>CXCR6,</i> <i>LAG3,</i> <i>TAGAP,</i> <i>CXCL10,</i> <i>STAT1,</i> <i>GZMB</i>
Cytolytic score	<i>GZMA,</i> <i>GZMH,</i> <i>GZMM,</i> <i>PRF1,</i> <i>GNLY</i>



Supplementary Figure S1

Supplementary Figure 1 | Genes upregulated in 5 patients with SMM compared to their gene profile after progression to symptomatic MM (A) Heatmap showing the unsupervised hierarchical clustering of 5 patients before and after progression. (B) Expression of ITIM-bearing receptors, poliovirus receptor (PVR) and leukocyte immunoglobulin like receptor B3 (LILRB3) before and after progression.



Supplementary Figure S2

Supplementary Figure 2 | Analysis of progression free survival *versus* genes differentially expressed in patients with SMM. **(A)** Kaplan-Maier plot showing progression free survival (PFS) of patients ($n=28$) *versus* indicated genes. Upregulation of TNF superfamily members were associated to shorter PFS. Long-rank test p values are indicated. **(B)** High expression of genes such as MAPK14, Thrombospondin 1 (*THBS1*), transcription factor FOS and SMAD3 were associated to longer PFS. Long-rank test p values are indicated.

Discusión

El mieloma quiescente (MQ) afecta a aproximadamente al 0,5% de la población mayor de 40 años, y representa el 15% de todos los casos de MM de reciente diagnóstico²³⁷. Se trata de una condición asintomática que se posiciona entre la GMSI y el MM, en el espectro de los trastornos proliferativos de células plasmáticas clonales. La distinción clínica entre la GMSI y el MQ es importante porque el riesgo de progresión del MQ es 10 veces mayor que el de la GMSI en los primeros 5 años tras el diagnóstico. El MQ progresa a MM con una tasa de 10% anual durante los primeros 5 años, 3% anual durante los 5 años siguientes, y 1,5% anual a partir de los 10 años⁶. El reconocimiento de un riesgo de progresión que decrece con el tiempo, junto con otros descubrimientos relacionados a la fisiopatogenia de las gammapatías, ha llevado a comprender que el MQ constituye una entidad heterogénea y clínicamente definida, y no un verdadero estadio biológico intermedio entre la GMSI y el MM.

El fenómeno de transformación inicial en las gammapatías resulta en un clon “fundador” (hiperdiploidía / reordenamiento de *IgH*), que transita las fases premalignas adquiriendo cambios genéticos adicionales que le otorgan ventajas de crecimiento y supervivencia antes de manifestarse clínicamente como MM, y que determinan la aparición de distintos subclones. Estudios recientes han demostrado que aproximadamente la mitad de los pacientes con MQ progresan a MM sin adquirir nuevas alteraciones genéticas, mientras que la otra mitad adquieren nuevas alteraciones que determinan la conversión a MM²¹³. Esto significaría que algunos de los pacientes actualmente considerados como MQ serían en realidad, por lo menos genómicamente, un MM de nuevo diagnóstico. De esta manera, la definición actual de MQ englobaría a pacientes con una condición pre-neoplásica (GMSI biológica) y otros con una verdadera neoplasia (MM biológico). Este concepto significó un verdadero cambio de paradigma, y en los últimos años constituye una transformación en el enfoque diagnóstico/terapéutico de esta enfermedad.

Una de las metas actuales más importantes consiste en identificar a aquellos pacientes con MQ en los que ya ha ocurrido la transformación neoplásica (biológicamente

similares a un MM) y que son los que clasificaríamos como “MQ de alto riesgo”, con una tasa de progresión a enfermedad sintomática $\geq 50\%$ dentro de los dos años desde el diagnóstico¹⁸². Este grupo es el que podría beneficiarse, como sugiere la evidencia más reciente, de un tratamiento precoz. Actualmente contamos con varios modelos para la estratificación del riesgo en el MQ, pero no son perfectos, como lo demuestra la poca concordancia existente entre ellos¹⁸⁷. La poca sensibilidad asociada a estos modelos hace que cada uno capture solo una proporción de los pacientes con “MQ de alto riesgo” y, de manera inversa, no todos los pacientes catalogados de “alto riesgo” terminan progresando a MM. En definitiva, existe margen para la optimización de estos modelos.

Una de las principales limitaciones de los modelos de riesgo más utilizados actualmente, como el modelo 2/20/20 del IMWG¹⁸², es el hecho de que se basan en la evaluación de la carga tumoral del paciente en un único punto (al momento del diagnóstico), asumiendo que el riesgo de progresión del MQ se mantiene estable con el tiempo. Por otro lado, tampoco toman en cuenta el comportamiento biológico de la enfermedad. Una ventaja hipotética de la evaluación dinámica de los marcadores de carga tumoral en los pacientes con MQ sería, por un lado, poner en evidencia pacientes con diferente comportamiento biológico y, por otro, identificar cambios en el riesgo a la progresión que puedan estar determinados por la adquisición de nuevas alteraciones genéticas.

La idea de utilizar evaluaciones seriadas para identificar un comportamiento *evolving* de parámetros relacionados con el riesgo de progresión fue inicialmente descrita por Rosiñol *et al.* en el año 2003²⁰³. Se estudió retrospectivamente una cohorte de 53 pacientes con MQ diagnosticados según los criterios de Kyle & Greipp de 1980, previos al consenso del IMWG, y se identificaron dos grupos de pacientes: (i) el grupo *evolving* caracterizado por un incremento progresivo del CMs en cada una de las visitas consecutivas posteriores al diagnóstico y (ii) el grupo *no evolving*, que presentó un CMs constante hasta el momento de la progresión. La mayor parte de los pacientes con un comportamiento *evolving* presentaron un incremento $\geq 10\%$ durante los primeros meses de seguimiento, y más del 50% tenían el antecedente de una GMSI también con un comportamiento *evolving*. Por el contrario, el antecedente de una GMSI resultó excepcional en el grupo *no evolving*. El comportamiento *evolving* fue el único predictor

significativo de progresión en esta serie, con una mediana de tiempo a la progresión significativamente más corta con respecto a los pacientes *no evolving*. Este subtipo de MQ se correlacionó con un patrón particular de anormalidades genéticas, con alteraciones descritas en pacientes con MM de reciente diagnóstico (mayor frecuencia de pérdidas cromosómicas y ganancias de 1q). Estos hallazgos llevaron a los autores a teorizar que los dos grupos corresponderían a mecanismos patogénicos diferentes: el grupo *evolving* representaría una enfermedad biológicamente más agresiva en la que el MQ no es más que un estadio intermedio y transitorio en la evolución de GMSI a MM, y el grupo *no evolving* sería comparable a una GMSI, pero con una mayor carga clonal. El subtipo *evolving* también fue descrito por el mismo grupo en un 8% de 359 pacientes con GMSI, definido como un incremento progresivo del CMs en cada una de las visitas consecutivas durante un período de 3 años²³⁸. El comportamiento *evolving* resultó el factor de riesgo más importante para la progresión a enfermedad sintomática, con un riesgo relativo mucho mayor que los marcadores de carga tumoral (CMs y porcentaje de infiltración medular por células plasmáticas -BMPC-).

En el primer trabajo de esta tesis confirmamos el impacto pronóstico del comportamiento *evolving* (definido como un aumento del CMs $\geq 10\%$ en los primeros 12 meses desde el diagnóstico si el CMs basal era ≥ 3 g/dL o en los primeros 3 años si el CMs basal era < 3 g/dL) en la probabilidad de progresión a enfermedad sintomática, en una serie amplia de pacientes con MQ diagnosticados de acuerdo a los criterios actualizados por el IMWG en el 2003. En el análisis multivariado, el comportamiento *evolving* resultó ser el factor de riesgo de progresión más potente, con un *hazard ratio* superior al correspondiente a otros factores de riesgo más reconocidos, como el tamaño del CMs, el porcentaje de BMPC y la presencia de inmunoparesia.

Una de las ventajas de este modelo es el análisis del comportamiento *evolving* como una variable tiempo dependiente, lo que nos permitió constatar que los tres factores de riesgo clásicamente utilizados (CMs, BMPC, inmunoparesia), de importancia al momento del diagnóstico, dejaron de tener significancia pronóstica una vez confirmado el comportamiento *evolving*, momento en el que este factor se constituye como la única variable relevante. El mal pronóstico demostrado por los pacientes con comportamiento

evolving en nuestro estudio podría indicar que, en el momento de constatarse el mismo, ya están en juego los mecanismos patogénicos característicos del MM. Los pacientes con un comportamiento *no evolving*, al igual que los pacientes con GMSI, necesitarían un segundo evento oncogénico para iniciar la transformación maligna. Es interesante que, en nuestro estudio, el impacto ominoso del comportamiento *evolving* se mantuvo aún tras la progresión a enfermedad sintomática, siendo la supervivencia luego de la progresión significativamente menor en aquellos pacientes que presentaban una fase *evolving* previa. Esto apoyaría la existencia de procesos biológicos específicos en este subgrupo de pacientes.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones importantes. En primer lugar, se describen una de las series más grandes publicadas, con un seguimiento largo, pero este hecho implicó que los pacientes estuvieran diagnosticados de acuerdo a los criterios del IMWG del 2003. Es posible, por este motivo, que algunos pacientes hubiesen cumplido los recientemente definidos criterios “SLiM” de MM (BMPC \geq 60%, FLCr \geq 100 o $>$ 1 lesión focal en un estudio de RMN)¹⁴. Dos estudios evaluaron el impacto pronóstico de los cambios evolutivos en el CMs y en la Hb, utilizando los criterios diagnósticos del IMWG del 2014. El primero de ellos confirmó el valor pronóstico de los cambios evolutivos en ambos parámetros, pero el aparente enriquecimiento de esta cohorte en pacientes con MQ de alto riesgo (más del 70% de los pacientes progresaron a MM durante el período del estudio, y más de 30% lo hicieron dentro de los dos años tras el diagnóstico) limita la validez de los resultados²⁰⁴. El segundo estudio confirmó el valor pronóstico de los cambios evolutivos en el CMs, pero con tasas de progresión mucho más bajas que en el estudio anterior²⁰⁵. Los hallazgos de este estudio se ven comprometidos, sin embargo, por el tamaño pequeño de la cohorte y, particularmente, por el reducido número de pacientes con MQ de alto riesgo.

La segunda limitación importante de nuestro estudio radica en la definición del comportamiento *evolving* en términos relativos (% del CMs basal). La ausencia de un requerimiento mínimo en términos absolutos del aumento del CMs podría determinar que pacientes con un CMs basal muy bajo necesitaran un incremento muy pequeño para ser considerados como *evolving*, disminuyendo la especificidad del criterio. En nuestro

caso, los pacientes con CMs basal <30 g/L necesitaban, además, que el incremento fuese progresivo a lo largo de tres años. Otros grupos han establecido un incremento mínimo absoluto de 5 g/L. Al mismo tiempo, estas diferencias en los criterios establecidos por los diferentes grupos para definir a los pacientes *evolving* o de *alto riesgo*, constituyen una de las principales limitaciones de cara a la validación y a la utilización clínica de este parámetro como factor de riesgo para la progresión a enfermedad sintomática.

Estudios futuros deberán evaluar el impacto pronóstico de cambios dinámicos en otros parámetros asociados al riesgo de progresión, además de los ya estudiados (CMs o Hb), como las cadenas ligeras libres en suero (FLC) o las células plasmáticas circulantes. Es también importante que se desarrollen proyectos para describir las anormalidades genéticas, epigenéticas y del microambiente que caracterizan a los pacientes con comportamiento *evolving*, poniendo de manifiesto así las diferencias biológicas que los caracterizan. Para permitir la utilización del comportamiento *evolving* en la estratificación de los pacientes, es imprescindible un consenso en los puntos de corte que diferencien a los pacientes de alto riesgo. Una vez consensuada una definición, esta debe ser validada utilizando los criterios diagnósticos actualizados del IMWG, idealmente en un registro internacional. De esta manera, el comportamiento *evolving* podría ser añadido a los modelos actualmente utilizados en la clínica (score 2/20/20).

La inmunoparesia (IP) “clásica”, definida como la disminución de las inmunoglobulinas (Ig) de un isotipo diferente al del componente monoclonal de origen tumoral, es otro factor asociado clásicamente al pronóstico de las gammapatías, reflejando la supresión de las células plasmáticas normales por el clon tumoral. En el caso del MM, la presencia de inmunoparesia clásica es prácticamente la norma al momento del diagnóstico, y tanto su presencia como su gravedad han demostrado tener valor pronóstico²³⁹. De la misma manera, la existencia de inmunoparesia clásica se ha asociado con un mayor riesgo de progresión en el caso de la GMSI²⁴⁰ y del MQ¹⁸⁶.

Hevylite® es un inmunoensayo que detecta específicamente los diferentes pares de cadenas ligera/pesada (HLC: IgGκ/IgGλ, IgAκ/IgAλ, IgMκ/IgMλ). Su reciente introducción ha permitido evaluar el efecto supresor del clon maligno en el par HLC del mismo isotipo

(e.g. cuantificación de IgG λ en un paciente con una gammapatía IgG κ), lo que permitió el estudio de un nuevo tipo de inmunoparesia (IP): la inmunoparesia “isotipo específica” (IMI, “*isotype-matched immunoparesis*”). Al igual que ocurre con la IP clásica, la presencia y gravedad de la IMI ha sido asociada con un peor pronóstico en pacientes con MM de reciente diagnóstico y en recaída²⁴¹. En el caso de la GMSI, un tercio de los pacientes presentaron IMI en la cohorte evaluada por el grupo de la *Mayo Clinic*, y este hallazgo demostró ser un factor de riesgo independiente para la progresión en el análisis multivariado, mejorando el poder discriminatorio del modelo de estratificación previamente utilizado para identificar a pacientes con GMSI de alto riesgo²⁴². La prevalencia de IMI fue mayor (51%) en la cohorte de Jimenez *et al.*, y también se asoció a un mayor riesgo de progresión a enfermedad sintomática, a diferencia de la IP clásica²⁴³. Espiño *et al.* evaluaron el cociente iHLC/uHLC (par HLC clonal / par HLC no clonal del mismo isotipo) en pacientes con GMSI y encontraron que todos aquellos que progresaron presentaban un cociente > 9.5, y que este valor también se correlacionaba con la presencia de un comportamiento *evolving*²⁴⁴.

Existe menos información sobre la IMI en el contexto del MQ. En una serie prospectiva de 50 pacientes con MQ, la IMI resultó más prevalente que la IP clásica (estaba presente en un 44% de los pacientes sin IP clásica) y se asoció a otros factores de riesgo para la progresión²⁴⁵. En una serie pequeña de pacientes con GMSI y MQ IgG estudiada en nuestro centro, la supresión de HLC de distinto isotipo (IgA κ , IgA λ , IgM κ , IgM λ) se asoció significativamente a un menor tiempo de progresión a enfermedad sintomática²⁴⁶.

El segundo trabajo de esta tesis es el primero en analizar de manera prospectiva, mediante el ensayo Hevylite[®], el grado de supresión de los pares de cadena pesada/ligera (pares HLC) de diferentes isotipos en pacientes con MQ. La alta prevalencia de IMI en nuestra serie concuerda con la descrita en las dos series previas^{245,246}. Un hallazgo inesperado fue la menor prevalencia de supresión grave de los pares de HLC de isotipos no involucrados (casi siempre acompañada de IMI grave) y los significativamente menores niveles de HLC del isotipo involucrado en comparación con los pares HLC de isotipos no involucrados. La mayor prevalencia de la IMI en relación a la IP clásica ha sido descrita en pacientes con GMSI y se había atribuido a la mayor

sensibilidad del ensayo Hevylite® con respecto a la cuantificación de las Ig totales. Los resultados de nuestro estudio parecen sugerir, sin embargo, una especificidad de isotipo en los mecanismos involucrados en la supresión de las Ig policlonales.

Los mecanismos responsables de la inmunoparesia en las gammapatías no han sido aclarados. La disminución de las Ig policlonales se ha relacionado con la reducción en el número de CP policlonales a nivel medular y, en consecuencia, con la carga tumoral. Este fenómeno, más acentuado a medida que se profundiza la carga de la enfermedad, estaría relacionado con la competición por los nichos estromales de las CP normales policlonales con las CP clonales. Sin embargo, ambos parámetros (inmunoparesia y % de CP policlonales en MO) parecen relacionarse de forma independiente con un peor pronóstico^{247,248}. Este mecanismo tampoco explicaría la disminución de IgM policlonal, derivada predominantemente de CP residentes en órganos linfoides secundarios y no en la MO, ni la aparente especificidad de isotipo evidenciada en nuestra serie.

Wang y Young fueron los primeros en reportar un mecanismo de supresión isotipo específico en pacientes con gammapatías IgG²⁴⁹. Estos autores determinaron la concentración de Ig policlonal al restar la cantidad correspondiente al CMs de la fracción gamma obtenida por electroforesis, y encontraron una mayor reducción de los niveles de Ig policlonales (predominantemente IgG) en los pacientes con gammapatías IgG, con respecto a los pacientes con gammapatías IgA e IgM. La ausencia de correlación entre los niveles de CMs y la Ig policlonal los llevaron a descartar un mecanismo de retroalimentación negativo dependiente únicamente del aumento en el catabolismo de las IgG. Un mecanismo isotipo específico de supresión de Ig también es apoyado por estudios en modelos murinos con plasmocitomas, en los que se encontró un aumento de los linfocitos T con receptores específicos para el isotipo del CM secretado por el plasmocitoma. De la misma manera, la inyección de IgA incrementó los linfocitos T con receptores para IgA^{250,251}. Los linfocitos T reguladores (Tregs), capaces de inhibir las respuestas citotóxicas antitumorales y relacionados con el pronóstico en varios cánceres, podrían inhibir la síntesis y secreción de Ig de una manera isotipo específica. Los Tregs se han asociado con una disminución en el número de CP policlonales en el MM, así como con otros factores de mal pronóstico^{252,253}. Estos mecanismos podrían, sin embargo, no

ser específicos de las gammapatías y jugar un papel en el control normal de la producción de anticuerpos.

En nuestro estudio, una disminución importante en los niveles de pares HLC de diferente isotipo estuvo casi siempre acompañada por IMI grave. Por el contrario, un 41% de los pacientes con IMI grave no presentaban disminución crítica de los niveles de HLC de diferente isotipo. Mediante la plataforma nCounter nos fue posible analizar el perfil inmune de la fracción CD138 negativa de pacientes con IMI grave y pacientes con IMI grave y supresión grave de HLC de diferente isotipo. Estos últimos demostraron un aumento significativo en la expresión de genes relacionados con linfocitos T CD8+, linfocitos Th1 y funciones efectoras citolíticas, así como también de *immune-checkpoints* asociados con disfunción/agotamiento de los linfocitos T. Si bien el análisis se limitó a un número muy reducido de pacientes y los resultados requieren confirmación, los hallazgos podrían sugerir mecanismos supresores diferentes asociados a los diferentes tipos de inmunoparesia.

El fenómeno de inmunoparesia también ha sido descrito en pacientes con gammapatías de cadenas ligeras y en MM no secretor, por lo que mecanismos independientes de la región Fc del CMs estarían involucrados²³⁹. La supresión de los niveles de IgM, por su parte, supondría la afectación de las CP policlonales residentes en los órganos linfoides secundarios y distantes de la MO. Los pacientes con MM presentan niveles elevados de BCMA soluble, aún más altos en el caso de pacientes con enfermedad avanzada. Esta forma solubilizada del receptor se une al BAFF, secuestrándolo e impidiendo su unión a sus receptores de membrana en la célula B, bloqueando su desarrollo tardío y la producción de anticuerpos. La inyección de BCMA soluble en modelos murinos inmunocompetentes determinó la reducción de los niveles de Ig y se ha demostrado una relación inversa entre los niveles séricos de BCMA y los niveles de Ig policlonales en los pacientes con MM. De esta manera, el fenómeno de inmunoparesia estaría mediado, por lo menos en parte, por la unión del BCMA soluble al BAFF^{254,255}. Si bien no fue posible realizarlo en nuestro estudio, sería interesante correlacionar niveles de BCMA circulante en sangre con los distintos tipos de inmunoparesia estudiados mediante el ensayo Hevylite®.

En nuestra serie de pacientes con MQ, la presencia de IMI grave se asoció con la presencia de otros factores de riesgo para la progresión a enfermedad sintomática y con un tiempo a la progresión más corto. Este hallazgo es similar al previamente descrito tanto en pacientes con GMSI^{242,243} como en pacientes con MM de nuevo diagnóstico y en recaída^{241,256}. Resulta interesante la observación de que dos de los tres pacientes que progresaron a MM y que no mostraban IMI grave al momento del diagnóstico, presentaron una disminución significativa de los niveles de la Ig policlonal del mismo isotipo al acercarse el momento de la progresión. Este hallazgo sugiere un valor de los cambios evolutivos del par HLC del isotipo involucrado como posible marcador pronóstico que será interesante evaluar en un número más elevado de pacientes.

Con respecto al valor pronóstico de la inmunoparesia de los isotipos no involucrados, los pacientes que presentaron supresión grave se caracterizaron por un perfil de riesgo a la progresión aún más adverso que los pacientes que presentaban únicamente IMI grave. La supresión grave de los pares HLC de IgM se asoció además a un tiempo a la progresión más corto. Este hallazgo es similar al descrito previamente por nuestro grupo en una serie de pacientes con GMSI/MQ²⁴⁶. La inmunoparesia de IgM también ha demostrado asociarse a una disminución significativa y proporcional al grado de supresión en la PFS y OS de los pacientes con MM^{239,256}. Se ha hipotetizado que la inmunoparesia de IgM afecta la supervivencia de los pacientes con MM a través de la reducción de la vigilancia inmune, con el consecuente aumento de la susceptibilidad a infecciones, estando al mismo tiempo asociada con una enfermedad biológicamente más agresiva. Esto último parece estar apoyado por la mayor tasa de progresión en pacientes con MQ evidenciada en nuestro estudio.

Por tanto, la utilización del ensayo Hevylite® en una serie de pacientes con MQ permitió evidenciar la mayor prevalencia de IMI grave con respecto a la inmunoparesia de los isotipos no involucrados, así como valores proporcionalmente más bajos de pares HLC del isotipo involucrado. Ambos hallazgos sugieren una especificidad de isotipo en los mecanismos de inmunosupresión, al menos en estadios iniciales. La asociación de la inmunoparesia de los isotipos no involucrados con un perfil de mayor riesgo podría

sugerir la presencia de diferentes mecanismos de supresión. Esto es particularmente notorio en el caso de la inmunoparesia de IgM, relacionada a un tiempo de progresión significativamente más corto.

La investigación de los mecanismos involucrados en la progresión a MM de los pacientes con MQ se ha focalizado en las características de las células neoplásicas, incluyendo el estudio de sus aberraciones cromosómicas, perfiles de expresión génica y secuenciación del exoma. Los estudios genómicos han demostrado que los clones presentes en el estadio de GMSI/MQ ya muestran las alteraciones definitorias de MM (translocaciones de *IgH* o hiperdiploidía) y que la progresión involucra la adquisición de segundos *hits* como translocaciones de *MYC*, ganancias de 1q o mutaciones de *TP53*⁴². Sin embargo, no todos los pacientes con GMSI/MQ y un perfil genético similar muestran la misma evolución clínica, sugiriendo que alteraciones no genómicas juegan un papel en la progresión a enfermedad sintomática. Ya en otros tumores se han relacionado las diferencias en los componentes inmunes y estromales a diferencias en el pronóstico y la respuesta al tratamiento. En el caso del MM, el microambiente medular ha demostrado influir en la diferenciación, proliferación y supervivencia de las CP clonales²⁵⁷.

Estudios previos han demostrado que el microambiente en los pacientes con MM presenta desregulación en la señalización mediada por receptores y en la expresión de citoquinas, así como alteraciones cuantitativas y cualitativas de las células inmunes, mesenquimales y dendríticas. El MM induce un estado de inmunosupresión caracterizado por la expansión de linfocitos Tregs, células mieloides supresoras y macrófagos asociados al tumor, así como por disfunción de los linfocitos T y NK^{258,259}. Las alteraciones del microambiente en el MM se asocian con la reducción en la respuesta inmune antitumoral, inducción de la angiogénesis, resistencia a la quimioterapia y progresión^{127,128,260}.

Un estudio del grupo del *Dana Farber Cancer Institute* fue de los primeros en analizar el microambiente inmune de pacientes con GMSI, MQ y MM frente a controles sanos mediante *single-cell RNA-seq*¹⁷⁹. Este grupo demostró cambios en el microambiente evidenciables desde el estadio de GMSI. Se observó un enriquecimiento de linfocitos NK y monocitos no clásicos, con una disminución de las células dendríticas plasmocitoides. A

partir del estadio de MQ, el compartimento citotóxico mostró una pérdida de los linfocitos T de memoria con una diferenciación de dicho compartimento hacia elementos efectoros con expresión de granzima B y H. También se evidenciaron cambios funcionales, como una pérdida de MHC de clase II por parte de los monocitos/macrófagos, que adquieren de esa manera actividad inmunosupresora. Sin embargo, los hallazgos se distribuyeron de manera heterogénea y los autores no fueron capaces de identificar cambios consistentemente asociados a los diferentes estadios de la enfermedad. Shinke *et al.* también estudiaron el microambiente inmune mediante *RNAseq* y combinaron sus datos con los del estudio previo para lograr un total de 12 pacientes con GMSI, 18 con MQ y 18 con MM²⁶¹. De manera similar, los resultados se caracterizaron por una notable heterogeneidad entre los pacientes. La respuesta inmune antitumoral demostró una reducción desde el estadio de GMSI al de MM, con una disminución de los linfocitos CD4 *naive* y de memoria, junto con un aumento de los linfocitos T reguladores y las células efectoras CD8. Los linfocitos T CD4 tienen una actividad crucial en el desarrollo y mantenimiento de la inmunidad efectiva antitumoral, mediante la activación y mantenimiento de los linfocitos T CD8 citotóxicos, la secreción de citoquinas y la citotoxicidad directa contra las células tumorales. Los linfocitos CD8 citotóxicos fueron el único grupo celular que mostró un incremento significativo entre los estadios de GMSI y MM, en particular el subtipo caracterizado por una expresión elevada de *GZMH*, *CCL3*, *CCL4* y *XCL2*. Este patrón de expresión se asocia con linfocitos CD8 intratumorales con una expresión elevada de receptores inhibidores y una asociación con la proliferación tumoral en otros tipos de cáncer²⁶². Marcadores de agotamiento también se encontraron sobreexpresados en esta subpoblación, un hallazgo importante dada la disponibilidad terapéutica actual de antagonistas de *checkpoints* inhibidores.

En este sentido, en el tercer trabajo se investigó el compartimento inmune en la médula ósea de pacientes con MQ, buscando identificar mecanismos involucrados en la supervivencia de las células plasmáticas clonales y la progresión a enfermedad sintomática. Para ello, analizamos la expresión génica utilizando el sistema nCounter™ en muestras de MO de pacientes con MQ, GMSI y MM sintomático. A nuestro entender, este estudio constituye la serie más grande en analizar la expresión génica del microambiente tumoral de pacientes con MQ, incluyendo además muestras pareadas de 5 pacientes en

el estadio de MQ y en el momento de la progresión a MM. Este trabajo, además, relaciona los hallazgos con otros factores de riesgo utilizados en la práctica clínica habitual para establecer el riesgo de progresión a MM de los pacientes con MQ, incluyendo el comportamiento *evolving* previamente descrito.

Los resultados de nuestro estudio mostraron una mayor expresión de genes asociados con citotoxicidad en los pacientes con MQ, comparado tanto al grupo de GMSI como al de MM. Estos genes se asociaron con la expresión de los factores de transcripción *Tbet* y *Eomes*, así como con otros genes importantes para la función de los linfocitos T y los linfocitos NK. Sin embargo, también encontramos una mayor expresión de moléculas inhibitorias (*LAG-3*, *TIGIT* e *IDO1*), lo que podría indicar un fenotipo exhausto en el compartimento citotóxico y explicar la inefectividad de la respuesta inmune.

En concordancia con lo descrito en otras series, los pacientes con MQ de nuestro estudio mostraron una marcada heterogeneidad, explicando en parte las diferencias en su evolución clínica. El análisis de los perfiles de expresión génica nos permitió identificar 4 grupos con diferencias significativas. El grupo número 2 se caracterizó por una mayor expresión de moléculas asociadas con linfocitos T/NK y señalización de IFN. El análisis de los perfiles asociados con subtipos celulares específicos demostró, en este grupo, niveles más altos de transcritos asociados con células citotóxicas, así como también un score TIS (que contiene genes relacionados con IFN-gamma y activación de linfocitos T) más elevado. A pesar de mostrar un perfil sugestivo de una fuerte respuesta citotóxica, los pacientes del grupo 2 también se caracterizaron por una mayor expresión de *checkpoints* inhibidores. La mayor parte de los genes que mostraron una mayor expresión en los pacientes con MQ frente a aquellos con GMSI, también mostraron una mayor expresión en el grupo 2, al ser comparado al otro grupo mayoritario (grupo 3), que parecería corresponder a un perfil inmune más similar al de una gammapatía de bajo riesgo. El análisis de los parámetros clínicos asociados con el riesgo de progresión demostró que la mayor parte de los genes sobreexpresados en los pacientes de alto riesgo también se encontraban sobreexpresados en el grupo 2. Por el contrario, los pacientes del grupo 3, caracterizado por una menor expresión de genes asociados con citotoxicidad, mostraron

un perfil de riesgo clínico más bajo y una PFS significativamente más larga que los otros grupos de pacientes con MQ.

Nuestro estudio reveló una sobreexpresión de varios immune checkpoints inhibidores (*TIGIT*, *CD96*, *BTLA*, *LAG-3*, *KLRC1*) en los pacientes con MQ de alto riesgo. Este subgrupo también presentó un score TIS elevado, que ha demostrado predecir una respuesta a la inmunoterapia con bloqueantes de PD-1 en otros tumores²⁶³. PD-1, sin embargo, no se encontró significativamente sobreexpresado en el microambiente de nuestra serie de pacientes con MQ, sugiriendo que este *immune checkpoint* podría no cumplir un papel crucial en la progresión de esta enfermedad. Este hallazgo es consistente con los resultados negativos obtenidos con el bloqueo de PD-1 en ensayos clínicos de pacientes con MM y MQ²⁶⁴. En particular, los pacientes del grupo 2 en nuestro estudio mostraron una significativa sobreexpresión de *TIGIT*. Estudios recientes han demostrado en modelos de MM murinos que la carga tumoral se correlacionaba con el porcentaje de linfocitos T CD8 TIGIT+, siendo *TIGIT* el checkpoint inhibitorio más expresado en los ratones enfermos. El MM se desarrolló de manera más lenta en los ratones *TIGIT-null*, y la carga tumoral se redujo con anticuerpos anti-TIGIT. El bloqueo de TIGIT es capaz de reestablecer no solo la inmunidad T CD8 sino que también, a diferencia de PD-1, es expresado en los linfocitos NK de la médula ósea, pudiendo activar la citotoxicidad NK²⁶⁵. En un trabajo previo de nuestro grupo, el bloque de TIGIT causó la muerte de CP de pacientes con MM y MQ con expresión elevada de *nectina-2*, ligando de *TIGIT*²⁶⁶. El bloqueo de este y otros inhibidores (como *LAG-3*) ya se encuentra en investigación clínica para pacientes con MM en recaída.

El análisis de las muestras pareadas de 5 pacientes con MQ previo a y tras la progresión a MM solamente mostró algunos genes diferencialmente expresados, pero entre ellos se encontraban miembros de la familia de *TNF* y receptores inhibidores de la familia *ITIM*. La expresión de ciertos genes de la familia *TNF* también se asoció con una PFS significativamente más corta, sugiriendo que un ambiente pro-inflamatorio en este caso podría contribuir a la progresión a MM en vez de generar una respuesta efectiva contra las células malignas. Será importante en futuros estudios evaluar un mayor número de puntos evolutivos del mismo paciente, pero incluyendo muestras de etapas más precoces

y alejadas de la progresión. De esta manera, podríamos poner de manifiesto diferencias que puedan revelar la contribución del microambiente en los diferentes estadios evolutivos de la enfermedad.

Una limitación de nuestro estudio es la falta de información genética de la población neoplásica, que no se encontraba disponible en los casos de gammapatías asintomáticas dada la escasa infiltración a nivel medular, y que podría explicar en parte la heterogeneidad de los hallazgos. Al mismo tiempo, el análisis de la expresión génica mediante el sistema nCounter™ no permite evaluar las diferentes subpoblaciones inmunes de manera individual, pudiendo pasar desapercibidos cambios de expresión génica que afecten subpoblaciones específicas. Metodologías como *single cell RNAseq*, además, permiten diferenciar de manera adecuada entre alteraciones a nivel transcripcional y cambios cuantitativos en los diferentes subtipos celulares. Será importante desarrollar estudios futuros utilizando esta u otras tecnologías, con un número suficiente de pacientes que permita relacionar los hallazgos con la evolución clínica de los mismos, con los factores de riesgo utilizados actualmente para predecir el riesgo de progresión a enfermedad sintomática y, en último término, con las alteraciones genéticas de la población neoplásica.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la inflamación crónica y la fatiga de las células citotóxicas podrían explicar, en parte, la incapacidad de controlar la expansión de las células plasmáticas neoplásicas en el MQ. Al mismo tiempo, nuestros hallazgos revelaron diferencias significativas en la composición y funcionalidad del microambiente inmune en los pacientes con esta fase presintomática de la enfermedad, con impacto en la progresión a MM sintomático. En particular, los cambios relacionados a linfocitos T citotóxicos podrían ser utilizados tanto para la caracterización del riesgo de progresión, como para la implementación de nuevas inmunoterapias en subgrupos determinados de pacientes con un perfil inmune particular.

Conclusiones

Comportamiento “*evolving*” del componente monoclonal

1. El comportamiento “*evolving*” constituyó un factor de riesgo para la progresión precoz a enfermedad sintomática de los pacientes con mieloma quiescente.
2. El valor pronóstico del comportamiento “*evolving*” resultó independiente de otros factores de riesgo reconocidos (componente monoclonal basal, porcentaje de células plasmáticas en médula ósea e inmunoparesia) y se asoció con una mayor probabilidad de progresión a enfermedad sintomática.
3. Una vez reconocido el comportamiento “*evolving*” del mieloma quiescente, el resto de los factores de riesgo dejaron de tener relevancia pronóstica, limitándose la significancia estadística de éstos últimos sólo a los pacientes “*no evolving*”.

Inmunoparesia isotipo específica (evaluada con el reactivo Hevylite™)

4. La mayor prevalencia de la inmunoparesia isotipo específica con respecto a la de los isotipos no involucrados, junto con niveles proporcionalmente más bajos de las inmunoglobulinas del isotipo involucrado, apoyaron la existencia de un mecanismo isotipo-específico de la inmunoparesia.
5. Ambos tipos de inmunoparesia (isotipo específica y de isotipos no involucrados) se asociaron con otros factores de riesgo relacionados con la progresión a enfermedad sintomática, pero la segunda (especialmente en el caso de la supresión de IgM) parece desarrollarse en estadios más avanzados de la enfermedad y estar mediada por mecanismos diferentes.

Microambiente inmune

6. El microambiente inmune de los pacientes con mieloma quiescente se caracterizó por una marcada heterogeneidad. Este hallazgo es consistente con las diferencias en comportamiento clínico ya descritos en este grupo de pacientes.

7. Un subgrupo de pacientes con mieloma quiescente y características clínicas de alto riesgo presentaron una mayor expresión de moléculas asociadas a citotoxicidad y a señalización vía interferón, pero también una mayor expresión de moléculas inhibitorias. Estos hallazgos sugieren que un microambiente pro-inflamatorio, acompañado por la fatiga de las células citotóxicas, sería incapaz de controlar el desarrollo de las células plasmáticas neoplásicas y contribuiría a la progresión de la enfermedad.

8. Las características del microambiente tumoral, específicamente los cambios relacionados a linfocitos T citotóxicos, podrían ser utilizados tanto para la caracterización del riesgo de progresión, como para la implementación de nuevas inmunoterapias en subgrupos determinados de pacientes con un perfil inmune particular.

Bibliografía

1. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016; 91(1):101-19.
2. Mahindra A, Hideshima T, Anderson KC. Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood Rev.* 2010; 24 (Suppl 1): S5-11.
3. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet.* 2009; 374(9686):324-39.
4. Rodríguez-Lobato LG, Pereira A, Fernández de Larrea C, Cibeira MT, Tovar N, Jiménez-Segura R et al. Real-world data on survival improvement in patients with multiple myeloma treated at a single institution over a 45-year period. *Br J Haematol.* 2022; 196(3):649-659.
5. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med.* 2018; 378(3):241-249.
6. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007; 356(25):2582-90.
7. Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1980; 302(24):1347-9.
8. Alexanian R. Localized and indolent myeloma. *Blood.* 1980; 56(3):521-5.
9. 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(5):749-57.
10. Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, Bäuerle T, Ayyaz S, Heiss C et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2010; 28(9):1606-10.
11. Kastritis E, Terpos E, Moulopoulos L, Spyropoulou-Vlachou M, Kanellias N, Eleftherakis-Papaiakovou E et al. Extensive bone marrow infiltration and

- abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia*. 2013; 27(4):947-53.
12. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013; 27(4):941-6.
 13. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2011; 86(1):57-65.
 14. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15(12): e538-48.
 15. Marinac CR, Ghobrial IM, Birmann BM, Soiffer J, Rebbeck TR. Dissecting racial disparities in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2020; 10(2):19.
 16. Landgren O, Graubard BI, Kumar S, Kyle RA, Katzmann JA, Murata K et al. Prevalence of myeloma precursor state monoclonal gammopathy of undetermined significance in 12372 individuals 10-49 years old: a population-based study from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Blood Cancer J*. 2017; 7(10): e618.
 17. Wang S, Xu L, Feng J, Liu Y, Liu L, Wang J, Liu J et al. Prevalence and Incidence of Multiple Myeloma in Urban Area in China: A National Population-Based Analysis. *Front Oncol*. 2020; 9:1513.
 18. Kristinsson SY, Holmberg E, Blimark C. Treatment for high-risk smoldering myeloma. *N Engl J Med*. 2013; 369(18):1762-3.
 19. Blimark CH, Vangsted AJ, Klausen TW, Gregersen H, Szabo AG, Hermansen E et al. Real-World Evidence Group within the Nordic Myeloma Study Group (NMSG). Outcome data from >10 000 multiple myeloma patients in the Danish and Swedish national registries. *Eur J Haematol*. 2022; 108(2):99-108.
 20. Ravindran A, Bartley AC, Holton SJ, Gonsalves WI, Kapoor P, Siddiqui MA, et al. Prevalence, incidence and survival of smoldering multiple myeloma in the United States. *Blood Cancer J*. 2016; 6(10): e486.
 21. Vuyyala S, De Lima M, Caimi PF, Fu P, Cao S, Meteheny L et al. Risk of Progression Across Age and Race for Patients with Smoldering Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2019; 19(10): e325.

22. Tsai DY, Hung KH, Chang CW, Lin KI. Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. *J Biomed Sci.* 2019; 26(1):64.
23. O'Riordan M, Grosschedl R. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity.* 1999; 11(1):21-31.
24. Krangel MS. Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat Immunol.* 2003; 4(7):624-30.
25. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 2003; 24(6):343-9.
26. Manser T. Textbook germinal centers? *J Immunol.* 2004; 172(6):3369-75.
27. Bishop GA, Hostager BS. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13(3):278-85.
28. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(3):137-48.
29. Phan TG, Paus D, Chan TD, Turner ML, Nutt SL, Basten A, Brink R. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med.* 2006; 203(11):2419-24.
30. Kometani K, Kurosaki T. Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol.* 2015; 33:64-9.
31. Vescio RA, Hong CH, Cao J, Kim A, Schiller GJ, Lichtenstein AK, Berenson RJ, Berenson JR. The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma. *Blood.* 1994; 84(10):3283-90.
32. González D, González M, Balanzategui A, Sarasquete ME, López-Pérez R, Chillón MC, García-Sanz R, San Miguel JF. Molecular characteristics and gene segment usage in IGH gene rearrangements in multiple myeloma. *Haematologica.* 2005; 90(7):906-13.
33. 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(9):3112-21.
34. Vescio RA, Cao J, Hong CH, Lee JC, Wu CH, Der Danielian M, Wu V, Newman R, Lichtenstein AK, Berenson JR. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J Immunol.* 1995; 155(5):2487-97.

35. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*. 2015; 33(33):3911-20.
36. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. 2003; 102(7):2562-7.
37. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, Attal M et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009; 27(27):4585-90.
38. Maura F, Bolli N, Angelopoulos N, Dawson KJ, Leongamornlert D, Martincorena I et al. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2019; 10(1):3835.
39. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(26):6333-8.
40. Rustad EH, Yellapantula V, Leongamornlert D, Bolli N, Ledergor G, Nadeu F et al. Timing the initiation of multiple myeloma. *Nat Commun*. 2020; 11(1):1917.
41. Oben B, Froyen G, Maclachlan KH, Leongamornlert D, Abascal F, Zheng-Lin B. Whole-genome sequencing reveals progressive versus stable myeloma precursor conditions as two distinct entities. *Nat Commun*. 2021; 12(1):1861.
42. Rajkumar SV, Gupta V, Fonseca R, Dispenzieri A, Gonsalves WI, Larson D et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013; 27(8):1738-44.
43. Dutta AK, Fink JL, Grady JP, Morgan GJ, Mullighan CG, To LB et al. Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia*. 2019; 33(2):457-468.
44. Merz M, Hielscher T, Schult D, Mai EK, Raab MS, Hillengass J et al. Cytogenetic subclone formation and evolution in progressive smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2020; 34(4):1192-1196.
45. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF et al. Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014; 28(2):384-390.

46. Bustoros M, Sklavenitis-Pistofidis R, Park J, Redd R, Zhitomirsky B, Dunford AJ et al. Genomic Profiling of Smoldering Multiple Myeloma Identifies Patients at a High Risk of Disease Progression. *J Clin Oncol*. 2020; 38(21):2380-2389.
47. Boyle EM, Deshpande S, Tytarenko R, Ashby C, Wang Y, Bauer MA et al. The molecular make up of smoldering myeloma highlights the evolutionary pathways leading to multiple myeloma. *Nat Commun*. 2021; 12(1):293.
48. Bolli N, Biancon G, Moarii M, Gimondi S, Li Y, de Philippis C et al. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia*. 2018; 32(12):2604-2616.
49. Visram A, Cook J, Warsame R. Smoldering multiple myeloma: evolving diagnostic criteria and treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021; 2021(1):673-681.
50. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med*. 2008; 14(5):518-27.
51. Pearce OMT, Delaine-Smith RM, Maniati E, Nichols S, Wang J, Böhm S et al. Deconstruction of a Metastatic Tumor Microenvironment Reveals a Common Matrix Response in Human Cancers. *Cancer Discov*. 2018; 8(3):304-319.
52. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(3):203-13.
53. Das R, Strowig T, Verma R, Koduru S, Hafemann A, Hopf S et al. Microenvironment-dependent growth of preneoplastic and malignant plasma cells in humanized mice. *Nat Med*. 2016; 22(11):1351-1357.
54. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, Patel PH, Tytarenko R, Ashby C et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017; 8(1):268.
55. Ghobrial IM, Detappe A, Anderson KC, Steensma DP. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15(4):219-233.
56. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*. 2012; 120(1):20-30.
57. Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev*. 2013; 251(1):177-88.

58. Moore N, Moreno Gonzales M, Bonner K, Smith B, Park W, Stegall M. Impact of CXCR4/CXCL12 Blockade on Normal Plasma Cells In Vivo. *Am J Transplant*. 2017; 17(6):1663-1669.
59. Martínez-Moreno M, Leiva M, Aguilera-Montilla N, Sevilla-Movilla S, Isern de Val S, Arellano-Sánchez N et al. In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by $\alpha 4\beta 1$ cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia*. 2016; 30(4):861-72.
60. Azab AK, Quang P, Azab F, Pitsillides C, Thompson B, Chonghaile T et al. P-selectin glycoprotein ligand regulates the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment. *Blood*. 2012; 119(6):1468-78.
61. Neri P, Ren L, Azab AK, Brentnall M, Gratton K, Klimowicz AC et al. Integrin $\beta 7$ -mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood*. 2011; 117(23):6202-13.
62. Hazlehurst LA, Landowski TH, Dalton WS. Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene*. 2003; 22(47):7396-402.
63. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T et al. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*. 2004; 5(2):191-9.
64. Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y, Makita M, et al. The activated conformation of integrin $\beta 7$ is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat Med*. 2017; 23(12):1436-1443.
65. Hosen N. Integrins in multiple myeloma. *Inflamm Regen*. 2020; 40:4.
66. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(8):585-98.
67. Reijmers RM, Groen RW, Rozemuller H, Kuil A, de Haan-Kramer A, Csikós T et al. Targeting EXT1 reveals a crucial role for heparan sulfate in the growth of multiple myeloma. *Blood*. 2010; 115(3):601-4.
68. Levy-Adam F, Feld S, Suss-Toby E, Vlodaysky I, Ilan N. Heparanase facilitates cell adhesion and spreading by clustering of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *PLoS One*. 2008; 3(6): e2319.

69. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC et al. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*. 2010; 115(12):2449-57.
70. Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A et al. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood*. 2002; 100(2):610-7.
71. Moser-Katz T, Joseph NS, Dhodapkar MV, Lee KP, Boise LH. Game of Bones: How Myeloma Manipulates Its Microenvironment. *Front Oncol*. 2021; 10:625199.
72. Asosingh K, Vankerkhove V, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K. Selective in vivo growth of lymphocyte function-associated antigen-1-positive murine myeloma cells. Involvement of function-associated antigen-1-mediated homotypic cell-cell adhesion. *Exp Hematol*. 2003; 31(1):48-55.
73. Tagde A, Rajabi H, Bouillez A, Alam M, Gali R, Bailey S et al. MUC1-C drives MYC in multiple myeloma. *Blood*. 2016; 127(21):2587-97.
74. Bahlis NJ, King AM, Kolonias D, Carlson LM, Liu HY, Hussein MA et al. CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood*. 2007; 109(11):5002-10.
75. Rozanski CH, Arens R, Carlson LM, Nair J, Boise LH, Chanan-Khan AA et al. Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J Exp Med*. 2011; 208(7):1435-46.
76. Rozanski CH, Utley A, Carlson LM, Farren MR, Murray M, Russell LM et al. CD28 Promotes Plasma Cell Survival, Sustained Antibody Responses, and BLIMP-1 Upregulation through Its Distal PYAP Proline Motif. *J Immunol*. 2015; 194(10):4717-28.
77. Murray ME, Gavile CM, Nair JR, Koorella C, Carlson LM, Buac D et al. CD28-mediated pro-survival signaling induces chemotherapeutic resistance in multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123(24):3770-9.
78. Gavile CM, Barwick BG, Newman S, Neri P, Nooka AK, Lonial S et al. CD86 regulates myeloma cell survival. *Blood Adv*. 2017; 1(25):2307-2319.
79. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001; 20(42):5991-6000.

80. Gupta VA, Matulis SM, Conage-Pough JE, Nooka AK, Kaufman JL, Lonial S et al. Bone marrow microenvironment-derived signals induce Mcl-1 dependence in multiple myeloma. *Blood*. 2017; 129(14):1969-1979.
81. Conage-Pough JE, Boise LH. Phosphorylation alters Bim-mediated Mcl-1 stabilization and priming. *FEBS J*. 2018; 285(14):2626-2640.
82. Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, Quittet P, Rème T, Lugagne C et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood*. 2004; 103(8):3148-57.
83. Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, Harder B, Henderson K, Kindsvogel W et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*. 2004; 103(2):689-94.
84. Kukreja A, Hutchinson A, Dhodapkar K, Mazumder A, Vesole D, Angitapalli R et al. Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J Exp Med*. 2006; 203(8):1859-65.
85. Tai YT, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood*. 2016; 127(25):3225-36.
86. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*. 2001; 20(33):4519-27.
87. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immunomodulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013; 54(4):683-7.
88. Bieghs L, Johnsen HE, Maes K, Menu E, Van Valckenborgh E, Overgaard MT et al. The insulin-like growth factor system in multiple myeloma: diagnostic and therapeutic potential. *Oncotarget*. 2016; 7(30):48732-48752.
89. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*. 2004; 5(3):221-30.
90. Choi SJ, Oba Y, Gazitt Y, Alsina M, Cruz J, Anderson J et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. *J Clin Invest*. 2001; 108(12):1833-41.

91. Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood*. 2002; 100(6):2195-202.
92. Oba Y, Lee JW, Ehrlich LA, Chung HY, Jelinek DF, Callander NS et al. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol*. 2005; 33(3):272-8.
93. Harmer D, Falank C, Reagan MR. Interleukin-6 Interweaves the Bone Marrow Microenvironment, Bone Loss, and Multiple Myeloma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 9:788.
94. Yin L. Chondroitin synthase 1 is a key molecule in myeloma cell-osteoclast interactions. *J Biol Chem*. 2005; 280(16):15666-72.
95. Delgado-Calle J, Anderson J, Cregor MD, Hiasa M, Chirgwin JM, Carlesso N et al. Bidirectional Notch Signaling and Osteocyte-Derived Factors in the Bone Marrow Microenvironment Promote Tumor Cell Proliferation and Bone Destruction in Multiple Myeloma. *Cancer Res*. 2016; 76(5):1089-100.
96. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barillé S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*. 2001; 98(13):3527-33.
97. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J*. 2018; 8(1):7.
98. Terpos E, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann Oncol*. 2005; 16(8):1223-31.
99. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 2001; 98(13):3534-40.
100. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*. 2003; 102(3):1064-9.
101. Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone

- destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(20):11581-6.
102. Colucci S, Brunetti G, Oranger A, Mori G, Sardone F, Specchia G et al. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood Cancer J*. 2011; 1(6): e27.
 103. Sugatani T, Alvarez UM, Hruska KA. Activin A stimulates I κ B α /NF κ B and RANK expression for osteoclast differentiation, but not AKT survival pathway in osteoclast precursors. *J Cell Biochem*. 2003; 90(1):59-67.
 104. Silbermann R, Bolzoni M, Storti P, Guasco D, Bonomini S, Zhou D et al. Bone marrow monocyte-/macrophage-derived activin A mediates the osteoclastogenic effect of IL-3 in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014; 28(4):951-4.
 105. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Sala R, Bonomini S et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood*. 2005; 106(7):2472-83.
 106. Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, Lazzaretti M, Donofrio G, Bonomini S et al. Production of Wnt inhibitors by myeloma cells: potential effects on canonical Wnt pathway in the bone microenvironment. *Cancer Res*. 2007; 67(16):7665-74.
 107. Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*. 2005; 106(9):3160-5.
 108. Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood*. 2007; 109(5):2106-11.
 109. Ehrlich LA, Roodman GD. The role of immune cells and inflammatory cytokines in Paget's disease and multiple myeloma. *Immunol Rev*. 2005; 208:252-66.
 110. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R, Schroeder G, Plevak MF, Dispenzieri A et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(7):2210-6.
 111. Bhaskar A, Tiwary BN. Hypoxia inducible factor-1 alpha and multiple myeloma. *Int J Adv Res (Indore)*. 2016; 4(1):706-715.

112. Vacca A, Di Loreto M, Ribatti D, Di Stefano R, Gadaleta-Caldarola G, Iodice G et al. Bone marrow of patients with active multiple myeloma: angiogenesis and plasma cell adhesion molecules LFA-1, VLA-4, LAM-1, and CD44. *Am J Hematol.* 1995; 50(1):9-14.
113. Andersen NF, Standal T, Nielsen JL, Heickendorff L, Borset M, Sørensen FB et al. Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. *Br J Haematol.* 2005; 128(2):210-7.
114. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC et al. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood.* 2010; 115(12):2449-57.
115. Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood.* 1999; 93(9):3064-73.
116. Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H et al. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res.* 2006; 66(1):184-91.
117. Ferrucci A, Moschetta M, Frassanito MA, Berardi S, Catacchio I, Ria R et al. A HGF/cMET autocrine loop is operative in multiple myeloma bone marrow endothelial cells and may represent a novel therapeutic target. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(22):5796-807.
118. Podar K, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC. Targeting signalling pathways for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Ther Targets.* 2005; 9(2):359-81.
119. Bailur JK, McCachren SS, Doxie DB, Shrestha M, Pendleton K, Nooka AK et al. Early alterations in stem-like/resident T cells, innate and myeloid cells in the bone marrow in preneoplastic gammopathy. *JCI Insight.* 2019; 5(11): e127807.
120. Pessoa de Magalhães RJ, Vidriales MB, Paiva B, Fernandez-Gimenez C, García-Sanz R, Mateos MV et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica.* 2013; 98(1):79-86.
121. Leone P, Berardi S, Frassanito MA, Ria R, De Re V, Cicco S, Battaglia S et al. Dendritic cells accumulate in the bone marrow of myeloma patients where they

- protect tumor plasma cells from CD8+ T-cell killing. *Blood*. 2015; 126(12):1443-51.
122. Feng X, Zhang L, Acharya C, An G, Wen K, Qiu L et al. Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(15):4290-4300.
123. Kawano Y, Zavidij O, Park J, Moschetta M, Kokubun K, Mouhieddine TH et al. Blocking IFNAR1 inhibits multiple myeloma-driven Treg expansion and immunosuppression. *J Clin Invest*. 2018; 128(6):2487-2499.
124. Nakamura K, Kassem S, Cleynen A, Chrétien ML, Guillerey C, Putz EM et al. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell*. 2018; 33(4):634-648.e5.
125. Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, Condamine T, Chase T, Vogl T et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *J Immunol*. 2013; 190(7):3815-23.
126. De Beule N, De Veirman K, Maes K, De Bruyne E, Menu E, Breckpot K et al. Tumour-associated macrophage-mediated survival of myeloma cells through STAT3 activation. *J Pathol*. 2017; 241(4):534-546.
127. Zheng Y, Cai Z, Wang S, Zhang X, Qian J, Hong S et al. Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood*. 2009; 114(17):3625-8.
128. Minnie SA, Kuns RD, Gartlan KH, Zhang P, Wilkinson AN, Samson L et al. Myeloma escape after stem cell transplantation is a consequence of T-cell exhaustion and is prevented by TIGIT blockade. *Blood*. 2018; 132(16):1675-1688.
129. Scavelli C, Nico B, Cirulli T, Ria R, Di Pietro G, Mangieri D et al. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene*. 2008; 27(5):663-74.
130. Görgün GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*. 2013; 121(15):2975-87.
131. Van Valckenborgh E, Schoupe E, Movahedi K, De Bruyne E, Menu E, De Baetselier P et al. Multiple myeloma induces the immunosuppressive capacity

- of distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the bone marrow. *Leukemia*. 2012; 26(11):2424-8.
132. Favaloro J, Liyadipitiya T, Brown R, Yang S, Suen H, Woodland N et al. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2014; 55(12):2893-900.
 133. Binsfeld M, Muller J, Lamour V, De Veirman K, De Raeve H, Bellahcène A et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells promote angiogenesis in the context of multiple myeloma. *Oncotarget*. 2016; 7(25):37931-37943.
 134. Wang Z, Zhang L, Wang H, Xiong S, Li Y, Tao Q et al. Tumor-induced CD14+HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64(3):389-99.
 135. Ramachandran IR, Condamine T, Lin C, Herlihy SE, Garfall A, Vogl DT et al. Bone marrow PMN-MDSCs and neutrophils are functionally similar in protection of multiple myeloma from chemotherapy. *Cancer Lett*. 2016; 371(1):117-24.
 136. Kloc M, Ghobrial RM, Wosik J, Lewicka A, Lewicki S, Kubiak JZ. Macrophage functions in wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019; 13(1):99-109.
 137. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41(1):49-61.
 138. Lopez-Yrigoyen M, Cassetta L, Pollard JW. Macrophage targeting in cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2021; 1499(1):18-41.
 139. Panchabhai S, Kelemen K, Ahmann G, Sebastian S, Mantei J, Fonseca R. Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma. *Leukemia*. 2016; 30(4):951-4.
 140. Wang H, Hu WM, Xia ZJ, Liang Y, Lu Y, Lin SX et al. High numbers of CD163+ tumor-associated macrophages correlate with poor prognosis in multiple myeloma patients receiving bortezomib-based regimens. *J Cancer*. 2019; 10(14):3239-3245.
 141. Beider K, Bitner H, Leiba M, Gutwein O, Koren-Michowitz M, Ostrovsky O et al. Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. *Oncotarget*. 2014; 5(22):11283-96.

142. Gutiérrez-González A, Martínez-Moreno M, Samaniego R, Arellano-Sánchez N, Salinas-Muñoz L, Relloso M et al. Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood*. 2016; 128(18):2241-2252.
143. Verheye E, Bravo Melgar J, Deschoemaeker S, Raes G, Maes A, De Bruyne E et al. Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Multiple Myeloma: Challenges, Opportunities, and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(2):904.
144. Brimnes MK, Svane IM, Johnsen HE. Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clin Exp Immunol*. 2006; 144(1):76-84.
145. Melillo JA, Song L, Bhagat G, Blazquez AB, Plumlee CR, Lee C et al. Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *J Immunol*. 2010; 184(5):2638-45.
146. Yao Y, Xu Q, Kwon MJ, Matta R, Liu Y, Hong SC et al. ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages. *J Immunol*. 2006; 177(1):70-6.
147. Brown R, Murray A, Pope B, Sze DM, Gibson J, Ho PJ et al. Either interleukin-12 or interferon-gamma can correct the dendritic cell defect induced by transforming growth factor beta in patients with myeloma. *Br J Haematol*. 2004; 125(6):743-8.
148. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 2002; 100(1):230-7.
149. Wang S, Yang J, Qian J, Wezeman M, Kwak LW, Yi Q. Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood*. 2006; 107(6):2432-9.
150. Racanelli V, Leone P, Frassanito MA, Brunetti C, Perosa F, Ferrone S et al. Alterations in the antigen processing-presenting machinery of transformed plasma cells are associated with reduced recognition by CD8+ T cells and characterize the progression of MGUS to multiple myeloma. *Blood*. 2010; 115(6):1185-93.
151. Ray A, Song Y, Du T, Buon L, Tai YT, Chauhan D et al. Identification and validation of ecto-5' nucleotidase as an immunotherapeutic target in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2022; 12(4):50.
152. Cohen AD, Raje N, Fowler JA, Mezzi K, Scott EC, Dhodapkar MV. How to Train Your T Cells: Overcoming Immune Dysfunction in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2020; 26(7):1541-1554.

153. Feyler S, von Lilienfeld-Toal M, Jarmin S, Marles L, Rawstron A, Ashcroft AJ et al. CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+) CD4(-) CD8(-) alpha-beta TCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br J Haematol*. 2009; 144(5):686-95.
154. Paiva B, Mateos MV, Sanchez-Abarca LI, Puig N, Vidriales MB, López-Corral L et al. Immune status of high-risk smoldering multiple myeloma patients and its therapeutic modulation under LenDex: a longitudinal analysis. *Blood*. 2016; 127(9):1151-62.
155. Dhodapkar MV, Krasovsky J, Osman K, Geller MD. Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med*. 2003; 198(11):1753-7.
156. Shay G, Hazlehurst L, Lynch CC. Dissecting the multiple myeloma-bone microenvironment reveals new therapeutic opportunities. *J Mol Med (Berl)*. 2016; 94(1):21-35.
157. Ray A, Das DS, Song Y, Richardson P, Munshi NC, Chauhan D et al. Targeting PD1-PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2015; 29(6):1441-4.
158. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 2016; 34(23):2698-704.
159. Ribrag V, Avigan DE, Green DJ, Wise-Draper T, Posada JG, Vij R et al. Phase 1b trial of pembrolizumab monotherapy for relapsed/refractory multiple myeloma: KEYNOTE-013. *Br J Haematol*. 2019; 186(3): e41-e44.
160. Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, Kassem S, Teo T, Miles K et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8⁺ T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood*. 2018; 132(16):1689-1694.
161. Romano A, Conticello C, Cavalli M, Vetro C, La Fauci A, Parrinello NL et al. Immunological dysregulation in multiple myeloma microenvironment. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:198539.
162. Prabhala RH, Neri P, Bae JE, Tassone P, Shammam MA, Allam CK et al. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2006; 107(1):301-4.
163. Muthu Raja KR, Kubiczkova L, Rihova L, Piskacek M, Vsianska P, Hezova R et al. Functionally suppressive CD8 T regulatory cells are increased in patients with

- multiple myeloma: a cause for immune impairment. *PLoS One*. 2012; 7(11): e49446.
164. Wang JN, Cao XX, Zhao AL, Cai H, Wang X, Li J. Increased activated regulatory T cell subsets and aging Treg-like cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case control study. *Cancer Cell Int*. 2018; 18:187.
 165. Bryant C, Suen H, Brown R, Yang S, Favaloro J, Aklilu E et al. Long-term survival in multiple myeloma is associated with a distinct immunological profile, which includes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer J*. 2013; 3(9): e148.
 166. Hadjiaggelidou C, Mandala E, Terpos E, Yiannaki E, Markala D, Triantafyllou T et al. Evaluation of regulatory T cells (Tregs) alterations in patients with multiple myeloma treated with bortezomib or lenalidomide plus dexamethasone: correlations with treatment outcome. *Ann Hematol*. 2019; 98(6):1457-1466.
 167. Hansson L, Abdalla AO, Moshfegh A, Choudhury A, Rabbani H, Nilsson B et al. Long-term idiosyncratic vaccination combined with interleukin-12 (IL-12), or IL-12 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor, in early-stage multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(5):1503-10.
 168. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(7):467-78.
 169. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*. 2000; 96(2):384-92.
 170. Girlanda S, Fortis C, Belloni D, Ferrero E, Ticozzi P, Sciorati C et al. MICA expressed by multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance plasma cells Costimulates pamidronate-activated gammadelta lymphocytes. *Cancer Res*. 2005; 65(16):7502-8.
 171. Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D et al. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*. 2005; 105(1):251-8.
 172. Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther*. 2009; 8(23):2211-20.
 173. Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(8):568-80.

174. Frohn C, Höppner M, Schlenke P, Kirchner H, Koritke P, Luhm J. Anti-myeloma activity of natural killer lymphocytes. *Br J Haematol.* 2002; 119(3):660-4.
175. Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai YT, Prabhala RH, Ritz J et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(4):1285-90.
176. Feyler S, Scott GB, Parrish C, Jarmin S, Evans P, Short M et al. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contact-dependent and antigen-presenting cell-independent. *PLoS One.* 2012; 7(5): e35981.
177. Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C, Le Treut T et al. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology.* 2013; 139(3):338-41.
178. Clara JA, Childs RW. Harnessing natural killer cells for the treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol.* 2022; 49(1):69-85.
179. Zavidij O, Haradhvala NJ, Mouhieddine TH, Sklavenitis-Pistofidis R, Cai S, Reidy M et al. Single-cell RNA sequencing reveals compromised immune microenvironment in precursor stages of multiple myeloma. *Nat Cancer.* 2020; 1(5):493-506.
180. Sklavenitis-Pistofidis R, Bustoros M, Ghobrial IM. Bone marrow niche in multiple myeloma and its precursor states. *Hemasphere.* 2019; 3(Suppl):121-123.
181. Glavey SV, Naba A, Manier S, Clauser K, Tahri S, Park J et al. Proteomic characterization of human multiple myeloma bone marrow extracellular matrix. *Leukemia.* 2017; 31(11):2426-2434.
182. Mateos MV, Kumar S, Dimopoulos MA, González-Calle V, Kastiris E, Hajek R et al. International Myeloma Working Group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood Cancer J.* 2020; 10(10):102.
183. Musto P, Engelhardt M, Caers J, Bolli N, Kaiser M, Van de Donk N et al. 2021 European Myeloma Network review and consensus statement on smoldering multiple myeloma: how to distinguish (and manage) Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Haematologica.* 2021; 106(11):2799-2812.
184. Cesana C, Klersy C, Barbarano L, Nosari AM, Crugnola M, Pungolino E et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2002; 20(6):1625-34.

185. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 2008; 111(2):785-9.
186. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007; 110(7):2586-92.
187. Cherry BM, Korde N, Kwok M, Manasanch EE, Bhutani M, Mulquin M et al. Modeling progression risk for smoldering multiple myeloma: results from a prospective clinical study. *Leuk Lymphoma*. 2013; 54(10):2215-8.
188. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011; 365(5):474-5.
189. Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, Cohen A, Vogl DT, Stadtmauer EA et al. Classifying ultra-high risk smoldering myeloma. *Leukemia*. 2015; 29(3):751-3.
190. Bianchi G, Kyle RA, Larson DR, Witzig TE, Kumar S, Dispenzieri A et al. High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013; 27(3):680-5.
191. Gonsalves WI, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Dingli D, Timm MM, Morice WG et al. Quantification of circulating clonal plasma cells via multiparametric flow cytometry identifies patients with smoldering multiple myeloma at high risk of progression. *Leukemia*. 2017; 31(1):130-135.
192. González-Calle V, Dávila J, Escalante F, de Coca AG, Aguilera C, López R et al. Bence Jones proteinuria in smoldering multiple myeloma as a predictor marker of progression to symptomatic multiple myeloma. *Leukemia*. 2016; 30(10):2026-2031.
193. Sørrig R, Klausen TW, Salomo M, Vangsted AJ, Østergaard B, Gregersen H et al. Smoldering multiple myeloma risk factors for progression: a Danish population-based cohort study. *Eur J Haematol*. 2016; 97(3):303-9.
194. Dimopoulos MA, Moulopoulos A, Smith T, Delasalle KB, Alexanian R. Risk of disease progression in asymptomatic multiple myeloma. *Am J Med*. 1993; 94(1):57-61.
195. Kastritis E, Moulopoulos LA, Terpos E, Koutoulidis V, Dimopoulos MA. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine

- MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia*. 2014; 28(12):2402-3.
196. Zamagni E, Nanni C, Gay F, Pezzi A, Patriarca F, Bellò M et al. 18F-FDG PET/CT focal, but not osteolytic, lesions predict the progression of smoldering myeloma to active disease. *Leukemia*. 2016; 30(2):417-22.
 197. Lakshman A, Rajkumar SV, Buadi FK, Binder M, Gertz MA, Lacy MQ et al. Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria. *Blood Cancer J*. 2018; 8(6):59.
 198. Termini R, Žihala D, Terpos E, Perez-Montaña A, Jelínek T, Raab M et al. Circulating Tumor and Immune Cells for Minimally Invasive Risk Stratification of Smoldering Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2022; 28(21):4771-4781.
 199. Aljama MA, Sidiqi MH, Lakshman A, Dispenzieri A, Jevremovic D, Gertz MA et al. Plasma cell proliferative index is an independent predictor of progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Adv*. 2018; 2(22):3149-3154.
 200. Vasco-Mogorrón MA, Campillo JA, Periago A, Cabañas V, Berenguer M, García-Garay MC et al. Proliferation to Apoptosis Tumor Cell Ratio as a Biomarker to Improve Clinical Management of Pre-Malignant and Symptomatic Plasma Cell Neoplasms. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(8):3895.
 201. Hájek R, Sandecka V, Špička I, Raab M, Goldschmidt H, Beck S et al. Identification of patients with smouldering multiple myeloma at ultra-high risk of progression using serum parameters: the Czech Myeloma Group model. *Br J Haematol*. 2020; 190(2):189-197.
 202. Visram A, Soof C, Rajkumar SV, Kumar SK, Bujarski S, Spektor TM et al. Serum BCMA levels predict outcomes in MGUS and smoldering myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2021; 11(6):120.
 203. Rosiñol L, Bladé J, Esteve J, Aymerich M, Rozman M, Montoto S et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol*. 2003; 123(4):631-6.
 204. Ravi P, Kumar S, Larsen JT, Gonsalves W, Buadi F, Lacy MQ et al. Evolving changes in disease biomarkers and risk of early progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2016; 6(7): e454.
 205. Atrash S, Robinson M, Slaughter D, Aneralla A, Brown T, Robinson J et al. Evolving changes in M-protein and hemoglobin as predictors for progression of smoldering multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2018; 8(11):107.

206. Wu V, Moshier E, Leng S, Barlogie B, Cho HJ, Jagannath S et al. Risk stratification of smoldering multiple myeloma: predictive value of free light chains and group-based trajectory modeling. *Blood Adv.* 2018; 2(12):1470-1479.
207. Gran C, Luong V, Bruchfeld JB, Liwing J, Afram G, Lund J et al. Dynamic follow-up of smoldering multiple myeloma identifies a subset of patients at high risk of progression. *Am J Hematol.* 2021; 96(3): E63-E65.
208. Wennmann M, Kintzelé L, Piraud M, Menze BH, Hielscher T, Hofmanninger J et al. Volumetry based biomarker speed of growth: Quantifying the change of total tumor volume in whole-body magnetic resonance imaging over time improves risk stratification of smoldering multiple myeloma patients. *Oncotarget.* 2018; 9(38):25254-25264.
209. López-Corral L, Sarasquete ME, Beà S, García-Sanz R, Mateos MV, Corchete LA et al. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia.* 2012; 26(12):2521-9.
210. Dhodapkar MV, Sexton R, Waheed S, Usmani S, Papanikolaou X, Nair B et al. Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood.* 2014; 123(1):78-85.
211. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(3):175-87.
212. Khan R, Dhodapkar M, Rosenthal A, Heuck C, Papanikolaou X, Qu P et al. Four genes predict high risk of progression from smoldering to symptomatic multiple myeloma (SWOG S0120). *Haematologica.* 2015; 100(9):1214-21.
213. Bolli N, Maura F, Minvielle S, Gloznik D, Szalat R, Fullam A et al. Genomic patterns of progression in smoldering multiple myeloma. *Nat Commun.* 2018; 9(1):3363.
214. Neben K, Jauch A, Hielscher T, Hillengass J, Lehnert N, Seckinger A et al. Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t (4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. *J Clin Oncol.* 2013; 31(34):4325-32.
215. Zhao AL, Shen KN, Wang JN, Huo LQ, Li J, Cao XX. Early or deferred treatment of smoldering multiple myeloma: a meta-analysis on randomized controlled studies. *Cancer Manag Res.* 2019; 11:5599-5611.
216. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2013; 369(5):438-47.

217. Mateos MV, Hernández MT, Salvador C, Rubia J, de Arriba F, López-Corral L, Rosiñol L, Paiva B, Palomera L, Bargay J, Oriol A, Prosper F, López J, Arguiñano JM, Bladé J, Lahuerta JJ, San-Miguel J. Lenalidomide-dexamethasone versus observation in high-risk smoldering myeloma after 12 years of median follow-up time: A randomized, open-label study. *Eur J Cancer*. 2022; 174:243-250.
218. Lonial S, Jacobus S, Fonseca R, Weiss M, Kumar S, Orlowski RZ et al. Randomized Trial of Lenalidomide Versus Observation in Smoldering Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2020; 38(11):1126-1137.
219. Korde N, Roschewski M, Zingone A, Kwok M, Manasanch EE, Bhutani M et al. Treatment With Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone With Lenalidomide Extension in Patients With Smoldering or Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *JAMA Oncol*. 2015; 1(6):746-54.
220. Kazandjian D, Hill E, Dew A, Morrison C, Roswarski J, Korde N et al. Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone Followed by Lenalidomide Maintenance for Prevention of Symptomatic Multiple Myeloma in Patients With High-risk Smoldering Myeloma: A Phase 2 Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Oncol*. 2021; 7(11):1678-1685.
221. Mateos M-V, Martinez-Lopez J, Rodriguez Otero P, Gonzalez-Calle V, Gonzalez MS, Oriol A et al. Curative strategy (GEMCESAR) for high-risk smoldering myeloma (SMM): carfilzomib, lenalidomide and dexamethasone (KRd) as induction followed by HDT-ASCT, consolidation with KRd and maintenance with Rd. *Blood*. 2019; 134(1):781.
222. Puig N, Contreras T, Paiva B, Cedena MT, Martínez-Lopez J, Oriol A et al. Analysis of treatment efficacy in the GEM-CESAR trial for high-risk smoldering multiple myeloma patients: comparison between the standard and IMWG MRD criteria and QIPMS including FLC (QIP-FLC-MS). *J Clin Oncol*. 2020; 38(15):8512.
223. Nadeem O, Redd RA, Prescott J, Tague K, Romines V, Metivier A, et al. A Phase II Trial of the Combination of Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *Blood*. 2021; 138 (Supplement 1): 2749.
224. Landgren CO, Chari A, Cohen YC, Spencer A, Voorhees P, Estell JA et al. Daratumumab monotherapy for patients with intermediate-risk or high-risk smoldering multiple myeloma: a randomized, open-label, multicenter, phase 2 study (CENTAURUS). *Leukemia*. 2020; 34(7):1840-1852.
225. Rajkumar SV, Voorhees PM, Goldschmidt H, Baker RI, Bandekar R, Kuppens S et al. Randomized, open-label, phase 3 study of subcutaneous daratumumab

- (DARA SC) versus active monitoring in patients (Pts) with high-risk smoldering multiple myeloma (SMM): AQUILA. *J. Clin. Oncol.* 2018, 36, TPS8062.
226. Vaxman I, Gertz MA. How I approach smoldering multiple myeloma. *Blood.* 2022; 140(8):828-838.
227. Manasanch EE, Jagannath S, Lee HC, Patel KK, Graham C, Kaufman GP et al. A Multicenter Phase II Single Arm Trial of Isatuximab in Patients with High Risk Smoldering Multiple Myeloma (HRSMM) *Blood.* 2019; 134:3116.
228. Mateos MV, Rodriguez Otero P, Koh Y, Martinez-Lopez J, Parmar G, Prince HM, et al. Isatuximab in Combination with Lenalidomide and Dexamethasone in Patients with High-Risk Smoldering Multiple Myeloma: Updated Safety Run-in Results from the Randomized Phase 3 Ithaca Study. *Blood.* 2022; 140 (Supplement 1): 7317–7319
229. Jagannath S, Laubach J, Wong E, Stockerl-Goldstein K, Rosenbaum C, Dhodapkar M et al. Elotuzumab monotherapy in patients with smoldering multiple myeloma: a phase 2 study. *Br J Haematol.* 2018; 182(4):495-503.
230. Liu C, Ghobrial IM, Bustoros M, Reyes K, Hornburg K, Badros AZ et al. Phase II trial of combination of elotuzumab, lenalidomide, and dexamethasone in high-risk smoldering multiple myeloma. *Blood.* 2018; 132(suppl 1):154.
231. Manasanch EE, Han G, Mathur R, Qing Y, Zhang Z, Lee H et al. A pilot study of pembrolizumab in smoldering myeloma: report of the clinical, immune, and genomic analysis. *Blood Adv.* 2019; 3(15):2400-2408.
232. Brighton TA, Khot A, Harrison SJ, Ghez D, Weiss BM, Kirsch A et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study of Siltuximab in High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2019; 25(13):3772-3775.
233. Bae J, Smith R, Daley J, Mimura N, Tai YT, Anderson KC et al. Myeloma-specific multiple peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(17):4850-60.
234. Cirstea D, Shome R, Connolly JJ, Duvallet E, Joyce A, Moyo V et al. Immune Profiling and Responses of Smoldering Multiple Myeloma Patients Treated in a Phase Ib Study of Pvx-410 Vaccine Targeting XBP1/CD138/CS1 Antigens, and Citarinostat, a Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi) with and without Lenalidomide. *Blood.* 2023; 142 (supplement 1): 2017.
235. Nooka AK, Wang ML, Yee AJ, Kaufman JL, Bae J, Peterkin D et al. Assessment of Safety and Immunogenicity of PVX-410 Vaccine With or Without Lenalidomide in Patients With Smoldering Multiple Myeloma: A Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018; 4(12): e183267.

236. Rajkumar SV, Kumar S, Lonial S, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J.* 2022; 12(9):129.
237. Thorsteinsdóttir S, Gíslason GK, Aspelund T, Rögnvaldsson S, Óskarsson JÞ, Sigurðardóttir GÁ et al. Prevalence of smoldering multiple myeloma based on nationwide screening. *Nat Med.* 2023; 29(2):467-472.
238. Rosiñol L, Cibeira MT, Montoto S, Rozman M, Esteve J, Filella X et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82(4):428-34.
239. Heaney JJJ, Campbell JP, Iqbal G, Cairns D, Richter A, Child JA et al. Characterisation of immunoparesis in newly diagnosed myeloma and its impact on progression-free and overall survival in both old and recent myeloma trials. *Leukemia.* 2018; 32(8):1727–1738.
240. Turesson I, Kovalchik SA, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Goldin LR, Drayson MT et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood.* 2014; 123(3):338-45.
241. Ludwig H, Milosavljevic D, Berlanga O, Zojer N, Hübl W, Fritz V et al. Suppression of the noninvolved pair of the myeloma isotype correlates with poor survival in newly diagnosed and relapsed/refractory patients with myeloma. *Am J Hematol.* 2016; 91(3):295-301.
242. Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ 3rd et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia.* 2013; 27(1):208-12.
243. Jiménez JJ, Pais TM, Barbosa N, Campos ML, Díaz MAP, de Larramendi CH. Severe Isotype-Matched Immunosuppression (IMI) as a Potential Risk Factor for Progression of MGUS Patients. *J Appl Lab Med.* 2018; 2(5):700-710.
244. Espiño M, Medina S, Blanchard MJ, Villar LM. Involved/uninvolved immunoglobulin ratio identifies monoclonal gammopathy of undetermined significance patients at high risk of progression to multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2014; 164(5):752-5.
245. Costello R, Espana K, Korde N, Kwok M, Zingone A, Yancey MA et al. Hevylite™ assays detect a hidden immunoparesis associated with adverse biology in myeloma precursor disease: a prospective clinical study. *Blood.* 2011; 118(21):5065.

246. Magnano L, Fernández de Larrea C, Elena M, Cibeira MT, Tovar N, Aróstegui JI et al. Prognostic Impact of Serum Heavy/Light Chain Pairs in Patients With Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Myeloma: Long-Term Results From a Single Institution. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016; 16(6): e71-7.
247. Paiva B, Pérez-Andrés M, Vídriales MB, Almeida J, de las Heras N, Mateos MV et al. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. *Leukemia.* 2011; 25(4):697-706.
248. Sørriig R, Klausen TW, Salomo M, Vangsted AJ, Frølund UC, Andersen KT et al. Immunoparesis in newly diagnosed Multiple Myeloma patients: Effects on overall survival and progression free survival in the Danish population. *PLoS One.* 2017; 12(12): e0188988.
249. Wang L, Young DC. Suppression of polyclonal immunoglobulin production by M-proteins shows isotype specificity. *Ann Clin Lab Sci.* 2001; 31(3):274-8.
250. Hoover RG, Lynch RG. Lymphocyte surface membrane immunoglobulin in myeloma. II. T cells with IgA-Fc receptors are markedly increased in mice with IgA plasmacytomas. *J Immunol.* 1980; 125(3):1280-8.
251. Hoover RG, Dieckgraefe BK, Lake J, Kemp JD, Lynch RG. Lymphocyte surface membrane immunoglobulin in myeloma. III. IgA plasmacytomas induce large numbers of circulating, adultthymectomy-sensitive, theta +, Lyt-1-2+ lymphocytes with IgAFc receptors. *J Immunol.* 1982; 129(6):2329-31.
252. Waldschmidt TJ, Williams KR, Lynch RG (1987) Isotype-specific recognition and regulation by T cells studied with tumor models. *Int Rev Immunol.* 1987; 2(2):203-220.
253. Milburn GL, Lynch RG (1982). Immunoregulation of murine myeloma in vitro. II. Suppression of MOPC-315 immunoglobulin secretion and synthesis by idiotype-specific suppressor T cells. *J Exp Med.* 1982; 155(3):852-62.
254. Sanchez E, Gillespie A, Tang G, Ferros M, Harutyunyan NM, Vardanyan S et al. Soluble B-Cell Maturation Antigen Mediates Tumor-Induced Immune Deficiency in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(13):3383-97.
255. Sanchez E, Li M, Kitto A, Li J, Wang CS, Kirk DT et al. Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. *Br J Haematol.* 2012; 158(6):727-38.
256. Chakraborty R, Rybicki L, Nakashima MO, Dean RM, Faiman BM, Samaras CJ et al. Characterisation and prognostic impact of immunoparesis in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2020; 189(6):1074-1082.

257. Dosani T, Carlsten M, Maric I, Landgren O. The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of MM and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J.* 2015; 5: e321.
258. Koike M, Sekigawa I, Okada M, Matsumoto M, Iida N, Hashimoto H et al. Relationship between CD4(+) /CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. *Leuk Res.* 2002; 26(8):705-11.
259. Ogawara H, Handa H, Yamazaki T, Toda T, Yoshida K, Nishimoto N et al. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. *Leuk Res.* 2005; 29(2):135-40.
260. Scavelli C, Nico B, Cirulli T, Ria R, Di Pietro G, Mangieri D et al. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene.* 2008; 27(5):663-74.
261. Schinke C, Poos AM, Bauer M, John L, Johnson S, Deshpande S et al. Characterizing the role of the immune microenvironment in multiple myeloma progression at a single-cell level. *Blood Adv.* 2022; 6(22):5873-5883.
262. Szabo PA, Levitin HM, Miron M, Snyder ME, Senda T, Yuan J et al. Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. *Nat Commun.* 2019; 10(1):4706.
263. Damotte D, Warren S, Arrondeau J, Boudou-Rouquette P, Mansuet-Lupo A, Biton J et al. The tumor inflammation signature (TIS) is associated with anti-PD-1 treatment benefit in the CERTIM pan-cancer cohort. *J Transl Med.* 2019; 17(1):357.
264. Jelinek T, Paiva B, Hajek R. Update on PD-1/PD-L1 Inhibitors in Multiple Myeloma. *Front Immunol.* 2018; 9:2431.
265. Guillerey C, Harjunpaa H, Carrie N, Kassem S, Teo T, Miles K et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8(+) T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood.* 2018; 132:1689–94.
266. Lozano E, Mena MP, Díaz T, Martín-Antonio B, León S, Rodríguez-Lobato LG et al. Nectin-2 Expression on Malignant Plasma Cells Is Associated with Better Response to TIGIT Blockade in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2020; 26(17):4688-4698.