

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Medicina

Programa de Doctorado: 3139 Medicina



Estudio de la enfermedad residual mínima en pacientes con mieloma múltiple en muy buena respuesta parcial o completa convencional mediante citometría de flujo de alta sensibilidad y la medición de cadenas mediante la técnica Hevylite®

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

María José Remigia Pellicer

Dirigida por:

Dr. Javier de la Rubia Comos

Dr. Carlos Solano Vercet

Dra. Amparo Sempere Talens

Valencia, febrero de 2021



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Departament de Medicina

JAVIER DE LA RUBIA COMOS, Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia.

CARLOS SOLANO VERCET, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

AMPARO SEMPERE TALENS, Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia y médico adjunto del Servicio de Hematológica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: **“Estudio de la enfermedad residual mínima en pacientes con mieloma múltiple en muy buena respuesta parcial o completa convencional mediante citometría de flujo de alta sensibilidad y la medición de cadenas mediante la técnica Hevylite®”** ha sido realizada bajo nuestra dirección por **María José Remigia Pellicer** y reúne a nuestro juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

AGRADECIMIENTOS

Durante la elaboración de esta tesis, la ayuda de los demás ha sido la parte más importante, tanto en el ámbito profesional como personal y quisiera formalmente dar las gracias. Sin ellos, no habría sido posible.

Gracias a Javier por su constante supervisión, su tiempo, su paciencia y su esfuerzo. Sus conocimientos y su experiencia han supuesto para mí un gran aprendizaje.

Gracias a Carlos por confiar en mí y dejarme formar parte de su excelente equipo con el que descubrí el interesante mundo de la investigación.

Gracias a Amparo por contagiarme su pasión por la citometría de flujo cuando fui su residente. Su tesón, ganas e ilusión en cada revisión de este proyecto ha sido un gran apoyo.

Gracias a todos los compañeros del Hospital Clínico que han colaborado en esta tesis.

Gracias a los auxiliares, enfermeros y residentes por la realización de los “aspirados de médulas generosos”.

Gracias a los técnicos, especialmente a Belén, por los procesamientos de muestras interminables.

Gracias a los médicos, particularmente Anabel y Carmen por su colaboración.

Gracias a mis compañeras de mesa, Paula, Edel, Irene, Blanca y Daniela por hacer que ir a trabajar sea una alegría.

Gracias a los compañeros del resto de hospitales que han participado en esta tesis, especialmente a Mario, Samuel, Lourdes y Pepa.

Gracias a mis hermanos por cuidarme siempre, tanto el que está a mi lado como el que está en el cielo. Gracias a mi prima, mi otro ángel de la guarda.

Gracias a mis padres, mi marido y mis dos hijos que han vivido conmigo cada acierto y cada tropiezo en la realización de esta tesis.

Gracias a Dios.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS
ÍNDICE
ABREVIATURAS
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE FIGURAS
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONCEPTOS	2
1.1.1. <i>Mieloma múltiple</i>	<i>2</i>
1.1.2. <i>Enfermedad residual mínima en mieloma múltiple. Nuevos criterios de respuesta y métodos de valoración.....</i>	<i>3</i>
1.1.3. <i>Citometría de flujo</i>	<i>13</i>
1.1.4. <i>Citometría de flujo multiparamétrica</i>	<i>13</i>
1.1.5. <i>Citometría de flujo de nueva generación de alta sensibilidad y su estandarización.....</i>	<i>15</i>
1.2. CITOMETRÍA DE FLUJO Y MIELOMA MÚLTIPLE	16
1.2.1. <i>Citometría de flujo en el análisis de células plasmáticas.....</i>	<i>16</i>

1.2.2. <i>Inmunofenotipo para el diagnóstico de las discrasias de células plasmáticas</i>	16
1.3. ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN MIELOMA MÚLTIPLE MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	21
1.3.1. <i>Evolución de la determinación de la enfermedad residual mínima en mieloma múltiple por citometría de flujo</i>	21
1.3.1.1. Resumen de los anticuerpos utilizados para discriminar las CPP en la detección de la ERM y panel recomendado para el marcaje de la muestra	27
1.3.1.2. Recomendaciones para el marcaje, preparación y adquisición de las células	33
1.3.1.3. Diseño de una estrategia adecuada para el análisis de la muestra.....	40
1.3.1.4. Recomendaciones de requisitos mínimos de calidad que se deben establecer	45
1.3.1.5. Condiciones necesarias en el informe de resultados.....	48
1.3.1.6. Validación del ensayo de valoración de la enfermedad residual mínima por citometría de flujo en mieloma múltiple. Controles de calidad externos e internos.....	51

1.3.1.7. Descripción y valoración de la información generada en los últimos 20 años	56
1.3.2. <i>Perspectiva reguladora de FDA sobre las pruebas de ERM en el mieloma</i>	58
1.3.3. <i>Citometría de flujo de nueva generación de alta sensibilidad y estandarizada para la detección de enfermedad residual mínima en mieloma múltiple</i>	61
1.3.4. <i>Evolución de la demostración del impacto pronóstico de la enfermedad residual mínima en mieloma múltiple</i>	67
1.3.5. <i>La enfermedad residual mínima en mieloma múltiple por Next Generation Flow en la práctica clínica</i>	73
1.4. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA MEDIANTE EL INMUNOENSAYO HEVYLITE®	75
2. HIPÓTESIS	77
3. OBJETIVOS	81
4. MATERIALES Y MÉTODOS	84
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	85
4.1.1. <i>Pacientes candidatos a entrar en el estudio y criterios de inclusión</i>	85

4.1.2.	<i>Protocolo de recogida de muestras y procesamiento de la médula ósea para estudio de la enfermedad residual mínima mediante Next Generation Flow</i>	86
4.1.3.	<i>Protocolo de recogida de muestras de suero para el estudio Hevylite®</i>	91
4.1.4.	<i>Procedimiento de recogida de datos</i>	91
4.2.	PROTOCOLOS DE CALIBRACIÓN DEL CITÓMETRO Y CONTROLES DE CALIDAD	92
4.3.	ANÁLISIS DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA Y LA CALIDAD DE LA MUESTRA MEDIANTE <i>NEXT GENERATION FLOW</i>	93
4.4.	EVALUACIÓN DEL COMPONENTE MONOCLONAL.....	98
4.5.	EVALUACIÓN DE LAS HEVYLITE®	98
4.6.	EVALUACIÓN DE LA CITOGENÉTICA	100
4.7.	TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES	100
4.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	100
5.	RESULTADOS	102
5.1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	103
5.2.	SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN DE TODOS LOS PACIENTES	105
5.3.	PROFUNDIDAD DE LA RESPUESTA Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN.....	107

5.4.	RESULTADO DEL IMPACTO DE LA VALORACIÓN DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA POR <i>NEXT GENERATION FLOW</i> EN LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN.....	110
5.5.	ANÁLISIS DE LOS PACIENTES CON RESPUESTA COMPLETA MANTENIDA.....	118
5.6.	ANÁLISIS DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA NEGATIVA MANTENIDA	119
5.7.	IMPACTO DEL RESULTADO DEL ENSAYO HEVYLITE® EN LA SLP	119
5.8.	ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE LAS MUESTRAS	121
6.	DISCUSIÓN.....	125
7.	CONCLUSIONES	137
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	140
9.	ANEXOS	163
9.1.	ANEXO 1. PNT DEL MARCAJE Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA SEGÚN LOS ESTÁNDARES EUROFLOW.....	164
9.2.	ANEXO 2. PNT DEL INFORME FINAL	172
9.3.	ANEXO 3. PROTOCOLO RECOGIDA DE MUESTRAS DEL ESTUDIO MEDULAR POR INMUNOFENOTIPO.....	175
9.4.	ANEXO 4. PROTOCOLO RECOGIDA DE MUESTRAS ENSAYO HEVYLITE®	178

ABREVIATURAS

ACD	Ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa
AcMo	Anticuerpo monoclonal
AMO	Aspirado de médula ósea
APC	Aloficocianina
APS	Separación automática de poblaciones
ASO-PCR	<i>Allele-specific oligonucleotide-polymerase chain reaction</i>
BCNU	Carmustina
BV	<i>Brilliant Violet</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CLL	Cadenas ligera libres
CLLs	Cadenas ligeras libres en suero
CM	Componente monoclonal
CMF	Citometría de flujo
CMo	Componente monoclonal en orina
CMs	Componente monoclonal en suero
CNT	Celularidad nucleada total
CP	Células plasmáticas
CPN	Células plasmáticas normales
CPP	Células plasmáticas patológicas
CPT	Células plasmáticas totales
CTA	Celularidad total adquirida
CV	Coefficiente de variación
Cy	Cianina
DDT	<i>Drug development tool qualification programs</i>

Del	Delección
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Enfermedad estable
EF	Electroforesis
<i>EMN</i>	<i>European Myeloma Network</i>
EP	Enfermedad en progresión
<i>EQA</i>	<i>External Quality Assessment</i> (control de calidad externo)
ERM	Enfermedad residual mínima
<i>ESCA</i>	<i>European Society for Clinical Cell Analyses</i>
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FITC	Isocianato de fluoresceína
<i>FSC</i>	<i>Forward scatter</i>
<i>FSC-H</i>	<i>Forward scatter, Height</i>
<i>FSC-A</i>	<i>Forward scatter, Area</i>
GECLID	Programa de Garantía Externa de Calidad para Laboratorios de Inmunología Diagnóstica
GEM	Grupo Español de Mieloma
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto
GREMI	Grupo de Estudios de Mieloma Múltiple de la Comunidad Valenciana
GVCF	Grupo Valenciano de Citometría de Flujo
H7	Hilite 7
<i>HLC</i>	<i>Heavy+ Light Chain</i>

<i>rHLC</i>	<i>Ratio Heavy+ Light Chain</i>
<i>ICSS</i>	<i>International Clinical Cytometry Society</i>
IF	Inmunofijación
IFE	Inmunofenotipo
Ig	Inmunoglobulina
Ig(c)	Inmunoglobulina intracitoplasmática
Ig κ(c)	Inmunoglobulinas intracitoplasmáticas kappa
Ig λ(c)	Inmunoglobulinas intracitoplasmáticas Lambda
IMIDs	Inmunoduladores
<i>IMWG</i>	<i>International Myeloma Working Group</i> (Grupo Internacional de Mieloma)
<i>IQC</i>	<i>Internal Quality Control</i> (control de calidad interno)
<i>ISS</i>	<i>International Staging System</i>
IVD	Diagnóstico <i>in vitro</i>
<i>LOD</i>	<i>Limit of detection</i> (límite inferior de detección)
<i>LOQ</i>	<i>Limit of quantification</i> (límite inferior de cuantificación)
MBRP	Muy buena respuesta parcial
MM	Mieloma múltiple
MO	Médula ósea
<i>NGF</i>	<i>Next generation flow</i> (citometría de flujo multiparamétrica de nueva generación)
<i>NGS</i>	<i>Next generation sequencing</i> (secuenciación de nueva generación)
PacB	<i>Pacific Blue</i>

PacO	<i>Pacific Orange</i>
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína de clorofila de peridina
<i>PET</i>	<i>Positrón emission tomography</i>
PETHEMA	Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas
PNT	Procedimiento normalizado de trabajo
RC	Respuesta completa
RCs	Respuesta Completa estricta
<i>R-ISS</i>	<i>Revised International Staging System</i>
Rd	Lenalidomida-dexametasona
RM	Respuesta mínima
RP	Respuesta parcial
SEHH	Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia
SIC	Sociedad Ibérica de Citometría
SSC	<i>Sideward scatter</i>
<i>SSC-H</i>	<i>Sideward scatter, Height</i>
<i>SSC-A</i>	<i>Sideward scatter, Area</i>
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
t	Translocación
TC	Tomografía computarizada
TASP	Trasplante autólogo de sangre periférica
VAD	Vincristina, doxorubicina, dexametasona
VBAD	Vincristina, carmustina, adriamicina, dexametasona

VBCMP	Vincristina, carmustina, ciclofosfamida, melfalán, prednidsona
VCd	Bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona
VMP	Bortezomib, melfalán, prednisona
VRd	Bortezomib, lenalidomida, dexametasona
VTd	Bortezomib, talidomida, dexametasona

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos empleados actualmente en pacientes con mieloma múltiple	5
Tabla 2. Técnicas de valoración de la ERM en el mieloma múltiple	7
Tabla 3. Nuevos criterios de repuesta revisados para el mieloma múltiple del IMGW (2016)	9
Tabla 4. Fluorocromos más frecuentemente empleados en citometría de flujo	14
Tabla 5. Panel de consenso del consorcio EuroFlow para el diagnóstico del mieloma múltiple.....	20
Tabla 6. Paneles iniciales de CMF para la enfermedad residual mínima en mieloma múltiple.....	22
Tabla 7. Panel de ocho colores para la ERM en MM, validado por el consorcio EuroFlow y adaptado por el grupo PETHEMA.....	37
Tabla 8. Valores del LOD y LOQ según el número de células analizadas	48
Tabla 9. Panel final de anticuerpos propuestos por el Grupo EuroFlow para el estudio de ERM en mieloma múltiple	62
Tabla 10. Resultados de las ERM por CMF convencional vs NGF	63
Tabla 11. Porcentaje de poblaciones medulares normales.....	66
Tabla 12. Porcentajes de casos con niveles bajos de poblaciones medulares normales en muestras con ERM negativas y ERM positivas.....	67

Tabla 13. Resumen de los estudios realizados evaluando el impacto de la ERM por CMF en pacientes con MM sobre la SLP y la SG	71
Tabla 14. Tubo 1: utilizado para el diagnóstico MM	89
Tabla 15. Tubo 2: utilizado para el diagnóstico MM.	89
Tabla 16. Tubo 1: utilizado para ERM MM	90
Tabla 17. Tubo 2: utilizado para ERM MM	90
Tabla 18. Valores normales de las Hevylite®	99
Tabla 19. Características de los pacientes al diagnóstico	104
Tabla 20. Evolución del número de pacientes con ERM positiva o negativa por NGF en cada determinación	111
Tabla 21. Características de los pacientes en MBRP	116
Tabla 22. Relación de los resultados de la valoración de la ERM por NGF vs rHLC a los 100 días del TASP	120
Tabla 23. Porcentaje de poblaciones medulares bajas en muestras con resultado ERM negativo y ERM positivo en pacientes en remisión completa	123
Tabla 24. Distribución de las poblaciones medulares en pacientes en RC con ERM negativa en recaída	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama utilizado para la seleccion de células plasmáticas totales...	42
Figura 2. Diagramas para la identificación de las células plasmáticas patológicas.	43
Figura 3. Identificación de eritroblastos (color rojo).....	94
Figura 4. Selección de mastocitos (color amarillo).....	95
Figura 5. Selección de poblaciones linfoides B, células B precursoras CD27 negativo (color azul), células B precursoras CD27 positivo (color fucsia), linfocitos B maduros (color rosa).....	96
Figura 6. Selección de progenitores mieloides (color verde).	97
Figura 7. Supervivencia global de todos los pacientes	105
Figura 8. Supervivencia libre de progresión de todos los pacientes.....	106
Figura 9. Esquema de los resultados de los controles de ERM en MO realizados durante el estudio.....	108
Figura 10. Análisis de la supervivencia libre de progresión (SLP) según la respuesta alcanzada por los pacientes (MBRP, muy buena respuesta parcial vs RC, respuesta completa).	109
Figura 11. Resultado de SLP en todos los pacientes según ERM negativa o positiva realizada pre TASP.	112

Figura 12. Resultado de SLP en todos los pacientes según ERM negativa o positiva realizada a los 100 días post TASP.	113
Figura 13. Resultado SLP en todos los pacientes según ERM negativa o positiva realizada al año post TASP.	114
Figura 14. SLP de los pacientes en MBRP según presentaban ERM positiva o negativa a los 12 meses post TASP.	117
Figura 15. SLP de los pacientes en respuesta completa mantenida durante 24 meses.	118

INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. Conceptos

1.1.1. Mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación clonal de células plasmáticas patológicas (CPP) en la médula ósea (MO) o, con menos frecuencia, en localizaciones extramedulares. El MM se caracteriza desde el punto de vista biológico por la producción de una inmunoglobulina (Ig) o componente monoclonal, (CM) habitualmente de tipo IgG, IgA, IgD, y/o de cadenas ligeras libres (CLL) kappa o lambda (κ/λ), en suero, orina o ambos. Este CM se utiliza, además, como marcador de enfermedad para monitorizar la respuesta al tratamiento. Clínicamente, el MM suele cursar con anemia, lesiones óseas, hipercalcemia, insuficiencia renal de gravedad variable y aumento del riesgo infeccioso.

Según la Asociación Española Contra el Cáncer, en España se diagnostica anualmente de 3 a 5 casos por cada 100.000 habitantes.

INTRODUCCIÓN

1.1.2. Enfermedad residual mínima en mieloma múltiple. Nuevos criterios de respuesta y métodos de valoración

Tradicionalmente, la evaluación de la respuesta al tratamiento en el MM se ha medido por la cuantificación del CM en suero (CMs) o en orina (CMo) mediante diferentes técnicas:

- Nefelometría o cuantificación de las Ig (IgG, IgA, IgM) y de las cadenas ligeras libres en suero (CLLs).

- Proteinograma o electroforesis (EF) en suero u orina con la cuantificación del CM (expresado en g/dL o g/L).

- Inmunofijación (IF) en suero u orina con la caracterización del CM y confirmación de su clonalidad.

La relación entre la reducción del CM tras el tratamiento y la supervivencia libre de progresión (SLP), así como, la supervivencia global (SG) se ha ido consolidando con los avances terapéuticos de las últimas décadas y el aumento de las tasas de respuestas, [1, 2] por lo que actualmente el objetivo inicial del tratamiento es conseguir respuestas de calidad y especialmente obtener una respuesta completa (RC). Ésta se define como la desaparición de las CPP de la MO evaluadas por citología convencional, la ausencia de detección del CM en suero y orina mediante IF y la desaparición de los síntomas clínicos relacionados con la presencia del CM.

Hasta hace una década el esquema clásico del tratamiento inicial del MM fue la combinación de agentes alquilantes (melfalán) con corticoides que incluso se podían administrar vía oral. También

INTRODUCCIÓN

se empleaban pautas de poliquimioterapia intravenosa como el esquema VAD (vincristina, doxorubicina y dexametasona) o alternantes como VBCMP (vincristina, carmustina (BCNU), ciclofosfamida, melfalán y prednisona)/VBAD (vincristina, BCNU, adriamicina y dexametasona). Con estos tratamientos la tasa de RC era inferior al 15% [3]. Actualmente, gracias a la disponibilidad de nuevos fármacos con una elevada actividad anti MM, como los inmunomoduladores (IMiDs) (talidomida, lenalidomida y pomalidomida), los inhibidores del proteasoma (bortezomib, carfilzomib e ixazomib) y los anticuerpos monoclonales (AcMo) (daratumumab, elotuzumab), alrededor del 60% de los pacientes alcanzan respuestas profundas. Los fármacos más comúnmente empleados actualmente en los pacientes con MM se muestran en la **Tabla 1.**

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. *Fármacos empleados actualmente en pacientes con mieloma múltiple*

Clase	Fármacos
Agentes alquilantes	Melfalán, ciclofosfamida, bendamustina
Corticoesteroides	Dexametasona, prednisona
Inmunomoduladores (IMiDs)	Talidomida, lenalidomida, pomalidomida
Inhibidores del proteasoma	Bortezomib, carfilzomib, ixazomib
Anticuerpos monoclonales	Daratumumab, isatuximab (anti-CD38), elotuzumab (anti-SLAMF7)

Tabla adaptada de Liedtke y cols, [4].

Sin embargo, se sabe que el concepto clásico de RC como se ha definido previamente no refleja la realidad de la cantidad de enfermedad residual presente en el paciente, ya que a pesar de esta elevada tasa de respuesta la mayoría de los pacientes siguen sufriendo recaídas. Esta persistencia de recaídas incluso en pacientes en RC refleja la existencia, como en otras neoplasias hematológicas, de una pequeña población de células tumorales residuales localizadas fuera o dentro de la MO, denominada enfermedad residual mínima (ERM) [5] o, más recientemente, enfermedad residual medible [6]. Así, se hace evidente la necesidad de métodos más sensibles que permitan la detección de estas bajas concentraciones de enfermedad. Dichos procedimientos se pueden

INTRODUCCIÓN

dividir en aquellos que identifican la enfermedad extramedular como la *PET/TC (Positron emission tomography/Tomografía computarizada)* o en MO como la citometría de flujo (CMF) multiparamétrica de nueva generación o *next-generation flow (NGF)* y las técnicas moleculares, inicialmente con la *ASO-CPR (allele-specific oligonucleotide-polymerase chain reaction)* que ha dado paso más recientemente a la *next-generation sequencing (NGS)*. Estas nuevas técnicas de ERM en MM han evolucionado mucho en estos últimos años y sus características, ventajas e inconvenientes se muestran en la **Tabla 2**. Recientemente se han mostrado resultados prometedores en la determinación de la ERM en sangre periférica mediante *NGS* y *NGF* [7, 8] facilitando en un futuro su evaluación periódica al evitar la prueba invasiva del aspirado de médula ósea (AMO).

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Técnicas de valoración de la ERM en el mieloma múltiple

	NGS	NGF	Imagen (PET/TC)
Disponibilidad	Limitada	Amplia	Amplia
Aplicabilidad	90-92%	Alrededor del 100%	Alrededor del 100%
Muestra necesaria al diagnóstico	Sí. Debe identificarse el clon predominante	NO	Sí. Debe identificarse la presencia de lesiones al diagnóstico
Procesamiento de la muestra	Puede congelarse	Dentro de las 24-48 horas	No aplica
Estandarización	Sí	Sí	En proceso
Control de calidad de la muestra	No	Sí (resto de celularidad medular)	No aplica
Sensibilidad	1×10^{-5} - 10^{-6}	1×10^{-5} - 10^{-6}	Resolución limitada a lesiones de 5 mm
Tiempo para el resultado	> 7 días	3-4 horas	2 horas
Coste	++	+	++

NGS, next-generation sequencing; NGF, next-generation flow; PET, positron emission tomography; TC, tomografía computarizada. Tabla adaptada de Mina y cols, [9].

INTRODUCCIÓN

Paralelamente al desarrollo de nuevas técnicas de detección de la ERM en MM, los criterios de respuesta también han ido variando en el tiempo con el fin de lograr una correlación con la respuesta clínica alcanzada. Así, puesto que la tasa de RC es cada vez mayor, los objetivos de la mayoría de las terapias actuales para los pacientes con MM de nuevo diagnóstico se centran en conseguir una ERM indetectable medida con metodologías más sensibles [10-13]. La importancia de la determinación de la ERM como valor pronóstico en el MM se reflejó en los nuevos criterios de respuesta para esta enfermedad revisado en el 2016 por el Grupo Internacional de Mieloma (*International Myeloma Working Group, IMWG*), que se resume en la **Tabla 3** [13]. En esta nueva versión se añadieron a los criterios convencionales de respuesta otros tres que identificaban respuestas más profundas mediante el empleo de tres técnicas: la negatividad de la ERM mediante *NGF*, definida por la ausencia de detección de CPP con una sensibilidad mayor de 10^{-5} , la negatividad de la ERM mediante técnicas moleculares (*NGS*), que precisa de la ausencia de secuencias clonales (<2 iguales) mediante plataforma *Lymphosight* (o método equivalente) con una sensibilidad mayor de 10^{-5} y la ERM negativa con imagen negativa por *PET/TC*, que requiere una ERM negativa en MO (por CMF o secuenciación) más la ausencia de enfermedad por técnica de imagen (*PET/TC*). Además, cuando esta respuesta medida por ERM e imagen se confirma en dos determinaciones con un año de separación, se habla de ERM negativa mantenida [13].

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Nuevos criterios de repuesta revisados para el mieloma múltiple del IMGW (2016)

Criterios de ERM del IMWG (requiere de respuesta completa)	
Respuesta completa con enfermedad residual mínima (ERM) negativa	<ul style="list-style-type: none">• ERM negativa por NGF: ausencia de CP anormales por CMF de última generación en AMO procesados siguiendo los criterios de EuroFlow o método equivalente validado con una sensibilidad mínima de 1 en 10^5 células nucleadas o superior.• ERM negativa por NGS: ausencia de CP clonales por NGS en AMO. La definición de clonalidad requiere dos lecturas de secuencia idénticas utilizando una plataforma <i>LymphoSIGHT</i> o método equivalente validado para la detección de ERM y con una sensibilidad mínima de 1 en 10^5 células nucleadas o superior.• Pruebas de imagen y ERM negativas: ERM negativa definida en los apartados anteriores más supresión de todas las áreas de captación de radio trazador objetivadas en una PET/TC basal o previa o descenso de la captación SUV respecto al tejido normal de partes blandas adyacente.• ERM negativa mantenida: criterios de negatividad por imagen y NGF, NGS o ambas, confirmada con al menos un año de diferencia. Las reevaluaciones consecutivas deben especificar la duración de la negatividad (p.ej. ERM negativa a los 5 años).
Criterios de respuesta estándar del IMWG	
Respuesta completa (RC)	<ul style="list-style-type: none">• Inmunofijación en suero y orina negativas.• < 5% de células plasmáticas en MO.• Desaparición de los plasmocitomas. Si enfermedad solo medible por CLLs, cociente CLLs normal.
Respuesta completa estricta (RCs)	<ul style="list-style-type: none">• Lo anterior más:<ul style="list-style-type: none">• Cociente CLLs normal.• Ausencia de CP clonales en MO (inmunohistoquímica). La presencia de clonalidad se basa en el cociente $\kappa/\lambda \leq 4:1$ o $\geq 1:2$ para κ y λ, respectivamente y se requiere un conteo mínimo de 100 CP.

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Continuación

Criterios de respuesta estándar del IMWG(continuación)	
Muy buena respuesta parcial (MBRP)	<ul style="list-style-type: none">• CM en suero y orina no cuantificable, pero persistencia de inmunofijación positiva en suero y/o orina, o• Disminución de $\geq 90\%$ del CM en suero y CM en orina < 100 mg/24 h.• En pacientes cuya enfermedad solo sea medible por CLLs, disminución $\geq 90\%$ en la diferencia del valor absoluto de las CLLs involucrada menos no involucrada con cociente CLLs persistentemente anormal.
Respuesta parcial (RP)	<ul style="list-style-type: none">• Reducción de $\geq 50\%$ y $< 90\%$ del CM en suero y de $\geq 90\%$ del CM en orina o < 200 mg/24 h.• Si la enfermedad solo es medible por CLLs, se requiere la disminución del $\geq 50\%$ en la diferencia del valor absoluto de las CLLs involucrada menos las no involucradas con cociente persistentemente anormal.• Reducción de $\geq 50\%$ el tamaño de los plasmocitomas.• Si el CM en suero y/o orina y las CLLs no son medibles, se requerirá una disminución $\geq 50\%$ de las CP, suponiendo que el porcentaje basal de CP es $\geq 30\%$.
Respuesta mínima (RM)	<ul style="list-style-type: none">• Reducción entre un 25 y un 49% del CM en suero.• Reducción entre un 50 y un 89% del CM en orina (> 200 mg/24 h).• Reducción entre un 25 y un 49% del tamaño de los plasmocitomas.
Enfermedad estable (EE)	<ul style="list-style-type: none">• No cumple criterios de RCs, RC, MBRP, RP, RM o EP.

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Continuación

Criterios de respuesta estándar del IMWG(continuación)	
Progresión (EP)	<ul style="list-style-type: none">• Si existe ≥ 1 de los siguientes supuestos:<ul style="list-style-type: none">• Incremento $> 25\%$ desde los valores basales de:• CM en suero (con incremento absoluto $\geq 0,5$ g/dL). Si el CM en suero inicial era ≥ 5 g/dL, son suficientes incrementos de ≥ 1 g/dL.• CM en orina (con incremento absoluto ≥ 200 mg/24h).• En pacientes sin enfermedad medible en suero u orina: incremento > 100 mg/L en la diferencia entre los niveles de CLLs involucrada y no involucrada.• Solo en pacientes sin enfermedad medible en suero ni en orina ni por CLLs: Incremento en el porcentaje de CP medulares $\geq 10\%$.• Aparición de nuevas lesiones óseas o plasmocitomas de partes blandas o incremento del tamaño de los previamente existentes.
Recaída clínica	<ul style="list-style-type: none">• Requiere uno o más de los siguientes:<ul style="list-style-type: none">• Los indicadores directos de incremento de la enfermedad y/o disfunción de órganos (criterios CRAB)¹.• Desarrollo de nuevas lesiones óseas o plasmocitomas de partes blandas. Las fracturas osteoporóticas no son criterios de progresión.• Incremento de lesiones óseas o plasmocitomas de partes blandas ya conocidos. Este incremento se define como del 50% (al menos de 1 cm), medido de forma seriada por la suma de los productos de los diámetros cruzados de las lesiones medibles.• Hipercalcemia (>11 mg/dL).• Descenso de la cifra de hemoglobina de ≥ 2g/dL.• Creatinina sérica de 2 mg/dL o más.• Síndrome de hiperviscosidad atribuido al CM.
Recaída desde la RC	<ul style="list-style-type: none">• Se requiere uno o más de los siguientes (útil para medir la SLP):<ul style="list-style-type: none">• Reparición de CM sérico o urinario por inmunofijación o electroforesis.• Aparición de $\geq 5\%$ CP en MO.• Aparición de cualquier signo de progresión clínica.

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Continuación

Criterios de respuesta estándar del IMWG (continuación)

Recaída desde la ERM negativa	<ul style="list-style-type: none">• Se requiere uno o más de los siguientes (útil para medir la SLP):<ul style="list-style-type: none">• Pérdida de la ERM negativa por <i>NGF</i> o <i>NGS</i>.• Reparación de CM sérico o urinario por inmunofijación o electroforesis.• Aparición de $\geq 5\%$ CP en MO.• Aparición de cualquier signo de progresión clínica (nuevos plasmocitomas, lesiones líticas o hipercalcemia).
--------------------------------------	--

IMWG, Internationa Myeloma Working Group; AMO, aspirado de médula ósea; MO, médula ósea; CP, células plasmáticas; CM, componente monoclonal; h, horas; NGF, next generation flow; NGS, next generation sequencing; PET/TC, positron emission tomography/tomografía computarizada; CLLs, cadenas ligeras libres en suero; SLP, supervivencia libre de progresión; CRAB, calcium elevation, renal failure, anemia, bone abnormalities. Tabla adaptada de Kumar y cols, [13].

¹Definición de criterios CRAB: Hipercalcemia: calcio sérico $> 0,25$ mmol/L (>1 mg/dL) del límite superior de la normalidad o $>2,75$ mmol/L (> 11 mg/dL). Insuficiencia renal: aclaramiento de creatinina < 40 mL/min o creatinina sérica > 177 μ ol/L (> 2 mg/dL). Anemia: descenso de Hb > 2 g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad o Hb < 10 g/dL. Lesiones óseas: lesiones osteolíticas por radiología convencional con TC de baja dosis de cuerpo entero o PET/TC.

INTRODUCCIÓN

1.1.3. Citometría de flujo

La CMF es una técnica de análisis celular multiparamétrica basada en hacer pasar una suspensión de células alineadas de una en una por delante de un haz de luz de láser. Esta metodología permite el estudio individual de las células mediante, el análisis de la dispersión de luz y la emisión de fluorescencia. La fluorescencia aparece cuando el AcMo conjugado a un fluorocromo está a su vez unido a un antígeno presente en la célula. La CMF permite distinguir las células plasmáticas (CP), de otros grupos celulares nucleados en la MO y detectar los antígenos expresado de forma aberrante, refiriendo su porcentaje de forma individualizada del resto de poblaciones nucleadas de la MO.

1.1.4. Citometría de flujo multiparamétrica

Las ventajas de la CMF multiparamétrica incluyen la caracterización e identificación simultánea de múltiples parámetros celulares, tanto antígenos de superficie como intracitoplasmáticos permitiendo el análisis de un gran número de células en poco tiempo. Cada AcMo se encuentra conjugado a un fluorocromo que cuando interacciona con el láser se excitará a una longitud de onda emitiendo a su vez, luz en una longitud de onda superior. En la **Tabla 4**, se muestran algunos de los fluorocromos más utilizados. El número de antígenos que se van a poder estudiar simultáneamente depende del número de láseres distintos que integra el citómetro. El desarrollo de nuevos citómetros provistos de más láseres ha permitido el empleo de combinaciones con un mayor número de

INTRODUCCIÓN

anticuerpos, facilitando la inclusión de paneles de 8 a 12 marcadores obteniéndose, de este modo, información de más antígenos. Hasta hace relativamente poco tiempo, la mayoría de laboratorios disponían de citómetros para el análisis de cuatro fluorocromos o colores, pero actualmente cada vez más hospitales cuentan con equipos que pueden evaluar de 8 a 10 fluorocromos distintos, pudiendo detectar entre 10 y 12 antígenos simultáneamente en una célula.

Tabla 4. *Fluorocromos más frecuentemente empleados en citometría de flujo*

Fluorocromo	Pico de Excitación (nm)	Pico de Emisión (nm)
FITC	495	520
PE	565	575
Per-CP	490	670
PE-Cy7	565	770
BV	405	421
Pacific Blue	405	455
Amcyan	405	490
Pacific Orange	405	550
APC	650	660
APC-Cy7	650	770

FITC, isocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, proteína de clorofila de peridina; Cy, cianina; BV, brilliant violet; APC, aloficocianina. Tabla adaptada de N Puig [14].

INTRODUCCIÓN

1.1.5. Citometría de flujo de nueva generación de alta sensibilidad y su estandarización

La *NGF* es una estrategia propuesta por el consorcio internacional EuroFlow concebida principalmente para:

- Aumentar la sensibilidad de la técnica hasta rangos similares a los métodos moleculares de aproximadamente 1×10^{-6} , mediante el análisis de grandes volúmenes celulares (10^6 células o más).

- Eliminar toda la subjetividad posible asociada a las características de los reactivos, parámetros de identificación de las células o a las herramientas de análisis, apostando por un enfoque altamente sensible y estandarizado del procesamiento de la muestra y del análisis de datos.

La *NGF* abarcan todos los aspectos metodológicos de la técnica entre los que se incluyen:

- La elección del panel de AcMo (clon, fluorocromo, titulación...).
- La preparación de la muestra.
- La estrategia de análisis.
- Informe de resultados.
- El uso de bases de datos automatizadas.
- La realización de controles de calidad.

INTRODUCCIÓN

1.2. Citometría de flujo y mieloma múltiple

1.2.1. Citometría de flujo en el análisis de células plasmáticas

El papel de la CMF en el estudio de las enfermedades de las CP abarca tres objetivos:

- Diagnóstico primario basado en caracterizar y cuantificar las CP y determinar la proporción de CPP o clonales.
- Identificación de factores pronósticos, en particular el riesgo de progresión de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y el MM asintomático basado en el porcentaje de células plasmáticas normales (CPN)/CPP.
- Cuantificación de la ERM utilizada para evaluar la eficacia del tratamiento y el pronóstico en cuanto al estado de la enfermedad.

1.2.2. Inmunofenotipo para el diagnóstico de las discrasias de células plasmáticas

La Red Europea de Mieloma (*European Myeloma Network, EMN*), publicó en 2008 un informe de consenso basado en una revisión de la literatura y en la opinión de expertos, en el que se abarcaba todos los problemas derivados de la evaluación de las enfermedades de las CP [15].

La primera aportación fue establecer los grupos de diferenciación (CD, *cluster differentiation*) o marcadores, CD38, CD138 y CD45 que mejor diferencian a la CP del resto de

INTRODUCCIÓN

poblaciones celulares nucleadas. Una vez identificadas las CP, el segundo objetivo era discriminar las CPP de las CPN, por una parte, mediante la expresión de marcadores aberrantes de superficie y, por otra, demostrando la clonalidad con el análisis de las cadenas ligeras intracitoplasmáticas κ/λ . Respecto a los marcadores aberrantes de superficie se concluyó que un solo antígeno no podía discriminar las CPP de las CPN, proponiendo finalmente la expresión de un perfil antigénico que incluía: CD19-, CD56++, CD117+, CD20+, CD28++, CD27-, CD81-, CD200++ como los marcadores más útiles. La expresión intensa de CD56 y la ausencia de CD19 se consideró un inmunofenotipo (IFE) atípico característico de la CPP (aplicable en más del 90% de los pacientes) que junto al análisis de CD20, CD117, CD28 y CD27 podría abarcar el 95% de los pacientes.

El mayor inconveniente de la aplicabilidad de la CMF en muchos laboratorios era que la mayoría de paneles de consenso de anticuerpos para enfermedades hematológicas, se habían basado en la opinión y experiencia individualizada de expertos hasta que el consorcio EuroFlow en 2012, [16] publicó los paneles de cribado de ocho colores que habían sido validados para el diagnóstico de las principales neoplasias hematológicas, estos, habían sido probados en múltiples combinaciones y en varios laboratorios diferentes, testando muestras de pacientes y de voluntarios sanos. En la validación de dichos paneles se evaluó de forma exhaustiva el clon y fluorocromo de cada AcMo así como el volumen de marcaje.

INTRODUCCIÓN

Los pilares principales en el diseño de los paneles de anticuerpos eran dos: (I) inclusión de marcadores comunes que identificaba la población a estudio y (II) empleo de AcMo para la caracterización de la población diana y la identificación de todos los subtipos celulares relevantes en la muestra.

Además, hasta este momento todas las guías de consenso carecían de información sobre los clones de anticuerpos de referencia para los marcadores de CD propuestos. En este documento también se indicaba para cada reactivo el clon y su fluorocromo conjugado, de forma que fueron seleccionados aquellos con niveles de fluorescencias más óptimos no sólo individualmente, sino también en el conjunto del tubo multicolor de nuevo diseño.

En el caso del panel de las enfermedades de las CP, cabe destacar que fue el único en el que la selección de marcadores iniciales se mantuvo hasta el final, evidenciando la consistencia de lo ya referido en la literatura. Se seleccionaron 12 marcadores que se distribuyeron en dos combinaciones (tubos): CD38, CD138 (marcador específico de CP), CD45, CD19, CD56, β 2 microglobulina, CD27, CD28, CD81, CD117 y las Ig intracitoplasmáticas (Ig(c)) κ/λ (Ig $\kappa(c)/Ig \lambda(c)$). El tubo 1 demostró ser suficiente para la identificación y discriminación entre CPP/CPN, dejando el tubo 2 como opcional solo en casos dudosos. Los problemas técnicos más relevantes incluyeron los niveles altos de autofluorescencia de las CP para CD38 y β 2-microglobulina, escogiendo fluorocromos para estos

INTRODUCCIÓN

marcadores con menor perfil de intensidad, FITC, (isocianato de fluoresceína) y PerCP-Cy5.5 (proteína de clorofila de peridina-cyanina 5.5), respectivamente y mezclándolos con un reactivo no conjugado. El clon de Ig λ (c)-FITC también resultó ser demasiado intenso en positividad por lo que se cambió por Ig λ (c)-ACPH 7 (aloficocianina-Hilite 7) y el CD45 se prefirió en PacB (*Pacific Blue*). El panel final se muestra en la **Tabla 5**.

INTRODUCCIÓN

Tabla 5. Panel de consenso del consorcio EuroFlow para el diagnóstico del mieloma múltiple

Tubo	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy 5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD45	CD138	CD38	CD56	β2micro	CD19	Ig κ(c)	Ig λ(c)
2	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81
Marcador	Fluorocromo	Clon	Casa comercial	Nº catálogo	μl/Test			
CD19	PECy7	J3-119	BC	IM3628	5			
CD27	PerCPCy5.5	L128	BD	649805	10			
CD28	PE	L293	BD	348047	20			
CD38	FITC	LD38	Cytognos	CYT-38F	3			
CD38	Pure	LD38	Cytognos	CYT-38P1	2			
CD45	PacB	T29/33	Dako	PB986	5			
CD56	PE	C5.9	Cytognos	CYT-56PE	5			
CD81	APCH7	JS-81	BD	646791	5			
CD117	APC	104D2	BD	333233	5			
CD138	PacO	B-A38	Exbio	PO-520	4			
β2micro	PerCPCy5.5	Tü99	BD	646781	4,75			
β2micro	Pure	Tü99	BD	555550	0,25			
Ig κ(c)	APC	Polyclonal rabbit serum	Dako	C0222	2.5			
Ig λ(c)	APCH7	1-155-2	BD	646792	4			

BD, Becton Dickinson, San José, California, EE. UU; BC, Beckman Coulter, Miami, Florida, EE. UU; PE, ficoeritrina; Cy7, cianina7; PerCP, peridina clorofila proteína; Cy5.5, cianina 5.5; FITC, isotiocianato de fluoresceína; PacB, pacific blue; APC, alofocianina; H7 hilita 7; PacO, pacific orange ; Ig(c), inmunoglobulina intracitoplasmática. Tabla adaptada de Van Dongen y cols, [16].

INTRODUCCIÓN

1.3. Enfermedad residual mínima en mieloma múltiple mediante citometría de flujo

1.3.1. Evolución de la determinación de la enfermedad residual mínima en mieloma múltiple por citometría de flujo

Inicialmente, las combinaciones de anticuerpos para la determinación de la ERM en el MM se construyeron típicamente con paneles adaptados a las alteraciones observadas en el IFE del diagnóstico de cada paciente [17, 18]. Dicho enfoque requería la disponibilidad de una muestra de diagnóstico en la que se había probado un número relativamente grande de marcadores aplicables a la ERM de mieloma por paciente. Posteriormente, se propusieron, basándose en los fenotipos aberrantes encontrados en el momento del diagnóstico, paneles de anticuerpos de cuatro a seis colores fijos que cubrían los fenotipos alterados comunes a la mayoría de los casos de MM (> 90%) sin el requisito de una muestra de diagnóstico inicial [19, 20]. De esta manera, se diseñaron y validaron por diferentes grupos, múltiples paneles de anticuerpos (**Tabla 6**), en los que se usaban entre cuatro y seis colores por tubo, adquiriendo entre 100.000 y 500.000 células (sensibilidad de 10^{-4}), sin ninguna estandarización consensuada en la forma de procesar la muestra, analizarla y redactar el informe de resultados.

INTRODUCCIÓN

Tabla 6. Paneles iniciales de CMF para la enfermedad residual mínima en mieloma múltiple

COMBINACIÓN	REFERENCIA
<ol style="list-style-type: none"> 1. CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCCPy5.5/CD45-APC 2. CD138-FITC/CD28-PE/CD33-PerCCPy5.5/CD38-APC 3. CD20-FITC/CD117-PE/CD138-PerCCPy5.5/CD38-APC 	Sarasquete y cols. Haematologia 2005[21]
<ol style="list-style-type: none"> 1. Ig λ(c)-FITC/CD19-PE/Ig κ(c)-PECy5/CD38-PECy7/CD138-APC/CD45-APC Cy7 	De Tute y cols. Leukemia 2007[22]
<ol style="list-style-type: none"> 1. CD19-FITC/CD56-PE/CD38-PerCP Cy5.5/CD138-APC 2. CD45-FITC/CD52-PE/CD38-PerCCPy5.5/CD138-APC 3. CD20-FITC/CD117-PE/CD38-PerCP Cy5.5/CD138-APC 	Gupta y cols. Am J Clin Pathol 2009[23]
<ol style="list-style-type: none"> 1. CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCCPy5.5/CD45-APC 2. CD38-FITC/CD27-PE/CD45-PerCCPy5.5/CD28-APC 3. β2 micro-FITC/CD81-PE/CD38-PerCP Cy5.5/CD117-APC 	Paiva y cols. J Clin Oncol 2011[19]
<ol style="list-style-type: none"> 1. CD27-FITC/CD56-PE/CD19-PerCCPy5.5/CD38-PE Cy7/CD138-ACP/CD45-APCCy7 2. CD81-FITC/CD117-PE/CD52-FITC/CD200-PE* 	Rawstron y cols. J Clin Oncol 2013[24]
<ol style="list-style-type: none"> 1. CD38-HV450/Ig κ(c)-FITC/CD56/CD28-PE/CD138-PE Cy5/CD19-PECy7/Ig λ(c)-ACP/CD45-APC H7 	Robillard y cols. Blood Cancer J 2013[25]

CMF, citometría de flujo; ERM enfermedad residual mínima; MM, mieloma múltiple; FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; Cy5.5, cianina 5.5; APC, alofocianina; Cy7, cianina7; H7 hilite 7; Ig(c), inmunoglobulina intracitoplasmática; * en algunos casos dudosos. Tabla adaptada de Flores-Montero y cols,[26].

INTRODUCCIÓN

Respecto a establecer la clonalidad celular mediante el estudio de las cadenas ligeras, en el seguimiento con ERM, inicialmente se dudó de su utilidad porque en la evaluación de κ/λ por sí sola, la restricción de la cadena ligera, sólo se hace evidente cuando la población monoclonal representa más del 30% del fondo policlonal. No obstante, este problema podía resolverse combinando las cadenas ligeras con el IFE de superficie incorporando el análisis con seis colores. Dos paneles propuesto por los grupos de Salamanca y Leeds, [15, 22]: Ig $\kappa(c)/Ig \lambda(c)/CD19/CD56/CD38/CD45$ e Ig $\lambda(c)/CD19/Ig \kappa(c)/CD138/CD38/CD45$, respectivamente, fueron ampliamente aceptados, pudiendo detectar CPP con un límite de detección del 0,01%, es decir, 20 CPP por cada 200.000 leucocitos o una sensibilidad de 10^{-4} . Esto constituye lo que hoy se ha considerado la CMF de primera generación.

Como consecuencia del abundante arsenal terapéutico disponible frente a la enfermedad que está surgiendo en los últimos años y al importante aumento de pacientes en RC, la obtención de una ERM indetectable se ha propuesto como un biomarcador de la eficacia del tratamiento en MM. Para que esto sea aceptado por todos los grupos implicados en el manejo de pacientes con MM sería necesario cumplir las siguientes condiciones: (1) la determinación de la ERM debería reemplazar el valor pronóstico de la RC; (2) los resultados del análisis tendrían que ser reproducibles; (3) debería ser aplicable a todos los pacientes [6]. Sin embargo, un estudio

INTRODUCCIÓN

realizado comparando varios laboratorios reveló importantes niveles de variabilidad entre los centros, tanto en la combinación de marcadores y anticuerpos empleada como en el número de células analizadas, lo que condicionó una sensibilidad diferente. Todos estos factores harían imposible la comparación y reproducibilidad de resultados entre los centros evaluados [27].

Atendiendo a la necesidad imperiosa de utilizar la ERM como un biomarcador del tratamiento del MM, en enero de 2016 se publican en un solo volumen [28], varios artículos con pautas de consenso en las que se ofrecen unas recomendaciones prácticas basadas en el trabajo de expertos reconocidos internacionalmente en el campo de la citometría y miembros de las sociedades internacionales como la *International Clinical Cytometry Society (ICCS)* y europeas como la *European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA)* de citometría. Así, Landgren y cols, respaldan el impacto pronóstico de la ERM en MM [29], Rawstron y cols, propugnan la necesidad de dar solidez a la prueba [30], Stelzer-Stevenson y cols, debaten el marcaje más óptimo proponiendo un panel de 8 fluorocromos que ya había sido usado en estudios previos por el consorcio EuroFlow y PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) con el fin de poder detectar 20 células tumorales en la adquisición de dos millones de células, alcanzando la técnica una sensibilidad de 1×10^{-5} que posteriormente se ha considerado la CMF de segunda generación [31] [32]. Arroz y cols, orientan sobre cómo se debe analizar los resultados y realizar

INTRODUCCIÓN

el informe [33], Oldaker y cols, establecen los requisitos mínimos de calidad para realizar tales pruebas [34], Wood y cols, plantean los principios de la ERM por CMF en la neoplasia hematopoyética [35] y Flores-Montero y cols, ofrecen una exhaustiva revisión sobre la selección de anticuerpos necesarios en el panel del estudio requeridos para diferenciar las CPP de las normales [26]. Como conclusión a todo lo anterior Rawstron y cols, [36] describen y resumen la información de las lecciones aprendidas durante 20 años de los estudios de ERM en MM, destacando los puntos prácticos a considerar al configurar la prueba de ERM de mieloma y los expertos de la *Food and Drug Administration (FDA)* proporcionan su perspectiva reguladora sobre las técnicas de detección de ERM en el mieloma [37]. Finalmente se plantean los problemas que surgirán en el futuro por las nuevas terapias con fármacos con dianas antigénicas como el anti-CD38 (daratumumab) que dificultan la detección de la molécula CD38 en la superficie celular de las CP dejando de ser este AcMo útil para la identificación de CP en aquellos pacientes tratados con estos fármacos [38, 39].

A continuación, se resume los aspectos más importantes abordados en esta guía de consenso agrupados en los siguientes apartados:

1.3.1.1. Resumen de los anticuerpos utilizados para discriminar las CPP en la detección de la ERM y panel recomendado para el marcaje de la muestra.

INTRODUCCIÓN

1.3.1.2. Recomendaciones para el marcaje, preparación y adquisición de las células.

1.3.1.3. Diseño de una estrategia adecuada para el análisis de la muestra.

1.3.1.4. Recomendaciones de requisitos mínimos de calidad que se deben establecer.

1.3.1.5. Condiciones necesarias en el informe de resultados.

1.3.1.6. Validación del ensayo de valoración de la enfermedad residual mínima por citometría de flujo en mieloma múltiple. Controles de calidad externos e internos.

1.3.1.7. Descripción y valoración de la información generada en los últimos 20 años.

INTRODUCCIÓN

1.3.1.1. Resumen de los anticuerpos utilizados para discriminar las CPP en la detección de la ERM y panel recomendado para el marcaje de la muestra

Flores-Montero y cols, [26] ofrecen en este documento de consenso una revisión de la literatura y una descripción exhaustiva de los AcMo más informativos que se han establecido en diferentes estudios, a lo largo del tiempo, para la determinación de la ERM en MM y que se resumen a continuación:

CD38: es una ectoenzima multifuncional que participa en la adhesión celular, la transducción de señales y la señalización del calcio. Se expresa en células precursoras CD34+ tanto mieloides como linfoides B, en los linfocitos maduros T y B activados, en las células NK y en los monocitos. Las CPN expresan el CD38 con una intensidad mucho mayor que el resto de células de la MO, por lo que se ha convertido en un marcador de referencia para la identificación de las CP, siendo además útil en la discriminación de las CPN y CPP por ser frecuentemente más débil en estas últimas [15, 17, 40-43]. A este respecto, se ha observado que la presencia de CD38 con intensidad de expresión baja, confiere peor pronóstico [44]. En un reciente artículo se ha relacionado con la osteoclastogénesis, por estar también presente en los osteoclastos inmaduros [44].

CD138: o molécula (Syndecan 1), [45] ha demostrado ser particularmente útil en la detección de CP pues dentro del sistema hematopoyético está restringido a ellas, por lo que es un marcador

INTRODUCCIÓN

específico de esta población celular. La introducción de reactivos anti-CD138 conjugados con colorantes muy brillantes (como *BV421*, *Brilliant Violet 421*) reveló expresión tenue también en otras poblaciones de células (p. ej., linfocitos). A su vez, algunas células mieloides pueden mostrar autofluorescencia basal inespecífica para CD138. Por otra parte, en muestras de CP envejecidas se puede observar una baja expresión de CD138, [46] así como en CP de muestras anticoaguladas con heparina debido a la redistribución de CD138 en la superficie celular después de la exposición a la heparina que puede afectar la disponibilidad del epítipo para su unión a los anticuerpos [47].

CD19: es un antígeno pan B que se expresa de forma heterogénea en la CP [15]. Está presente en dos tercios de las CPN y un 33% no lo expresan. Esto se debe a que las CP presentes en MO normales, van perdiendo expresión del antígeno CD19 en su maduración, siendo negativo en la etapa terminal de la célula. Por el contrario, no se expresa en la mayoría de CPP de las GMSI ni en las del MM [48-51]. Se ha demostrado en población sana que el eje de expresión de CD19-CD81 identifica tres subgrupos de CP de MO que son las CD19+/CD81+, CD19-/CD81+ y CD19-/CD81-, y que estos presentan una distribución diferente dentro del global de las CPN según la edad del individuo, observando que mientras que las poblaciones CD19-/CD81+ y CD19-/CD81- está prácticamente ausentes en personas sanas entre 10 y 20 años de edad, su proporción va progresivamente aumentado en persona más

INTRODUCCIÓN

mayores. A este respecto también se ha observado que las CPP de los pacientes con MM que presentaban el perfil fenotípico CD19+/CD81+ parecen tener un peor pronóstico [52, 53].

CD20: antígeno pan B que está ausente en las CPN y que se expresa de forma variable en las CPP. En las CP clonales varía del 2 al 90%, por lo que es un antígeno poco eficiente para distinguir las CPP de las normales [2] [51, 54]. La expresión de CD20 en CCP está asociada a la t (11; 14) [49, 55-57].

CD27: antígeno involucrado en la apoptosis celular, se observa uniformemente en las CPN, así como en las CP de pacientes con GMSI y su pérdida se ha correlacionado con la progresión de la enfermedad en estos casos [15, 58, 59]. También se ha relacionado la pérdida evolutiva de CD27 con progresión del MM y la falta de expresión de CD27 en el momento del diagnóstico se ha asociado con una supervivencia general más corta [60]. La información obtenida de la expresión genética ha demostrado que el grupo de MM con la mayor prevalencia de factores de mal pronóstico tenía los niveles más bajos de ácido ribonucleico de CD27 [55].

CD28: molécula que se expresa aberrantemente en las CPP [15, 61, 62]. Puede regular la transcripción del gen de la interleucina-8, una quimiocina que promueve la angiogénesis, contribuyendo así potencialmente a la progresión de la enfermedad. Esta relación ha sido observada en varios estudios [63, 64].

CD33: antígeno mielóide que las CP pueden expresar aberrantemente y se ha asociado con una enfermedad más agresiva

INTRODUCCIÓN

y con citogenética adversa con t (4; 14) [65, 66]. Se ha sugerido su expresión como marcador de resistencia a fármacos [67, 68].

CD45: proteína tirosina fosfatasa, expresada en la superficie de todos los leucocitos. Durante el desarrollo y diferenciación normales de la CP, hay una disminución progresiva in vivo en la expresión de CD45, siendo positivo en las CPN inmaduras, pero perdiendo expresión en las en CPN maduras de la MO. Así también, en la MO de pacientes con MM existen dos poblaciones de CPP distintas: CD45- y CD45+. Su papel en la biología de MM sigue siendo controvertido. En un estudio de 95 pacientes con mieloma sometidos a terapia intensiva, se observó una supervivencia más corta para los pacientes que carecían de la expresión de CD45 en las CP [69]. Sin embargo estos resultados no se confirman en todas las series, dos trabajos más recientes prueban que la presencia de $\geq 20\%$ de CPP en la MO que expresan CD45 tiene un valor pronóstico negativo en pacientes de nuevo diagnóstico de MM [70, 71].

CD54: molécula de adhesión (ICAM-1) que se expresa ampliamente en leucocitos y células endoteliales [72]. En lo que respecta a las CP, CD54 se expresa tanto en CP de voluntarios sanos, como en líneas celulares de MM, como en pacientes con MM. Se ha propuesto como alternativa para la identificación de CP a CD138/CD38 en los pacientes en tratamiento con anti-CD38 [39].

CD56: La expresión de CD56 (NCAM-molécula de adhesión de células neurales) se usa comúnmente para identificar CPP, ya que su expresión en CPN es muy baja respecto a las células clonales [55],

INTRODUCCIÓN

sin embargo se ha postulado que la expresión de CD56 puede ser artificialmente baja en el análisis de CMF, pues actuando como un ancla, las CP que expresen CD56 podría ser más resistente a la aspiración de MO [49]. A este respecto se ha observado que la falta o débil expresión de CD56 es un rasgo característico de la leucemia de CP, pero también define al diagnóstico un subtipo especial de MM, caracterizado principalmente por un potencial osteolítico más bajo y una tendencia a la circulación de las CP clonales en la sangre periférica [73]. Aunque no existe consenso, muchos estudios encuentran que la expresión de CD56 se asocia con mal pronóstico en MM [56][74].

CD81: es una tetraspanina ampliamente expresada en células B, incluidas las CP maduras, en un principio se observó que el CD81 no se detectaba en el 50% de CPP y en el resto la expresión era en su mayoría heterogénea y parecía que tenía un impacto negativo en la SLP y en la SG [75]. Como ya hemos mencionado los pacientes con MM cuyas CP presentan la combinación CD19+/CD81+ tienen peor pronóstico [52]. También se ha descrito que su detección en más del > 25% de las células de la ERM de pacientes tratados con MM, presentan una SLP inferior [44].

CD117: marcador que nunca está presente en las CPN, por lo que es muy eficaz para distinguirlas de las CPP que lo pueden expresar. Se ha demostrado que la expresión de CD117 disminuye durante la progresión de GMSI a la etapa avanzada de MM [76]. En

INTRODUCCIÓN

un estudio reciente, se encontró una relación entre la positividad de CD117 y una mayor supervivencia general [74].

CD200: glucoproteína de la superficie celular expresada en células B normales y algunas subpoblaciones de linfocitos T. Las CPN carecen de la expresión de CD200, [51] y se ha demostrado positividad en CP de MM hasta en el 78% en algunas publicaciones [77]. Las células positivas para CD200 presentan una inmunogenicidad reducida en comparación con los linfocitos [78]. Existe información contradictoria sobre su pronóstico, hay estudios que correlacionan su ausencia con un mejor pronóstico en comparación con la expresión en MM [77, 79] otros autores refieren lo contrario [80] o sugieren que no hay diferencia [81] y finalmente en algunos trabajos se indica que no está claro su papel [49].

CD307: antígeno de diferenciación expresado en células de estirpe B. Es un marcador que no se expresa en las CPN y por tanto su presencia es indicador de CPP. También se ha estudiado su expresión como marcador de malignidad en otras patologías linfoides B [82].

INTRODUCCIÓN

Continuando con la revisión del artículo de Flores-Montero y cols, [26], los autores destacan la importancia en la elección de los fluorocromos conjugados con los AcMo seleccionados para un panel, así, se prefieren aquellos de alta intensidad (BV421o, PE o ficoeritrina, PECy7 o ficoeritrina-cianina 7 y APC) para marcadores de expresión débil en la CP, tales como CD56, CD138 y CD117 y en contraste, los fluorocromos de baja intensidad (FITC) se asignan para los antígenos altamente expresados en CP como el CD38. Finalmente proponen que la mejor combinación de marcadores para la realización de ERM en MM es CD38, CD138 y CD45 para la identificación de las CP y CD19, CD56, CD27, CD81, CD117 para una mejor discriminación entre CPN y CPP.

1.3.1.2. Recomendaciones para el marcaje, preparación y adquisición de las células

Continuado con las guías de consenso, es interesante, el documento que elaboraron Stetler-Stevenson junto a un grupo de ocho especialistas en CMF en MM, en el que se explica los puntos más importantes para establecer un panel de AcMo para la detección de la ERM en esta patología [32]. Para ello, a la hora de elaborar el panel para ERM, uno de los factores más importantes que tuvieron en cuenta era la capacidad de discriminación del marcador entre normal y patológico. De todos los AcMo descritos previamente en la revisión de Flores-Montero y cols, únicamente el CD117 está exclusivamente en CPP, el resto se expresan en porcentajes distintos, también en CPN. Por tanto, la definición de

INTRODUCCIÓN

fenotipos de CPP no debería basarse en el análisis aislado de uno o algunos (por ejemplo, dos) marcadores, porque esto puede no proporcionar la sensibilidad requerida para la detección de ERM por CMF, debido a la presencia de muchos subtipos de CPN y/o reactivas fenotípicamente distintas que pueden encontrarse en la muestra. Por este mismo motivo, la valoración debe ser multiparamétrica analizando el perfil inmunofenotípico de todos los marcadores de la combinación a la vez para asegurar que la CP es clonal, y si es necesario evaluar de forma conjunta el IFE atípico con las cadenas intracitoplasmáticas κ/λ .

De hecho, el CD56 y CD19 han sido considerados tradicionalmente como suficientes para distinguir una CPP de una CPN, sin embargo, ahora está bien establecido que un subgrupo de CPN puede ser CD19- y/o CD56 + e incluso presentar baja o ausente expresión de CD45, por lo que hay una fuerte evidencia que indica que es necesario el análisis conjunto con CD27, CD81 y CD117 para diferenciar con seguridad una CPP de un CPN. Otra diferencia es que las CPN suelen mostrar expresión heterogénea o bimodal para CD19, CD56 y CD45, mientras que las CP neoplásicas de pacientes con MM generalmente tienen expresión antigénica más homogénea. Las CPP a menudo muestran anomalías adicionales, como la expresión CD117, más débil expresión de CD38 y en ocasiones parámetros de dispersión de luz aumentados, frontales o *FSC (forward scatter)* y/o laterales *SSC (sideward scatter)*. Cabe destacar que tales alteraciones inmunofenotípicas se presentan en

INTRODUCCIÓN

la misma población celular, mientras que las variaciones en las CPN tienden a ser heterogéneas y/o distribuirse entre los diferentes subtipos bien definidos de este compartimento celular [33]. Con respecto a la valoración de las cadenas ligeras intracitoplasmáticas κ/λ , en situaciones en donde la proporción de CP es escasa como sucede en la ERM, un pequeño porcentaje de CP clonales, podrían no alterar la relación κ/λ . Por esto, debería valorarse junto con los marcadores de la población sospechosa y poder comparar con las CPN en los casos dudosos. En resumen, el perfil inmunofenotípico alterado de las CP clonales se definiría en general por: CD38 infraexpresado, CD45 negativo o positivo débil y CD19 negativo en prácticamente todos los casos de MM y un CD56 positivo intenso en alrededor del 60-75% de todos los pacientes con expresión anormalmente bajas de CD27 y CD81 y positividad para CD117, CD28 y CD200. Este perfil antigénico junto con la evaluación simultánea de las cadenas ligeras intracitoplasmáticas κ/λ dentro de pequeñas poblaciones de CP sospechosas, definirían un panel de ERM para MM altamente sensible. Así, quedó nuevamente de manifiesto que los marcadores CD38, CD45 y CD138 son junto con los parámetros de dispersión de luz, la mejor combinación para identificar las CP. Finalmente Stetler-Stevenson y cols, establecen que el panel que había sido diseñado por el consorcio EuroFlow (AcMo, flourocromos conjugados, clon y marca comercial), validado con concordancia entre laboratorios y que había demostrado utilidad pronóstica en ensayos clínicos, era el más adecuado para el estudio de la ERM en MM. En la **Tabla 7** se muestra este panel

INTRODUCCIÓN

propuesto por el consorcio EuroFlow y adaptado por el grupo PETHEMA para el seguimiento de ERM en los protocolos de tratamiento. Además, estos mismos autores señalan que otra ventaja que ofrece este panel, es que sirve también para evaluar la calidad general del AMO, lo que permite validar la muestra. Esto se realiza mediante la identificación y cuantificación de las diferentes poblaciones celulares normales que se encuentran de forma habitual en la MO. Así, se puede discriminar las células B precursoras y maduras mediante CD19, CD45, CD38, CD27 y CD81, los precursores mieloides y los mastocitos por la diferente intensidad para CD117 y la serie eritroide con CD45. Además, estas combinaciones proporcionan controles internos positivos (ej: CD56 expresado en células NK) o negativos (ej: eritroblastos para todos los marcadores) que permiten evaluar los AcMo del panel. También se recomienda utilizar el mismo panel en la muestra pretratamiento.

INTRODUCCIÓN

Tabla 7. Panel de ocho colores para la ERM en MM, validado por el consorcio EuroFlow y adaptado por el grupo PETHEMA

Fluorocromo	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PECy7	APC	APCC750	V450	BV510
Tubo 1								
Marcador	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CD138	CD27
Clon	L38	C5.9	HI30	J3-119	104D2	M38	MI15	O323
Empresa	Cytognos	Cytognos	EBioscience	BC	BD Biosciences	Cytognos	BD Biosciences	Biolegend
Tubo 2								
Marcador	CD38	CD56	CD45	CD19	Ig κ(c)	Ig λ(c)	CD138	CD27
Clon	L38	C5.9	HI30	J3-119	policlonal	policlonal	MI15	O323
Empresa	Cytognos	Cytognos	EBioscience	BC	Dako	Cytognos	BD Biosciences	Biolegend

ERM, enfermedad residual mínima; MM, mieloma múltiple; PETHEMA, Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas; FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina; Cy, cianina; V, violeta; BV, Brilliant Violet; BD, Becton Dickinson, San José, California, EE. UU; BC, Beckman Coulter, Miami, Florida, EE. UU. Tabla adaptada de Stetler-Stevenson y cols, [32].

INTRODUCCIÓN

Cómo últimas recomendaciones recogidas por Stetler-Stevenson y cols, [32] se resumen a continuación los puntos más importantes sobre la preparación y adquisición de la muestra:

El procedimiento de marcaje de las células para el estudio de ERM en MM en los laboratorios clínicos está actualmente restringido a MO.

La muestra debe estar preferiblemente anticoagulada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), aunque se acepta la heparina (CD138, un heparan proteoglicano sulfato, puede mostrar disminución de la intensidad de fluorescencia) mientras que el ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa) no debe usarse porque altera el pH de la muestra y la viabilidad de las células.

El espécimen puede mantenerse a temperatura ambiente y debe procesarse lo antes posible, idealmente antes de las 24 horas y nunca después de las 48 horas de la extracción. En el caso de muestras insustituibles, si se realiza la técnica, se debe anotar en el informe final esta información.

En lo que respecta a la extracción de la muestra de MO, grandes volúmenes de aspirado presentan riesgo de hemodilución. Para minimizar este problema se aconseja aspirar sólo 1–2 mL de médula en cada tubo. Se debe evaluar la presencia de coágulos y la temperatura de la muestra: muy fría o excesivamente caliente al tacto. Posteriormente, durante o después de la adquisición de la muestra en el citómetro, se puede valorar la presencia de CP

INTRODUCCIÓN

apoptóticas y/o estimar la viabilidad celular (más de un 85% con muy bajo *SSC* y *FSC* sugieren un estado subóptimo de la celularidad). En el caso de ERM, debido a que las CP pueden estar presentes en cantidades bajas en los AMO post tratamiento, se recomienda el método de pre-lisis (paso previo de concentración de la muestra utilizando solución lisante de eritrocitos) para así obtener el marcaje de un mayor número de células por tubo con menor cantidad de AcMo.

La adquisición de muestras en el citómetro es similar a la de otros estudios, aunque a menudo requiere tiempos más largos debido al mayor número de células necesarias para el análisis. Para minimizar la contaminación, de un tubo a otro se recomienda realizar una limpieza de la aguja de aspiración entre muestra y muestra evitando el arrastre.

INTRODUCCIÓN

1.3.1.3. Diseño de una estrategia adecuada para el análisis de la muestra

Arroz y cols, [33] establecen las recomendaciones de consenso sobre el análisis de la muestra. En éstas, se insiste en que todos los estudios inmunofenotípicos en neoplasias hematológicas para la detección ERM se basan en el reconocimiento de características de las células tumorales, que difieren de las células normales de similar linaje y nivel de maduración. Para ello, es necesario el adecuado conocimiento del IFE y del grado de diferenciación de la celularidad normal por parte del especialista en citometría. La información de los fenotipos aberrantes observados al diagnóstico de la enfermedad puede servir de guía para buscar ERM, ya que el cambio del IFE en el MM no parece ser un fenómeno frecuente y por tanto no supone un problema. Cuando estos cambios suceden, parecen estar relacionados posiblemente con una selección clonal de varias poblaciones de CPP del diagnóstico. El número total de eventos incluye todas las células nucleadas (leucocitos y eritroblastos) y por tanto, las plaquetas, fragmentos de glóbulos rojos o restos de tejido se deben desechar. No parece que los hemolizantes con fijador alteren el número de eritroblastos.

INTRODUCCIÓN

Posteriormente se detallan los pasos de selección recomendados, incluyendo una estrategia de análisis con diferentes diagramas biparamétricos y etapas de evaluación:

Primero se seleccionarán las células plasmáticas totales (CPT) estableciendo una serie de diagramas biparamétricos de la siguiente manera (**Figura 1**):

I) Diagrama de CD38 vs tiempo para evaluar la calidad y la continuidad de los datos adquiridos.

II) Diagrama de los parámetros de dispersión de luz, frontales *FSC-H/FSC-A* (*forward scatter, Height/forward scatter, Area*) y laterales *SSC-H/SSC-A* (*sideward scatter Height/sideward scatter Area*), para excluir dobletes y *SSC-A/FSC-A* para eliminar partículas inespecíficas (color azul) con precaución de no eliminar CP hiperploides o tetraploides que presentan altos niveles de *FSC-A* y *SSC-A* pero bajo *FSC-H*.

III) Selección generosa CPT enfrentando CD38/CD138 y CD38/CD45 (color fucsia).

INTRODUCCIÓN

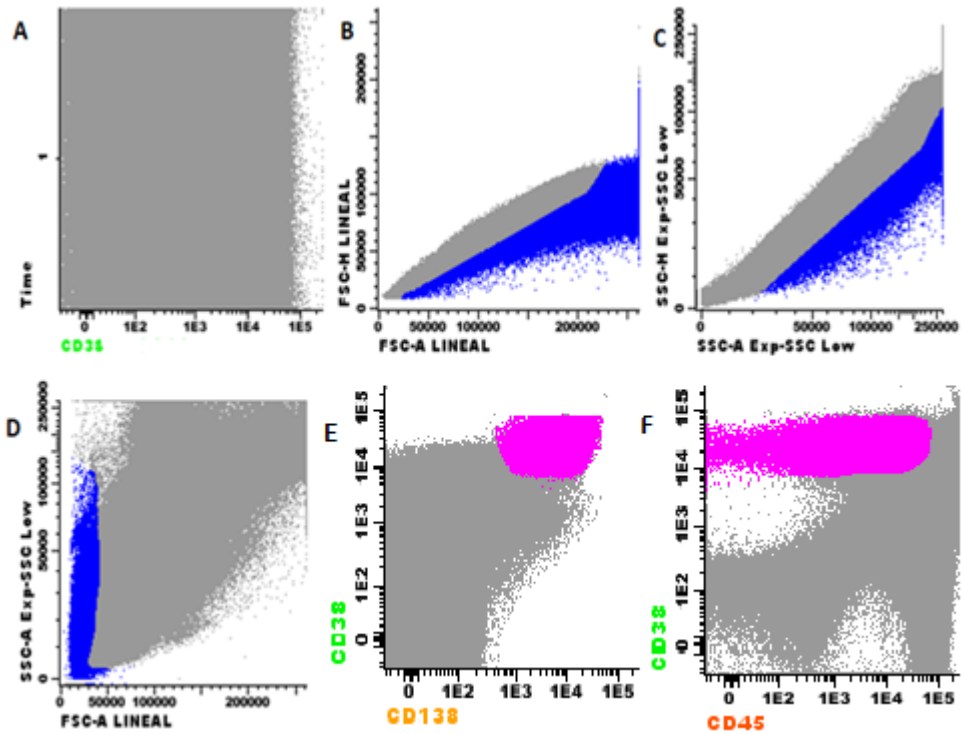


Figura 1. Diagrama utilizado para la seleccion de células plasmáticas totales.

Adaptado de Arroz y cols, [33]. CD38 vs tiempo (A). Enfrentar los parámetros de dispersión de luz, frontales FSC-H/FSC-A y laterales SSC-H/SSC-A (B y C) y SSC-A/FSC-A (D). Selección células plasmáticas totales, enfrentando CD38/CD138 y CD38/CD45 (E y F).

INTRODUCCIÓN

IV) A continuación, se procederá a la diferenciación de las CPN vs CPP con el resto de marcadores (CD19, CD27, CD81, CD56, CD117, Ig κ (c), Ig λ (c)) usando controles internos para evaluar positividad (células B para CD19 y CD81, células NK para CD56, progenitores mieloides y mastocitos para CD117) y negatividad (eritroblastos para CD45) (**Figura 2**).

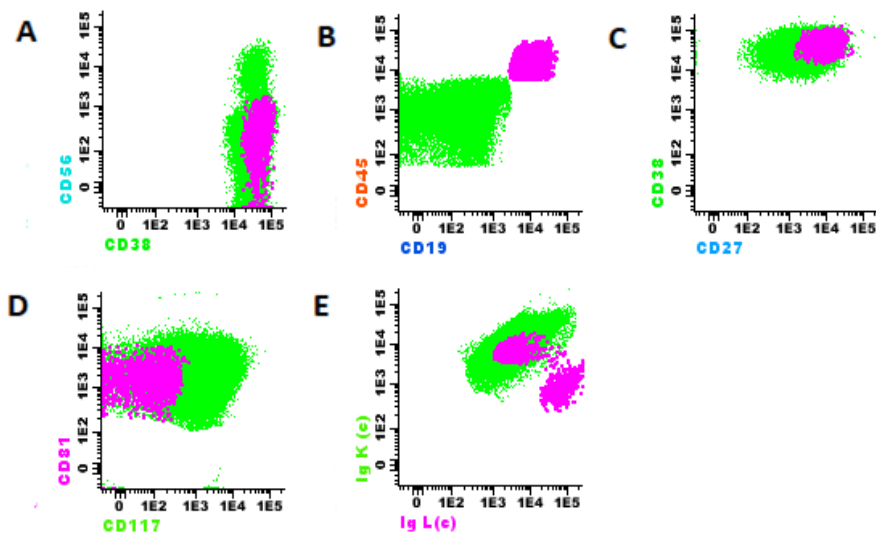


Figura 2. Diagramas para la identificación de las células plasmáticas patológicas. Adaptado de Arroz y cols, [33]. Células plasmáticas normales (en color fucsia) y patológicas (color verde), con los diferentes diagramas, se pone de manifiesto la expresión anormal de las células plasmáticas patológicas con, expresión en parte de CD56 y expresión más débil de CD38 (A), ausencia de expresión de CD19 y CD45 (B), expresión más débil de CD38 y CD27 (C), expresión de CD117 (D) y restricción de las células plasmáticas patológicas de cadena Ig κ (c) (E).

INTRODUCCIÓN

V) El IFE más común de CPN, podría describirse como CD38+++ , CD138++ , CD19+ , CD45+ , CD20- , CD27+ , CD28- , CD56- , CD81+ , CD117- , CD200-/+ , con una relación de, Ig κ (c)/Ig λ (c) policlonal.

VI) Algunas subpoblaciones de CPN (generalmente menos del 30% del total de CP) pueden mostrar patrones fenotípicos "atípicos" tales como: CD19- , CD45-/+ débil , CD20+ , CD27+ débil , CD28+ , CD56+ y CD200+ intenso.

VII) En contraste, las CP neoplásicas muestran fenotipos aberrantes: CD38 positivo débil (menor expresión que las CPN), CD19- , CD45- , CD20+ , CD27-/+ débil , CD28+ , CD56+ intenso , CD81- /+ , CD117+ , CD200 positivo intenso, en asociación con una relación, Ig κ (c)/Ig λ (c) monoclonal.

VIII) Aunque el cambio antigénico tras el tratamiento no es imposible, variaciones en cuanto a la expresión en estos marcadores de consenso, están generalmente ausentes en grandes cohortes de pacientes estudiados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el clon tumoral del diagnóstico puede mostrar diferentes subclones fenotípicos que deberían ser monitorizados durante toda la terapia. De hecho, se ha demostrado que la distribución de tales subclones puede fluctuar desde el diagnóstico y durante el seguimiento de las muestras de ERM, pero esto debe interpretarse como una selección clonal en lugar de un cambio fenotípico secundario al tratamiento. La disponibilidad del IFE del diagnóstico específico del paciente puede representar una valiosa ayuda

INTRODUCCIÓN

durante la monitorización de la ERM por CMF, aunque no es imprescindible para la evaluación.

IX) También se recomienda, particularmente en el contexto de ensayos multicéntricos, la disponibilidad de un archivo de casos de referencia con un número mínimo de veinte muestras de CPN y CPP inmunofenotipadas usando exactamente el mismo panel de AcMo y el mismo procedimiento de preparación de muestras.

X) La discriminación entre CPN y CPP deben ser multiparamétrica, es decir, la identificación de una población de CP neoplásicas nunca debe estar basado en la desviación aislada de un solo marcador.

XI) Se recomienda usar las nuevas herramientas que poseen los programas de análisis que permiten la separación automática de las subpoblaciones existentes como los diagramas APS (separación automática de poblaciones).

1.3.1.4. Recomendaciones de requisitos mínimos de calidad que se deben establecer

Otro aspecto del que nos alertan en las recomendaciones de consenso sobre el estudio de la ERM en MM [28], es la importancia de la calidad del aspirado medular. Arroz y cols, [33] y Oldaker y cols, [34] describen el límite inferior de detección (*LOD*) y el límite inferior de cuantificación (*LOQ*) como parámetros más informativos de la calidad de la muestra como había propuesto inicialmente el Colegio de Patólogos de Estados Unidos [83].

INTRODUCCIÓN

Límite inferior de detección (LOD) y límite inferior de cuantificación (LOQ)

La sensibilidad en CMF depende del número de células patológicas detectadas y del número total de células analizadas. La sensibilidad del 0,01% o de 1×10^{-4} consiste en la capacidad de detectar una célula neoplásica entre 10.000 células normales analizadas. En el consenso de 2008 [15], se estableció la identificación de un mínimo de 100 CPP para considerar una ERM positiva, esto se basó en la necesidad de conseguir un coeficiente de variación (CV) $<10\%$, deseable para la precisión de un ensayo. El número de eventos necesarios para que un resultado sea reproducible se calcula por la estadística de Poisson, en la que el grado de variabilidad se expresa como el CV que puede calcularse como $100/\sqrt{N}$ donde N es el número de eventos de la población patológica que se pretende identificar. Por lo tanto, una población patológica que consiste en 100 eventos tendrá un CV del 10% [84]. Para el análisis de eventos que representan una proporción muy escasa de la muestra como sucede en los estudios de ERM en MM, se admite un CV de $\leq 30\%$. Con los avances en el análisis por CMF, es posible detectar pequeñas poblaciones anormales, con sensibilidades tan bajas como 0,005%. Basado en la distribución de Poisson, para obtener una sensibilidad de 0,005%, se requiere la adquisición de al menos 2.000.000 de eventos valorables con un mínimo de 100 CPP que corresponden a un CV de $\leq 30\%$. Finalmente, Arroz y cols, establecen el LOD o valor mínimo en la que una

INTRODUCCIÓN

población homogénea en un archivo de CMF puede ser identificado por un analista experimentado como $(30/\text{número total de células analizadas}) \times 100\%$. Y el *LOQ* o umbral suficiente para la cuantificación de una población celular por un especialista como $(50/\text{número total de células analizadas}) \times 100\%$. Por lo tanto, el *LOD* y *LOQ* dependerán del número total de células analizadas en la muestra, como se muestra en la **Tabla 8**.

INTRODUCCIÓN

Tabla 8. Valores del LOD y LOQ según el número de células analizadas

Número total de células analizadas	LOD (%)	LOQ (%)
100.000	0,03	0,05
200.000	0,015	0,025
500.000	0,006	0,01
1.000.000	0,003	0,005
2.000.000	0,0015	0,0025
3.000.000	0,001	0,0017
5.000.000	0,0006	0,001

$$\text{LOD} = (30/\text{Células totales}) \times 100\%; \text{LOQ} = (50/\text{Células totales}) \times 100\%$$

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification. Adaptada de Arroz y cols, [33].

1.3.1.5. Condiciones necesarias en el informe de resultados

Una parte fundamental del resultado de un estudio es la forma de realizar el informe. En este sentido Arroz y cols, [33] continúan su aportación al documento de consenso [28], detallando varias recomendaciones:

Se propone indicar para cada antígeno el patrón de expresión como reducido, normal o aumentado, tras compararlo con el que presentan las CPN procesadas con los mismos protocolos y utilizando el mismo anticuerpo, combinaciones de reactivos, equipos y similares condiciones de la muestra, incluyendo además el porcentaje de células positivas para cada marcador, esto se ha denominado la firma inmunofenotípica.

INTRODUCCIÓN

El porcentaje de ERM se debe calcular respecto al total de células nucleadas de la muestra analizada. Así, el resultado de la ERM que debemos informar se obtendrá multiplicando, el número de CPP por 100 y dividiéndolo por el total de células hematopoyéticas nucleadas. Algunos hemolizantes (con cloruro de amonio o con fijadores), pueden afectar a la serie eritroide nucleada y por lo tanto al resultado por lo que se recomienda incluir en el informe el método de hemolizante utilizado.

En el informe debe constar, el número de eventos neoplásicos (CPP) y el número total de células nucleadas analizadas (eliminando dobletes e inespecificidad). Un *LOD* de 0,001% (adquisición de al menos 3 millones de células) tiene un demostrado valor pronóstico. Las nuevas metodologías han permitido obtener límites más sensibles, mejorando la capacidad de predicción de los resultados para la valoración de la calidad de la respuesta. Actualmente un *LOD* de 0,0006% supone una adquisición de 5×10^6 células nucleadas, actualmente esta cantidad es la recomendada para el estudio de ERM. Si la detección de CPP es negativa (<20 CPP) se debe informar del *LOD* de la muestra incluyendo el número total de células evaluadas. Ej: CPP <0,0004% (CPP <20 eventos, total de células analizadas: 5.000.000). Si la detección de CPP es mayor de 50, se debe informar el *LOQ*. Ej: CPP: 0,05% de las células (*LOQ* 0,0025%; CPP= 1000 eventos, total de células analizadas: 2.000.000). Si la detección de CPP está entre 20 y 50, no se puede informar el valor cuantitativo de ERM por lo que se debe indicar

INTRODUCCIÓN

ambos límites (*LOD* y *LOQ*). Ej: CPP: 0,004-0,001%, CPP: 35 eventos, total de células analizadas: 2.000.000). Otro resultado que debe ser incluido en el informe es la proporción de CPP respecto del total de CP, este dato proporciona información sobre la calidad de la muestra analizada y puede tener valor pronóstico. También debe constar en el informe, los parámetros que permiten valorar la calidad de la muestra como son los porcentajes sobre celularidad nucleada total de eritroblastos, precursores de células B, progenitores mieloides y mastocitos.

INTRODUCCIÓN

1.3.1.6. Validación del ensayo de valoración de la enfermedad residual mínima por citometría de flujo en mieloma múltiple. Controles de calidad externos e internos

Oldaker y cols, [34] y Wood y cols, [35], proporcionan unas guías para estandarizar el ensayo de la valoración de la ERM por CMF en los que por una parte cada laboratorio debería tener un sistema auditable de control de calidad interno (*IQC, Internal Quality Control*) y externo (*EQA, External Quality Assessment*) y analizar la especificidad, exactitud y estabilidad de su método como se detalla a continuación:

Especificidad

La especificidad analítica se define en función de que las CPP presentan un IFE diferente a las CPN. Una serie de factores influyen en la especificidad analítica del ensayo; los marcadores utilizados para definir la población de interés, la interacciones entre reactivos y la estrategia de análisis. Para establecer la especificidad de la prueba de ERM en MM, se debe evaluar un material que contiene la enfermedad (idealmente cerca del *LOD*) y muestras que no tienen la enfermedad. Los resultados se comparan y deben estar de acuerdo con los valores esperados. Especificidad analítica = $VN / (VN + FP)$ donde VN = verdadero negativo y FP = falso positivo. Para establecer la especificidad analítica debe analizarse un mínimo de 20 muestras de MO de pacientes sin enfermedad hematológica y los resultados deben ser negativos o al menos caer por debajo del *LOD*.

INTRODUCCIÓN

Exactitud

La exactitud corresponde a la cercanía entre los valores promedio obtenidos de una gran serie de pruebas y un estándar de referencia aceptado. En la CMF no existe un estándar conocido, por lo tanto, se requiere un enfoque alternativo para determinar si el ensayo está detectando el valor apropiado. El proceso de validación debe poder detectar la medición a un nivel del *LOD*. Las estrategias para garantizar la exactitud y el *LOD* para el ensayo ERM en MM pueden ser desarrollados mediante la elaboración de muestras control, diluyendo la MO de un paciente con CPP en cantidades conocidas en una muestra de MO normal de manera que el nivel más bajo de detección está por debajo del nivel de detección esperado del ensayo. Luego se realizan un mínimo de cinco ensayos en cada punto de dilución y se traza la variabilidad en cada uno obteniendo el coeficiente de variación. La dificultad de este proceso es obtener una muestra que contenga una cantidad significativa de CPP que se pueden utilizar en los experimentos y asegurar un cálculo preciso de la concentración final de dichas células.

Estabilidad

Las CP son frágiles y pueden deteriorarse rápidamente después de la extracción de la muestra. Si es probable que haya un retraso en el proceso de marcaje de las muestras de diagnóstico o de ERM de más de 24 horas en material recogido en EDTA o de 48 horas para muestras anticoaguladas con heparina de sodio, como podría suceder en laboratorios de referencia, se debe verificar que

INTRODUCCIÓN

los resultados del ensayo (tanto cualitativos como cuantitativos) no se modifican con el tiempo. Esto puede comprobarse analizando las mismas muestras para determinar ERM en diferentes tiempos tras la extracción. Se puede validar preferiblemente el *LOD* dentro las primeras 6 h de la extracción y luego posteriormente cada 6 a 12 horas. La equivalencia cualitativa de cada marcador, así como la capacidad de detectar positividad en el *LOD* determinará la estabilidad de la muestra. Es muy recomendable y en algunos ensayos es un requisito que cuando la muestra se analiza después de las 24 horas de la extracción incluya una evaluación de la viabilidad celular. Así, las muestras con viabilidades de menos del 85 al 90% no son adecuadas y no deben informarse. Una excepción, es cuando se trata de muestras difíciles de obtener e irremplazables, como un AMO. Si se informa una muestra con estas características, se debe indicar que la viabilidad estaba por debajo del estándar aceptable del laboratorio. Esto es porque la baja viabilidad de la celularidad está asociada con (a) la unión inespecífica de anticuerpos a células muertas, lo que puede dificultar la interpretación de patrones de tinción y restar precisión a la cuantificación de las poblaciones, (b) la reducción de la expresión de CD138 en CPP y (c) la disminución de la frecuencia de poblaciones de células frágiles que incluyen tanto las CPN como las CPP. Alternativamente, se puede emplear un estabilizador celular, sin embargo, se debe demostrar que el reactivo tiene capacidad para conservar las células sin afectar la integridad del antígeno durante el período en que las muestras estarán en tránsito.

INTRODUCCIÓN

El uso de cócteles de anticuerpos premezclados en el estudio de ERM en MM puede simplificar y estandarizar la configuración de la prueba y minimizar los posibles errores en el pipeteo. Si se decide utilizar cócteles de anticuerpos, se recomienda validar que los resultados son equivalentes a si la adición de reactivo se realiza de uno en uno. Esto se puede hacer comparando los resultados de una muestra en el *LOD*, mientras se usa el cóctel o cuando se emplean anticuerpos pipeteados de forma individual. La concordancia en la comparación de resultados definirá la estabilidad del cóctel en el tiempo.

Evaluación de calidad externa e interna

Se debe tener un sistema auditable *IQC* mediante el cual todos los aspectos del procedimiento se controlan para facilitar la identificación inmediata de problemas. Un objetivo deseable sería lograr la acreditación adecuada de las normas nacionales e internacionales siempre que sea posible (por ejemplo, ISO 15189). Un material común de *IQC* para citómetros de flujo es el uso de micropartículas para monitorizar compensaciones, fluidos, láser y voltajes del tubo fotomultiplicador del citómetro, en los que se establecen límites de aceptabilidad. También es importante el uso de micropartículas para estabilizar el citómetro después del mantenimiento del instrumento, restableciendo la configuración óptima. En la actualidad, no existen controles de calidad internos diarios para evaluar la calidad de la ERM en MM, por lo tanto, se debe usar otros controles como el de poblaciones linfocitarias que

INTRODUCCIÓN

de forma indirecta permite establecer la idoneidad del equipo. Otra forma de controlar la técnica es mediante la revisión de las poblaciones definidas como controles internos positivos y negativos dentro de cada muestra de paciente analizada. Por ejemplo, la intensidad de fluorescencia de CD45 en los linfocitos debería ser al menos 10 veces más brillante que en las células eritroides que no expresan CD45; CD19 en células B al menos 10 veces más brillante que las células NK usado como control negativo pues no expresan CD19; a la inversa la intensidad de CD56 en las células NK al menos 10 veces mayor que en las células B, usadas como control negativo. La expresión CD 138 en las CP debe compararse con la expresión en células progenitoras CD19/CD81 brillantes como controles negativos. La expresión de CD117 en mieloblastos se puede comparar con linfocitos que son negativos, etc. Esto puede establecer una valoración del marcaje aceptable para cada anticuerpo. Del mismo modo, cada lote de anticuerpos debe validarse completamente comparando las intensidades fluorescentes en paralelo entre el lote nuevo y el que estaba en uso. Esto puede no ser siempre posible con muestras normales para reactivos como CD117 y CD138, por lo que dichos AcMo deberían ser comparados en muestras de pacientes.

Actualmente existe un control de calidad externo en España para los especialistas en CMF de análisis del análisis de ERM en MM de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia

INTRODUCCIÓN

(SEHH). A nivel internacional, organizaciones como UK NEQAS está examinando posibles enfoques.

En definitiva, una prueba de ERM en MM fiable debe optimizarse y demostrar reproducibilidad y concordancia intra y entre laboratorios. Una alternativa al uso de controles externos es el intercambio periódico (cada 3 a 4 meses) de muestras entre laboratorios que permite evaluar y comparar resultados y discutir cualquier discordancia para determinar la causa de las discrepancias. La situación ideal es tener una técnica clínicamente validada a la que se adhiera cada centro, en el que cada laboratorio debe demostrar la concordancia utilizando su equipo de laboratorio, reactivos y personal técnico. Esta validación analítica es el proceso para probar que el procedimiento clínicamente validado funciona como debe y logra de manera consistente el resultado esperado para el uso previsto del estudio.

1.3.1.7. Descripción y valoración de la información generada en los últimos 20 años

Como conclusión a las guías de consenso [28], Rawstron y cols, [36] con amplia experiencia en la determinación de la ERM en MM en Leeds desde 1994, comentan en este documento los diferentes problemas que han ido surgiendo a lo largo de este largo periodo, aconsejando sobre algunos aspectos:

Utilidad de conocer el fenotipo de la enfermedad al diagnóstico:

INTRODUCCIÓN

El panel de anticuerpos consensuado para el estudio de ERM en MM que se ha mostrado en **Tabla 7**, es suficiente para discriminar las CPP de CPN en el 95% de los casos de MM. Sin embargo, existe una considerable heterogeneidad en el fenotipo de las neoplasias de CP y en alrededor un 5-10% de los casos puede ser difícil de interpretar si no se conoce el fenotipo de la enfermedad al diagnóstico, sobre todo cuando la cantidad de CP están en el límite de detección o presentan un fenotipo muy similar al de la CPN. La información fenotípica al diagnóstico puede ayudar en la identificación y confirmación de una pequeña población de CP neoplásicas y acelerar el análisis de la ERM. Por lo que la realización del panel de anticuerpos en una muestra de MO del diagnóstico se recomienda, aunque no es imprescindible.

Importancia de la calidad del aspirado en ensayos clínicos multicentro:

En el análisis de la calidad de la muestra, observaron, que existía mucha variabilidad entre centros que atribuyeron a las diferencias en la metodología del aspirado medular, así como a la distribución del material extraído. El primer volumen de extracción era el de mayor calidad y generalmente se utilizaba para el estudio morfológico. Posteriormente, para solucionar este problema, se explicó al personal de los distintos hospitales la necesidad de que el material de la primera extracción se destinara al estudio de la ERM, mejorando notablemente la calidad de las muestras lo que permitió que los resultados fueran comparables. Se consideró necesaria la

INTRODUCCIÓN

extracción de un volumen suficiente de MO que incluya de 10 a 20 millones de células. Considerando las pérdidas de celularidad por los procedimientos de marcaje, el objetivo es disponer, tras el proceso de la muestra, de un volumen final que incluya unos 5.000.000 de células para obtener un límite de cuantificación del 0,001%. Sin embargo, en muestras de MO post tratamiento en ocasiones es complicado obtener tanta celularidad. Tras evaluar un total de 880 estudio de ERM, en el 55% de ellos la cuantificación de la ERM fue >0,01% por lo que parece que en la mayoría de muestras no es necesaria tanta celularidad, este estudio propone un primer análisis tras una adquisición de con 2.000.000 y si la ERM no es detectable una segunda determinación aumentando la adquisición a 5.000.000 de células y recomiendan estrategias para centros en donde se realiza muchos estudios de ERM. En laboratorios en donde se analizan un número limitado de ERM se podría adquirir 5.000.000 de células en todos los casos. Se vuelve a insistir en una valoración post adquisición de la calidad de la muestra mediante un análisis de las poblaciones medulares que se pueden identificar con los anticuerpos utilizados en el panel.

1.3.2. Perspectiva reguladora de FDA sobre las pruebas de ERM en el mieloma

Prosiguiendo con los artículos de esta revisión [28], Gormley y cols, [37] informan sobre la situación de la aprobación de la determinación de ERM en MM como biomarcador por la FDA y los obstáculos que se deben superar para coseguirlo. En Estados

INTRODUCCIÓN

Unidos, la *FDA* es la agencia encargada de examinar la evidencia necesaria para la aprobación de un uso seguro y efectivo de un medicamento. Esta aprobación se basa en la demostración de un beneficio clínico directo (SG) o indirecto (mejoría funcional del paciente). Con el fin de permitir la rápida aprobación de medicamentos se puso en marcha, el Programa de Aprobación Acelerada (*Fast-Track*) que fue iniciado en 1922. Dentro de este programa, la conformidad más rápida se basa en el uso de resultados sustitutivos, como datos de laboratorio, pruebas de imagen o un signo físico u otra medida que pueda predecir un beneficio clínico. Los fármacos con aprobación acelerada pueden ser inicialmente utilizados en ensayos clínicos que usen este resultado como objetivo principal ya que, generalmente, requieren menos tiempo de seguimiento para demostrar diferencias que la SG. Dependiendo del entorno de la enfermedad oncológica, la subrogación de puntos finales que se han utilizado para obtener la aprobación acelerada incluye: SLP, tasa de respuesta global y tiempo hasta la progresión, entre otros. Los medicamentos aprobados en el marco del Programa de la Aprobación Acelerada *FDA* deben ser valorados en ensayos clínicos y deben demostrar un beneficio clínico; si posteriormente el medicamento no demuestra un beneficio clínico para los pacientes, la *FDA* podrá retirar la autorización.

El CDER (Centro de Evaluación e Investigación de Fármacos) desarrolló un proceso de calificación formal para posibles

INTRODUCCIÓN

biomarcadores que pudieran ser considerados resultados sustitutivos llamado “*Drug Development Tool (DDT) Qualification Programs*”. La calificación de biomarcador requiere evidencia científica sólida y debe ser independiente del dispositivo específico que realice la medición. La vía *DDT* no otorga autorización para comercializar el dispositivo como productos sanitarios para diagnóstico in vitro (*IVD*) y a la inversa. Los dispositivos de *IVD* son cualquier producto sanitario "reactivos, instrumentos y sistemas" destinados a ser utilizados en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones, incluida una determinación del estado de salud, para curar, mitigar, tratar o prevenir enfermedad o sus secuelas”. Un desafío para las pruebas de ERM en MM es que a pesar de haber un panel de ERM estandarizado para MM con dispositivos *IVD*, no está siendo utilizado en la práctica clínica habitual en este momento en los Estados Unidos o Europa. Además, el estudio para ERM por CMF también requiere una validación clínica y analítica. La validación analítica consiste en estudios de precisión y reproducibilidad de la prueba para cuantificar los resultados analíticos previstos tanto intra como entre laboratorio. Esto limita las comparaciones directas entre los estudios realizados en diferentes centros y la capacidad de extraer conclusiones entre estudios y por tanto poder lograr que sea calificado como biomarcador.

INTRODUCCIÓN

1.3.3. Citometría de flujo de nueva generación de alta sensibilidad y estandarizada para la detección de enfermedad residual mínima en mieloma múltiple

En un esfuerzo internacional para poder equiparar la sensibilidad de la ERM por CMF a los métodos moleculares (10^{-5} - 10^{-6}) y alcanzar una estandarización que permitiera la reproducibilidad de los resultados y la aplicabilidad de estas técnicas al estudio de diferentes neoplasias hematológicas, el Grupo de Estandarización EuroFlow dirigió su trabajo de investigación a las técnicas de CMF [85], dando lugar a la CMF de nueva generación, implementado la siguiente metodología:

En lo que respecta a la elección de los AcMo para la ERM en MM, se investigó el panel utilizado para el diagnóstico de las discrasias de CP del consorcio EuroFlow que consta de 12 AcMo diferentes, CD45, CD138, CD38, CD56, CD27, CD28, CD19, CD117, CD81, Ig $\kappa(c)$ y Ig $\lambda(c)$ y β 2-microglobulina, (**Tabla 5**). Posteriormente se realizaron cinco ciclos de diseño-evaluación-rediseño usando una base de datos de referencia con 31 muestras con CPN. En primer lugar, se eligieron ocho de los 12 AcMo (CD19, CD45, CD56, CD81, CD27, CD117, Ig $\kappa(c)$ y IgL $\lambda(c)$) como los que mejor distinguían las CPN de CPP y en último lugar se seleccionaron los flurocromos conjugados óptimos para cada AcMo, el panel final de anticuerpos se muestra en la **Tabla 9**. El CD38-FITC de múltiples epítomos mostró un rendimiento equivalente en las muestras de diagnóstico de MM a la observada con el clon del anticuerpo CD38

INTRODUCCIÓN

original, pero una resolución mucho mejor en muestras de MO de pacientes con MM que habían recibido tratamiento con el AcMo anti-CD38 daratumumab.

Tabla 9. Panel final de anticuerpos propuestos por el Grupo EuroFlow para el estudio de ERM en mieloma múltiple

	BV 421	BV 510	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PECy7	APC	APC H7
1	CD138	CD27	CD38 (ME)	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
2	CD138	CD27	CD38 (ME)	CD56	CD45	CD19	Igκ(c)	Igλ(c)

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina; Cy, cianina; BV, Brilliant violet; H7, Hilite 7; ME (multi-epitopo); c, citoplasmática. . Tabla adaptada de Flores-Montero y cols, [85].

En un intento de obtener un mayor número de células para el análisis, se probaron cinco protocolos diferentes para la preparación y el marcaje de la muestra. El primero fue el estándar de EuroFlow y el resto cuatro procedimientos diferentes de lisis en masa empleando cloruro de amonio. El protocolo final, consistió en el procedimiento de *bulk lysis* que incluía una etapa de fijación de lisis con FACS-lyse y albúmina de suero bovino al 0,5% con la adquisición de más de 10 millones de eventos, mostrando una proporción significativamente menor de residuos y células muertas.

Posteriormente, se compararon los análisis de ERM de muestras realizadas con el método convencional, descrito en

INTRODUCCIÓN

artículos previos [31] y por *NGF*, ambas con 8 colores y se observó una correlación general bastante buena entre los casos de muy buena respuesta parcial (MBRP) y RC o respuesta completa estricta (RCs) (**Tabla 10**). Se detectaron aproximadamente un cuarto de casos discrepantes (18/73) en los pacientes que presentaron ERM positiva por *NGF* y fueron ERM negativa por CMF convencional. Es de destacar que estos casos discrepantes, mostraron niveles de ERM más bajos con medianas de 0,001% (0,001-0,03%) y los casos de ERM positiva por ambos métodos, presentaron niveles de ERM más altos con medianas de 0,02% (0,0008-1,79%). En el análisis estadístico del impacto en la supervivencia, los pacientes con ERM negativos realizada por *NGF* tuvieron una SLP más larga frente a los pacientes ERM positivos.

Tabla 10. Resultados de las ERM por CMF convencional vs *NGF*

Total pacientes (110)	CMF convencional Positiva	CMF convencional negativa
<i>NGF</i> negativa	3(3%)	55(50%)
<i>NGF</i> positiva	34 (31%)	18(16%)

NGF, next generation flow; CMF, citometría de flujo. Tabla adaptada de Flores-Montero y cols,[85].

Se realizó la estandarización con el uso de herramientas informáticas con selecciones automáticas, disminuyendo así el peso de la experiencia del analizador. La identificación y cuantificación

INTRODUCCIÓN

automáticas de CPP mostraron una excelente correlación con la selección realizada por expertos, también en casos MBRP y RC o RCs. Sin embargo, debido a la cantidad mínima de eventos requeridos por el algoritmo del programa, no se identificó CPP en 3/110 casos (2,7%) que habían mostrado niveles bajos de ERM positiva por *NGF* y ERM negativa por CMF convencional por parte de los expertos.

En el análisis de 16 muestras de MO normales, se establecieron los rangos de los valores de las poblaciones celulares de la MO que deben ser analizadas para validar la calidad de la muestra: mastocitos CD117+++; eritroblastos CD45-,*SSC/FSC* disminuido; precursores mieloides CD117+; precursores linfoides B CD19+/CD38++/CD45+ débil; linfocitos B maduros CD19+/CD38+/-/CD45++; linfocitos B vírgenes CD19 +/CD38 -/CD27 - ; linfocitos B de memoria CD19+/CD38-/CD27+ y CPN; CD19+/CD56-, CD19-/CD56- y CD19-/CD56 débil, además de CPP, el esquema de las poblaciones se muestra en la **Tabla 11**. El análisis de estas poblaciones en 117 muestras de valoración de ERM en pacientes con MM proporcionó una evaluación global de la calidad de la MO, en la que una disminución significativa de estas células indicaba una muestra contaminada por sangre periférica y por tanto inadecuada, los resultados de los porcentajes de muestras con niveles bajos en las MO con resultado ERM negativo o ERM positivo se muestra en la **Tabla 12**. Es de destacar que el número reducido de mastocitos en 17/117 muestras, 11 con ERM negativa (incluidos los dos únicos pacientes que mostraron progresión de la enfermedad) y 6 con ERM

INTRODUCCIÓN

positivas, hacía que la disminución de esta población en el análisis de la calidad, fuese la más representativa de una muestra de MO hemodiluida (contaminada con sangre periférica).

INTRODUCCIÓN

Tabla 11. Porcentaje de poblaciones medulares normales

Población medular (fenotipo asociado)	Porcentajes normales en MO sobre CNT
% Mastocitos (CD117+++ , CD45+ , CD81+d , CD38+ , SSC/FSC++)	0,006% (0,002-0,03%)
% Eritroblastos (SSC/FSC +/- , todos los marcadores negativos)	6,4% (2–11,5%)
% CPN, CD19- (CD38+++ , CD138+ , CD45-/+ , CD56+/- , CD81+/- , CD27+ , FSC/SSC++)	0,05% (0,003-0,2%)
% Células B precursoras CD27+ (CD19+ , CD38++ , CD45+d , CD81++ , CD27+ , Ig(c)- , FSC/SSC +)	0,08% (0,004-0,4%)
% Células B precursoras CD27- (CD19+ ; CD38++ , CD45+d , CD81++ , CD27- , Ig(c)- , FSC/SSC +)	0,4% (0,05–2,2%)
% Linfocitos B maduros (CD19+ ; CD38+ , CD45+d/+ , CD81+ , CD27-/+ , Ig(c) + , FSC/SSC +)	1,6% (0,6–3,5%)
% Precursores mieloides (CD117+ , CD45+d , CD38+d/+ ; CD81+ , SSC/FSC++)	1,8% (0,2–3,6%)
% Células endoteliales y mesenquimales (CD81+++ , CD45- , SSC/FSC+++)	0,01% (0,0005-0,08%)

MO, médula ósea; CNT, celularidad nucleada total; FSC, forward scatter; SSC, sideward scatter; CPN, células plasmáticas normales. Tabla adaptada de Flores-Montero y cols, [85].

INTRODUCCIÓN

Tabla 12. Porcentajes de casos con niveles bajos de poblaciones medulares normales en muestras con ERM negativas y ERM positivas

POBLACIÓN DE MO	% DE CASOS CON NIVELES BAJOS	
	ERM negativa	ERM positiva
Mastocitos	10%	5%
Eritroblastos	3%	1%
Células B precursoras CD27 positivas	12%	11%
Células B precursoras CD27 negativas	11%	13%
Linfocitos B maduros	26%	23%
Precusores mieloides	8%	8%

ERM, enfermedad residual mínima; MO, médula ósea. Tabla adaptada de Flores-Montero y cols, [85].

El enfoque de ERM por *NGF* proporcionó resultados similares y reproducibles en diferentes centros, no observándose diferencias significativas en la fase de validación entre los laboratorios participantes con respecto a la tasa y casos discrepantes de ERM, confirmando el alto nivel de estandarización del método utilizado.

1.3.4. Evolución de la demostración del impacto pronóstico de la enfermedad residual mínima en mieloma múltiple

Antes de iniciar esta tesis, en la mayoría de los estudios publicados en los que se demostraba el impacto pronóstico de la ERM en MM, los esquemas terapéuticos no incluían los nuevos fármacos de mayor eficacia para el MM disponibles en la actualidad,

INTRODUCCIÓN

por lo que las respuestas al tratamiento no eran muy profundas y las técnicas de CMF utilizadas para valoración de la ERM eran menos sensibles. Así, desde los primeros protocolos del Grupo Español De Mieloma (GEM) ya se mostró un interés en la determinación de la ERM por CMF. En el análisis de ERM de 87 pacientes del protocolo PETHEMA94 tratados con inducción y autotrasplante de sangre periférica (TASP), la mejor calidad en la respuesta se relacionó ya con una mayor SLP [17]. Otro estudio coetáneo de Rawstron y cols, [86] presentó resultados similares. En un análisis del Grupo PETHEMA/GEM 2000 [87] se evaluó la ERM por CMF de primera generación en 295 pacientes de menos de 65 años tratados con inducción y TASP, en el día 100 post trasplante. Los paneles utilizados fueron de cuatro fluorocromos y la adquisición de 300.000 células (sensibilidad 10^{-4}), los pacientes que alcanzaban ERM negativa tenían una SLP de casi el doble de los que no (71 vs 37 meses; $p < 0,001$) y también una mayor SG (no alcanzada vs 89 meses, $p = 0,002$) tanto en aquellos que obtenían RC con IF negativa como en aquellos en los que sólo persistía una IF positiva sin CM medible. Esta ventaja se observaba también en pacientes de alto riesgo citogenético. Un estudio posterior [88], confirmó estos resultados en 241 pacientes jóvenes de los protocolos GEM2000 y GEM2005<65 (en este análisis ya se incluyeron pacientes en tratamiento con nuevos fármacos) con sensibilidades de entre 10^{-4} - 10^{-5} mostrando que la ERM positiva en el día +100 y el tener una citogenética de alto riesgo al diagnóstico, eran dos factores independientes para predecir una peor SLP y SG. Estos datos fueron

INTRODUCCIÓN

refrendados por el grupo británico en un estudio de 397 pacientes con MM en el que se analizó la ERM en el día +100 tras el TASP mediante CMF de primera generación con combinaciones de seis fluorocromos y 500.000 eventos adquiridos (sensibilidad de 10^{-4}) [24]. Este mismo grupo, posteriormente añadía como novedad la relación entre la profundidad de la respuesta y la mejoría del pronóstico, de forma que se ganaba 1 año de supervivencia por cada logaritmo de reducción de la ERM [89]. El grupo francés obtuvo resultados incluso mejores utilizando una CMF de segunda generación (siete fluorocromos y 2.000.000 de células de adquisición) [90]. En el protocolo PETHEMA/GEM2010MÁS65 en pacientes no candidatos a TASP, el análisis de ERM por CMF de mayor sensibilidad (cercana a 10^{-5}) confirmó también que los pacientes con ERM negativa tras los 18 ciclos de tratamiento con nuevos fármacos presentaban mejor SLP y SG [31]. En este trabajo, además, se observó que al analizar las poblaciones linfocitarias B, los pacientes con mejor recuperación se relacionaba con una mejor SG [31]. El resumen de estos estudios se muestra en la **Tabla 13**.

Durante el periodo de realización de esta tesis se han realizado varios metaanálisis que confirman lo ya publicado. Uno es el efectuado por Lahuerta y cols, que incluye 797 pacientes en dos ensayos del GEM (GEM2000/GEM2005<65) [91] en el que se aplicaron diferentes tratamientos y se utilizó una sensibilidad para ERM (10^{-4} - 10^{-5}). Primero se demostró que los pacientes en RC tenían una SLP y SG mayor que aquellos con \leq MBRP, y que al separar los

INTRODUCCIÓN

pacientes en RC que eran ERM negativos y positivos, se observó que los casos con RC y ERM positiva tenían el mismo resultado en SLP y SG que los pacientes en \leq MBRP (SLP de 27 y 29 meses y SG de 59 y 65 meses, respectivamente). Así se confirmó el impacto superior de la ERM negativa vs la respuesta serológica en SG y SLP tanto en pacientes candidatos como no candidatos a TASP e independientemente del estadio de la enfermedad y del resultado del análisis citogenético al diagnóstico. Aquí también se vislumbró el beneficio de alcanzar ERM negativa mantenida en el tiempo. Más recientemente dos metaanálisis, han corroborado la importancia de la ERM negativa en la SLP y SG en pacientes con MM [92-94] y también se ha confirmado el valor pronóstico de la ERM por CMF en pacientes en segunda línea de tratamiento [95].

Actualmente se está explorando qué sucede con la ERM por CMF de aquellos pacientes que mantienen la RC durante tiempos prolongados (al menos dos años) pero finalmente recaen, abriendo el debate de la necesidad de monitorizar la ERM en estos casos. En conclusión los estudios mencionados parecen indicar que la importancia de la RC radica en alcanzar una ERM negativa mantenida [96, 97], definida, según los criterios de respuesta del IMWG de 2016 (**Tabla 3**), como una ERM negativa en dos determinaciones separadas al menos un año.

INTRODUCCIÓN

Tabla 13. Resumen de los estudios realizados evaluando el impacto de la ERM por CMF en pacientes con MM sobre la SLP y la SG

Método	LOD	Momento	nº de pacientes	SLP (ERM negativa vs ERM positiva)	P	SG (ERM negativa vs ERM positiva)	P	Referencia
CMF 4 fluorocromos	10 ⁻⁴	Inducción y TASP	87	60 vs 34 meses	0,02	ND		San Miguel y cols, [17]
CMF 3 fluorocromos	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	TASP	45	35 vs 20 meses	0,03	76% vs 64% a los 5 años	0,28	Rawstron y cols, [86]
CMF 4 fluorocromos	10 ⁻⁴	TASP	295	71 vs 37 meses	0,001	NA vs 89m	0,002	Paiva y cols, [87]
CMF 4 fluorocromos	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	TASP	241	86% vs 58% a los 3 años	0,001	94% vs 80% a los tres años	0,001	Paiva y cols, [88]

CMF; citometría de flujo; LOD, limit of detection; ERM, enfermedad residual mínima; TASP trasplante autólogo de sangre periférica, SLP, supervivencia libre de progresión; SG, supervivencia global. Tabla adaptada de B Paiva y cols, [98].

INTRODUCCIÓN

Tabla 13. Continuación

Método	LOD	Momento	Nº de pacientes	SLP (ERM neg vs ERM pos)	P	SG (ERM neg vs ERM pos)	P	Referencia
CMF 6 fluorocromos	10^{-4}	TASP	397	29 vs 16 meses	0,001	81 vs 59 meses	0,02	Rawstron y cols, [24]
CMF 7 fluorocromos	10^{-5}	TASP	31	100% vs 30% a los tres años	ND	ND		Roussel y cols, [90]
CMF 8 fluorocromos	10^{-5} - 10^{-6}	Mayores	162	NA vs 70% a los 3 años	0,007	63% vs 55% a los 3 años	0,04	Paiva y cols,[31]

INTRODUCCIÓN

1.3.5. La enfermedad residual mínima en mieloma múltiple por *Next Generation Flow* en la práctica clínica

En conclusión, en la actualidad existe una evidencia creciente que demuestra que la ERM por CMF en MM predice de forma independiente tanto la SLP como la SG de los pacientes. Hemos visto que la aplicabilidad de la ERM por CMF tiene sobre todo valor en pacientes en RC, momento en el que el CM no es suficiente para monitorizar la respuesta a la terapia y por tanto no disponemos de herramientas suficientemente fiables que nos permitan predecir si el paciente va a recaer. Por este motivo el momento más adecuado para realizar la ERM sería cuando el pacientes alcanza la RC serológica.

Otro aspecto a considerar en pacientes en RC mantenida sería la periodicidad en el tiempo para realizar la determinación de la ERM por *NGF* durante el seguimiento de la enfermedad (procedimiento habitual en otras neoplasias hematológicas). La monitorización de la ERM podría ayudar a predecir grupos de pacientes con diferente evolución: con ERM negativa mantenida y con supervivencia más larga, con ERM negativa que se convierte a positiva y recaída inmediata a la conversión y finalmente pacientes con RC mantenida y ERM que permanece positiva en niveles muy bajos (clones benignos) que presentan una reconstitución inmune muy activa capaz de controlar la enfermedad [96].

Actualmente hay numerosos ensayos clínicos en curso que están aplicando la ERM por *NGF* para evaluar la eficacia del

INTRODUCCIÓN

tratamiento y guiar el manejo terapéutico del paciente [6]. El último paso sería la toma de decisiones terapéuticas según estos resultados, lo que permitiría consolidar el uso habitual de la ERM por CMF demostrando su utilidad en la práctica clínica.

INTRODUCCIÓN

1.4. Monitorización de la respuesta mediante el inmunoensayo Hevylite®

Como ya se ha mencionado, desde la incorporación de los nuevos fármacos para el tratamiento del MM alrededor del 60% de los pacientes alcanzan MBRP o mejor, a pesar de lo cual, muchos siguen recayendo. Por este motivo, además de mejorar la sensibilidad de las técnicas ya disponibles para la realización de la ERM, se están buscando otras nuevas que puedan completar o aportar mayor sensibilidad. En este sentido, en los nuevos criterios de respuesta del IMWG [13] la determinación del CM mediante el inmunoensayo Hevylite® (*HLC, Heavy + Light Chain*) se consideró como una técnica futura a explorar. Las *HLC* están basadas en la cuantificación de los pares específicos de cadenas pesada y ligera de Ig, mediante el reconocimiento de epítomos de unión únicos entre las regiones de la cadena pesada y la cadena ligera, pudiendo identificar por separado los diferentes tipos de cadena ligera de cada clase de Ig (IgG κ , IgG λ , IgA κ , IgA λ , IgM κ y IgM λ). Esta característica del ensayo ha permitido identificar con elevada precisión las Ig intactas y los valores de normalidad para los cocientes Ig κ /Ig λ . Por lo que mide tanto la Ig intacta involucrada clonal (*HLCi*) como la intacta no involucrada o no clonal (*HLCni*) y el cociente entre cada par, considerándose positivo la alteración del cociente *HLCi/HLCni* (*rHLC*) a favor de la cadena involucrada. Esta técnica es sobre todo útil en los pacientes con MM IgA que no pueden monitorizarse correctamente por la migración conjunta y las

INTRODUCCIÓN

bandas borrosas/difusas en el estudio de EF e IF, o cuando la proteína monoclonal es <10 g/L (p. ej. MM oligosecretor). Actualmente la *HLC* ha demostrado ser más precisas que la EF e IF en situaciones de MBRP, mostrando también mayor correlación que éstas, con la determinación de la ERM por CMF [99, 100]. Sin embargo, en una reciente publicación del grupo PETHEMA/GEM donde se investigó el valor pronóstico de las *HLC* de forma retrospectiva en 89 pacientes de los ensayos GEM2005 (>65 y <65 años) y GEM 2010 no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la SLP y la normalización del *rHLC* después del tratamiento [101].

HIPÓTESIS

2.HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Según lo expuesto previamente, la relación entre la intensidad de la respuesta al tratamiento y los resultados a largo plazo ha sido un tema muy debatido en MM, especialmente antes de la incorporación de los nuevos fármacos debido posiblemente a la falta de respuestas profundas. Esto hizo que nos planteáramos nuestra primera hipótesis enfocada a evaluar si la diferencia en la profundidad de la respuesta de nuestros pacientes con MBRP o con RC se traduciría en cambios en la SLP.

Como ya se ha dicho, con la incorporación de nuevos fármacos mucho más eficaces para el MM, la valoración de la ERM con los métodos de CMF utilizados desde hace una década ha sido insuficientes, por lo que paralelamente en los últimos años se han desarrollado procedimientos más sensibles como la *NGF*. El aumento de la sensibilidad conseguido con esta metodología se demuestra con un mayor impacto en predecir la SLP y la SG en los pacientes con MM comparado con la valoración de la respuesta mediante técnicas convencionales. De hecho se ha demostrado que el verdadero factor pronóstico de la desaparición del CM está íntimamente relacionado con la evaluación de la ERM. Si el paciente en RC presenta una ERM negativa, tendrá una mayor SLP y SG, independientemente de la edad del paciente, del estadio de la enfermedad y del resultado del análisis citogenético [91]. Por tanto, como segunda hipótesis nos planteamos si los estudios de ERM realizados mediante *NGF* en nuestros pacientes, tratados con el mismo esquema terapéutico y con respuestas profundas al tratamiento (\geq MBRP), tendrían mayor impacto en la predicción de

HIPÓTESIS

la SLP que el obtenido con la valoración de la respuesta convencional.

Además, en el momento de iniciar esta tesis se empezaba a barajar la posibilidad de la monitorización mediante la determinación de la ERM por las nuevas metodologías a lo largo del seguimiento de los pacientes para ayudar a la toma de decisiones en el manejo clínico. Así, nuestra tercera hipótesis fue si la monitorización de nuestros pacientes mediante ERM por *NGF* durante aproximadamente dos años tras el TASP aportaría información pronóstica adicional de relevancia que podría contribuir en el futuro a la toma de decisiones clínicas.

En el área del laboratorio, en muestras de suero, también se está investigando nuevas pruebas a parte de la EF, como el inmunoensayo Hevylite® o *HLC* que permitan mejorar la monitorización de pacientes con MM. Al principio de iniciar esta tesis se acababa de incorporar esta técnica en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico de Valencia por lo que planteamos la cuarta hipótesis de si la monitorización de la medición de las Hevylite® tendría algún impacto pronóstico en nuestros pacientes.

Por otra parte, también en el momento de comenzar esta tesis en 2015 todavía no estaba publicado el método de *NGF* para la detección de ERM en MM con alta sensibilidad y estandarización y su aplicación se limitaba a laboratorios de referencia dentro de ensayos clínicos. Así nuestra quinta y última hipótesis fue ver si era posible la implantación de esta estrategia de la ERM por *NGF* [85] ampliamente estandarizada y recomendada en las guías de

HIPÓTESIS

consenso [28] en la práctica habitual de los laboratorios de citometría de tres hospitales públicos de la ciudad de Valencia, demostrando también la importancia del análisis de la calidad de la muestra en los controles de ERM realizados para así evaluar los posibles fallos en el estudio de ERM por *NGF*.

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Analizar de forma prospectiva el impacto del resultado de la profundidad de la respuesta medida con métodos convencionales, en la SLP de un grupo homogéneo de pacientes con MM de nuevo diagnóstico candidatos a TASP.

2. Evaluar de forma prospectiva si el resultado de la ERM realizada por *NGF*, tiene impacto pronóstico en la SLP de un grupo homogéneo de pacientes con MM de nuevo diagnóstico candidatos a TASP, y si estos resultados son aplicables para decidir el manejo de los pacientes en un futuro.

3. Analizar de forma prospectiva el valor de la monitorización de la ERM por *NGF* en el seguimiento de un grupo homogéneo de pacientes con MM de nuevo diagnóstico candidatos a TASP, durante al menos dos años de evolución.

4. Valorar de forma prospectiva el impacto del resultado del inmunoensayo Hevylite® en la SLP de un grupo homogéneo de paciente con MM de nuevo diagnóstico y candidatos a TASP.

5. Evaluar la capacidad de implementar la metodología estandarizada de *NGF* en el análisis de la ERM en pacientes con MM candidatos a TASP en tres hospitales de la Comunidad Valenciana

OBJETIVOS

dentro de la práctica diaria habitual valorando el análisis de la calidad de la muestra en los controles de ERM.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

En marzo de 2015 se realizó una primera reunión entre miembros del Grupo de Estudio de Mieloma de la Comunidad Valenciana (GREMI) y del Grupo Valenciano de Citometría de Flujo (GVCF) donde se hizo una primera toma de contacto y se planteó este proyecto común.

En abril de 2015 se organizó una segunda reunión de trabajo de ambos grupos para decidir el tipo de pacientes candidatos al estudio y establecer los criterios de inclusión, el momento y la forma de recogida de muestras y los hospitales encargados de la realización del análisis de la ERM por *NGF*.

4.1.1. Pacientes candidatos a entrar en el estudio y criterios de inclusión

- Pacientes con un primer diagnóstico de MM candidatos a TASP que:

- Tuvieran síntomas relacionados con la enfermedad.
- Fueran a recibir tratamiento activo de primera línea.
- No participaran en ningún ensayo clínico.
- Los pacientes debían de disponer de muestras procesadas de diagnóstico en los centros seleccionados para el análisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Tras el tratamiento debían alcanzar el siguiente nivel de respuesta, valorado según los nuevos criterios de respuesta en MM revisado en el 2016 por el *IMWG*[13]:

- Muy buena respuesta parcial o
- Respuesta completa o
- Respuesta completa estricta

4.1.2. Protocolo de recogida de muestras y procesamiento de la médula ósea para estudio de la enfermedad residual mínima mediante *Next Generation Flow*

Se establecieron tres laboratorios de hospitales terciarios de Valencia para la realización de la ERM que procesarían las muestras de sus propios pacientes y las remitidas por hospitales comarcales de los que son centro de referencia dentro de la práctica diaria:

- Hospital Universitario y Politécnico La Fe.
- Hospital Clínico Universitario.
- Hospital Universitario Doctor Peset.

La muestra de MO de los pacientes candidatos al estudio se debía mandar para análisis inmunofenotípico mediante CMF al diagnóstico de la enfermedad y si finalmente era incluido en el estudio, se debía remitir muestra para detección de ERM en los siguientes momentos:

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Si se alcanzaba MBRP o mejor antes de la realización del

TASP:

- Nada más alcanzar la primera MBRP o mejor.
- Inmediatamente antes del TASP.
- A los 100 días del TASP.
- A los 12 meses del TASP.
- A los 24 meses del TASP.

B) Si se alcanzaba MBRP o mejor tras la realización del

TASP:

- Nada más alcanzar la primera MBRP o mejor.
- A los 12 meses del TASP.
- A los 24 meses del TASP.

Los estudios de diagnóstico y ERM se realizaron en MO. Las muestras se debían extraer en el momento del diagnóstico en un tubo de EDTA de 3 mL para posteriormente proceder al marcaje inmunofenotípico con los AcMo y las dosis descritas en las **Tablas 14** y **15** y finalmente adquirir un total de 250.000 células para su posterior análisis. Para la obtención de la muestra de MO para la determinación de las ERM, se siguieron los criterios de consenso de Stetler-Stevenson y cols, [32], se extrajeron tres tubos de EDTA de 2 mL, de MO del primer aspirado y el procesamiento se hizo dentro de las primeras 24 horas después de su recolección. De acuerdo con los protocolos del Grupo EuroFlow [85], previo al procesamiento de la muestra, se realizaba un recuento celular para alcanzar 10×10^6

MATERIALES Y MÉTODOS

células por tubo y posteriormente se realizaba el procedimiento de *bulk lysis*, marcando dos tubos con los AcMo y las dosis descritos en las **Tablas 16 y 17** para finalmente adquirir 5.000.000 de células.

Dentro del grupo GVCF se realizaron tres reuniones más, para asegurar la estandarización en la práctica de la ERM según las publicaciones que iban surgiendo como las de las sociedades ICCS y la ESCCA [28] y el Grupo EuroFlow [85] con la elaboración de los siguientes documentos:

Procedimiento normalizado de trabajo (PNT) del marcaje y procesamiento de la muestra según los estándares EuroFlow (<https://euroflow.org/protocols>) (Anexo 1).

PNT del formato del informe final (Anexo 2).

Realización de un video que se compartió con todos los especialistas en citometría implicados en el que se explicaba el procedimiento de análisis de la muestra.

La adquisición de células se llevó a cabo mediante un citómetro FACSCanto II (BD Bioscience, San Jose, California, EE. UU) y Cytoflex (Beckman Coulter, Miami, Florida, EE. UU) el análisis de datos se realizó utilizando el software Infinicyt versión 2.0 (Cytognos S.L., Salamanca, España). Se consideró ERM positiva la presencia de $\geq 0,00001$ o 1×10^{-5} células plasmáticas aberrantes o 50 de 5.000.000.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 14. Tubo 1: utilizado para el diagnóstico MM

MUESTRA	BV421	BV510	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCC750
	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
Empresa	BD	BioLegend	Cytognos	Cytognos	BioLegend	BC	BD	Cytognos
MO 100 µL	2 µL	5 µL MO	FITC 3 µL + PURO 2 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	10 µL
REFERENCIA	562935	302836	CYT-38F + CYT-38P1	CYT-56PE	304028	IM3628	333233	CYT- 81AC750

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina; Cy, cianina; BV, brilliant violet; BD, Becton Dickinson, San José, California, EE. UU; BC, Beckman Coulter, Miami, Florida, EE. UU.

Tabla 15. Tubo 2: utilizado para el diagnóstico MM.

MUESTRA	BV421	BV510	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCC750
	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	Ig κ(c)	Ig λ(c)
Empresa	BD	BioLegend	Cytognos	Cytognos	BioLegend	BC	Dako	Cytognos
MO 100 uL	2 µL	5 µL MO	FITC 3 µL + PURO 2µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	3 µL
REFERENCIA	562935	302836	CYT-38F + CYT-38P1	CYT-56PE	304028	IM3628	C0222	CYT- LAC750

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina; Cy, cianina; BV, brilliant violet; BD, Becton Dickinson, San José, California, EE. UU; BC, Beckman Coulter, Miami, Florida, EE. UU.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 16. *Tubo 1: utilizado para ERM MM*

MUESTRA	BV421	BV510	FITC	PE	PerCPcy5.5	PEcy7	APC	APCC750
	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
Empresa	BD	BioLegend	Cytognos	Cytognos	BioLegend	BC	BD	Cytognos
MO 100 µL	12 µL	10 µL MO	FITC 6 µL + PURO 4 µL	2 µL	10 µL	5 µL	5 µL	10 µL
REFERENCIA	562935	302836	CYT-38F + CYT-38P1	CYT-56PE	304028	IM3628	333233	CYT- 81AC750

ERM, enfermedad residual mínima; MM, mieloma múltiple; FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina; Cy, cianina; BV, brilliant violet; BD, Becton Dickinson, San José, California, EE. UU; BC, Beckman Coulter, Miami, Florida, EE. UU.

Tabla 17. *Tubo 2: utilizado para ERM MM*

MUESTRA	BV421	BV510	FITC	PE	PerCPcy5.5	PEcy7	APC	APCC750
	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	Ig κ(c)	Ig λ(c)
Empresa	BD	BioLegend	Cytognos	Cytognos	BioLegend	BC	Dako	Cytognos
MO 100 uL	12 µL	10 µL MO	FITC 6 µL + PURO 4 uL	2 µL	10 µL	5 µL	5 µL	3 µL
REFERENCIA	562935	302836	CYT-38F + CYT-38P1	CYT-56PE	304028	IM3628	C0222	CYT- LAC750

ERM, enfermedad residual mínima; MM, mieloma múltiple; FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; APC, alofocianina; Cy, cianina; BV, brilliant violet; BD: BD, Becton Dickinson, San José, California, EE. UU; BC, Beckman Coulter, Miami, Florida, EE. UU.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.3. Protocolo de recogida de muestras de suero para el estudio Hevylite®

En octubre de 2015 se realizó una tercera reunión del GREMI en la que se decidió incluir en el proyecto el estudio de las cadenas pesadas mediante el inmunoensayo Hevylite® en todos los pacientes, excepto en aquellos que tuvieran un MM de cadenas ligeras. Estos análisis se centralizaron en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico de Valencia. Las muestras de suero para este estudio se extrajeron en los mismos tiempos que se realizaron los AMO y se congelaron para su posterior análisis. También se realizó el documento “Protocolo de recogida de muestras para ensayo Hevylite®” (Anexo 4) y se subió a la página de internet del GREMI (<https://www.gremicv.es>).

4.1.4. Procedimiento de recogida de datos

Se diseñó una base de datos específica para la introducción de toda la información necesaria de los pacientes incluidos en el proyecto que se integró en la página web del GREMI y a la que tenían acceso los investigadores de los hospitales involucrados en el proyecto.

4.2. Protocolos de calibración del citómetro y controles de calidad

Siguiendo las recomendaciones de consenso de Oldaker y cols, [34] la calibración de los citómetros para su correcto ajuste y compensación, se realizó mensualmente mediante los protocolos específicos recomendados para los dos equipos de citometría utilizados en el estudio (FACSCanto II y Cytoflex): ensayo BD ONE FLOW y Kit Duraclone BC y diariamente mediante las CS&T *research beads* y CytoFlex Daily QC respectivamente. Estos procedimientos, basados en el trabajo de investigación y validación del consorcio EuroFlow permiten maximizar la eficiencia del laboratorio y conseguir la fiabilidad y la precisión de los resultados. Los controles de calidad externo para el funcionamiento de los citómetros fueron los controles de calidad UKNQAS CD34 y controles de calidad de poblaciones linfocitarias del programa de Garantía Externa de Calidad para Laboratorios de Inmunología Diagnóstica (GECLID). Los controles de calidad externos para análisis de las muestras de ERM en MM fueron los del programa de evaluación externa de calidad de la SEHH que consiste en 12 ficheros de análisis por CMF, correspondientes a muestras de ERM de MM preparadas mediante técnicas de *NGF* en el que cada participante informará los resultados incluyendo; presencia de ERM y su cuantificación e IFE, LOD, LOQ y distribución de otras poblaciones típicas medulares.

4.3. Análisis de la enfermedad residual mínima y la calidad de la muestra mediante *Next Generation Flow*

En un primer lugar se seleccionaba la población de CP según las directrices de Arroz y cols, [33], procedimiento ya descrito en este trabajo (**Figuras 1 y 2**). Posteriormente se analizaba la calidad de la muestra mediante la presencia de poblaciones exclusivamente medulares basado en Flores Montero y cols, [85], **Tabla 11**. Finalmente se calculó el *LOD* y *LOQ* de cada muestra según también Arroz y cols, [33], **Tabla 8**.

A continuación, mostramos la selección de cada población medular con los marcadores y su representación gráfica:

Eritroblastos: *SSC/FSC* bajos, resto de marcadores negativos (**Figura 3**).

Mastocitos: CD117++, CD45+, CD81+d, CD38+, *SSC/FS++/+++* (**Figura 4**).

Células B precursoras CD27+: CD19+; CD38++, CD45 débil, CD81++, CD27+, Ig(c) -, *FSC/SSC* bajo (**Figura 5**).

Células B precursoras CD27-: CD19+; CD38++, CD45 débil, CD81++, CD27-, Ig(c) -, *FSC/SSC* bajo (**Figura 5**).

Lifocitos B maduros: CD19+; CD38+, CD45 débil/+, CD81+, CD27-/+, Ig(c)+, *FSC/SSC* bajo (**Figura 5**).

Precusores mieloides: CD117+, CD45 débil, CD38 débil/+; CD81+, *FSC/SSC* intermedio (**Figura 6**).

MATERIALES Y MÉTODOS

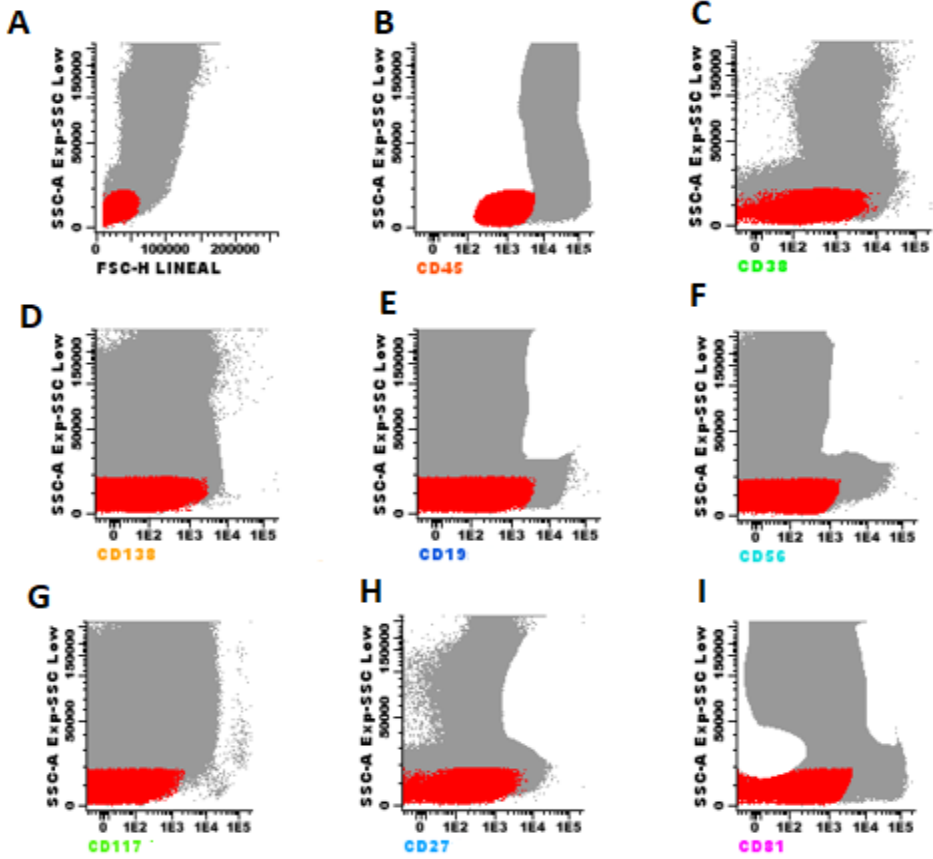


Figura 3. Identificación de eritroblastos (color rojo).

Pasos para la identificación de eritroblastos; A, dispersión de luz, frontales (FSC) y laterales (SSC) bajos, ausencia de expresión de, B, CD45, C, CD38, D, CD138, E, CD19, F, CD56, G, CD117, H, CD27, I, CD 81. Fuente de Flores-Montero y cols, [85].

MATERIALES Y MÉTODOS

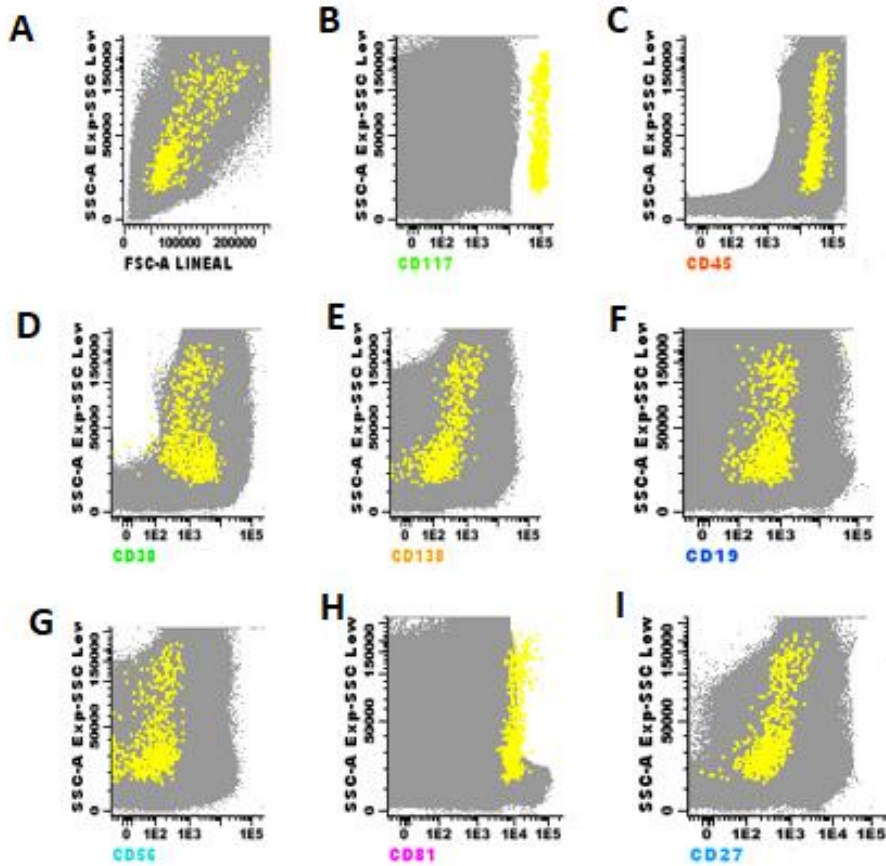


Figura 4. Selección de mastocitos (color amarillo). Pasos para la selección de mastocitos; A, dispersión de luz, frontales (FSC) y laterales (SSC) altos, B, intensa expresión de CD117, C, expresión de CD45, D, expresión débil de CD38, E, ausencia de expresión de CD138, F, CD19 y G, CD56, H, expresión débil de CD81 y I, ausencia de expresión de CD27. Fuente de Flores-Montero y cols, [85].

MATERIALES Y MÉTODOS

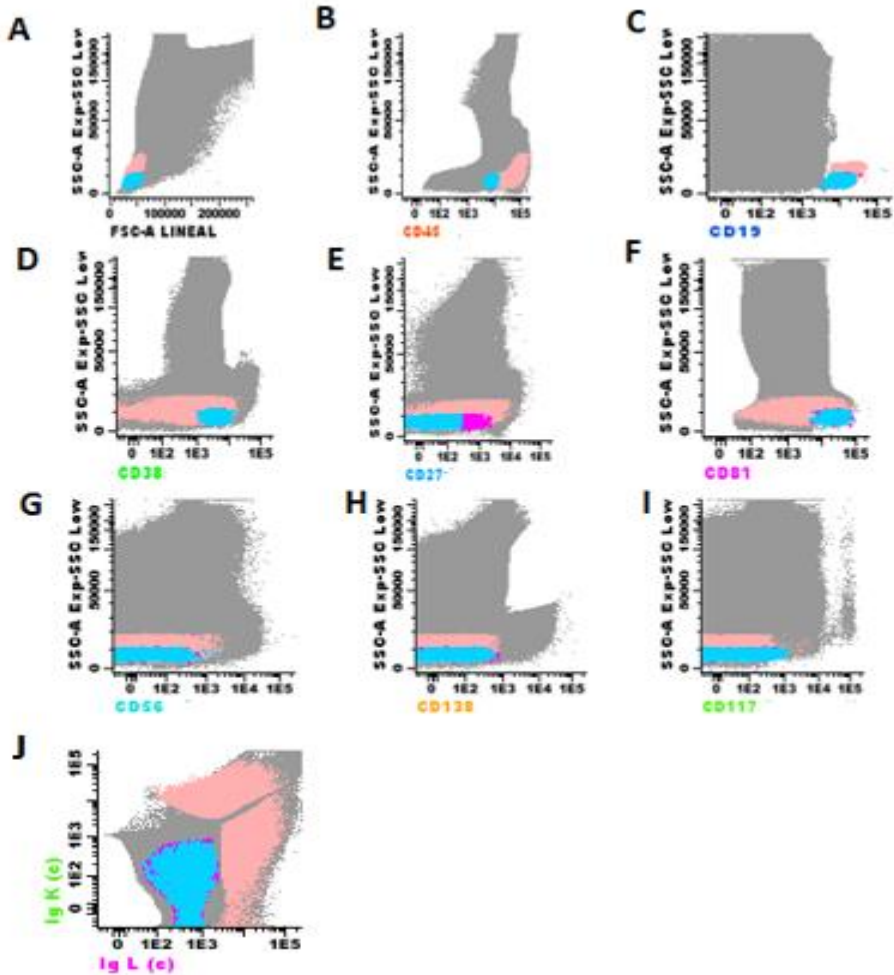


Figura 5. Selección de poblaciones linfoides B, células B precursoras CD27 negativo (color azul), células B precursoras CD27 positivo (color fucsia), linfocitos B maduros (color rosa).

A: dispersión de luz, frontales (FSC) y laterales (SSC) bajos; B: células B precursoras CD45 positivo débil, linfocitos B maduros CD45 positivo; C: expresión de CD19, D: expresión de CD38 de las células B precursoras; E: expresión de CD27 en las células B precursoras B CD27 positivas; F: expresión de CD81, G,H,I: ausencia de expresión de CD56, CD138 y CD117, J: ausencia de expresión de las células B precursoras de Igk(c) e Igλ(c) y expresión por los linfocitos maduros. Fuente de Flores-Montero y cols, [85].

MATERIALES Y MÉTODOS

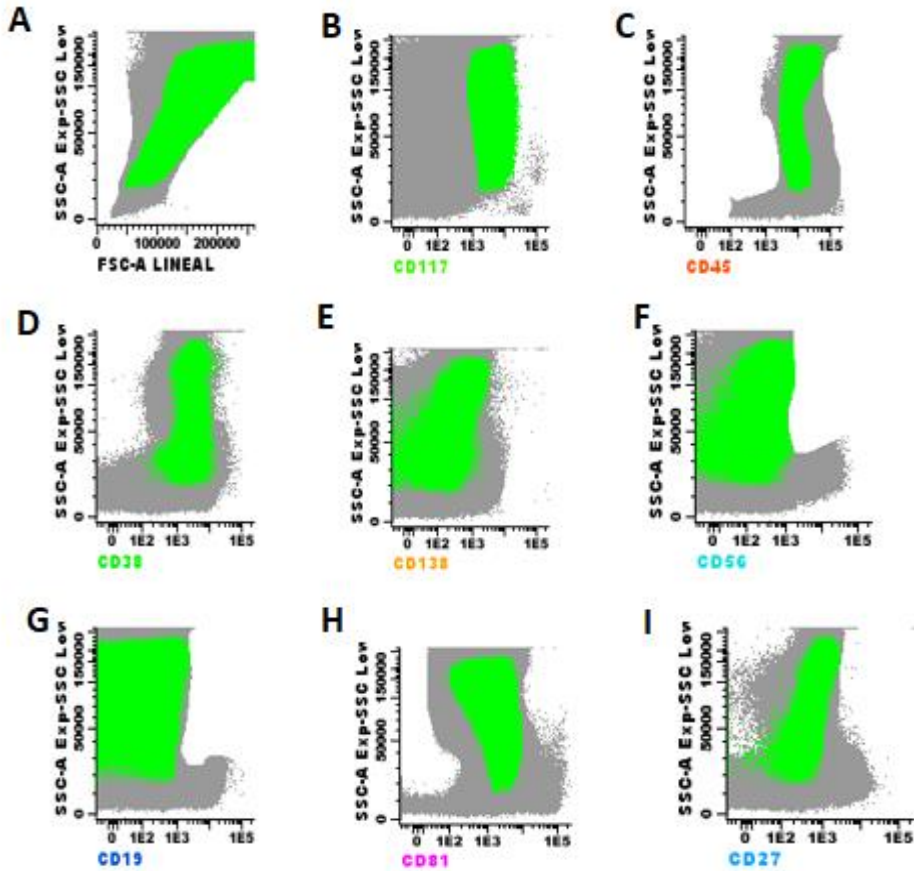


Figura 6. Selección de progenitores mieloides (color verde).

Pasos para la selección; A: dispersión de luz, frontales (FSC) y laterales (SSC) alto; B: expresión de CD117; C: expresión débil de CD45; D: expresión débil de CD38; E: ausencia de expresión de CD138; F: CD56 y G: CD19; H: expresión débil de CD81; I: ausencia de expresión de CD27. Fuente de Flores-Montero y cols, [85].

4.4. Evaluación del componente monoclonal

La evaluación del componente monoclonal se realizó en el laboratorio de Bioquímica de cada hospital participante. La EF se realizó utilizando el sistema capilar de Sebia Capillarys™ 3 (Sebia, Inc. Norcross, GA) y las concentraciones de CLL por nefelometría en el analizador BN-II (Siemens, Liederbach, Alemania). De acuerdo con los protocolos del fabricante, las Ig se cuantificaron mediante un ensayo inmunturbidimétrico en el sistema Olympus AU5400 (Olympus Diagnostics). La IF de muestras séricas se realizó utilizando kits de Sebia Hydragel en el sistema de electroforesis en gel Sebia Hydrasys 2 scan (Sebia, Inc).

4.5. Evaluación de las Hevylite®

La evaluación de las Hevylite® se realizó de forma centralizada en Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico de Valencia. Se evaluó mediante los ensayos de isotipos cadena pesada y cadena ligera Hevylite® de *Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK*. El resultado obtenido permitía la identificación y cuantificación individual de los diferentes tipos de cadena ligera de cada clase de Ig; es decir, IgG κ , IgG λ , IgA κ , IgA λ , IgM κ e IgM λ . Los antisueros se unen a los epítomos nodales únicos que contiene la Ig intacta entre las regiones constantes de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Se medía tanto la Ig involucrada clonal (*HLCi*) como la no involucrada o no clonal (*HLCni*) en la proteína intacta. En el informe se incluía la cantidad de cadena IgG κ , IgG λ , IgA κ , IgA λ , IgM κ e IgM λ y el cociente entre cada par cuya normalidad de cada parámetro se muestra en

la **Tabla 18**. Se consideraba positivo la alteración del cociente *HLCi/HLCni (rHLC)* a favor de la cadena involucrada.

Tabla 18. *Valores normales de las Hevylite®*

TIPO DE HEVYLITE®	VALOR (g/L)
Hevylite® IgG κ	4,03 – 9,78
Hevylite® IgG λ	1,97 - 5,71
Cociente Hevylite® IgG κ/λ	0,98 - 2,75
Hevylite® IgM κ	0,29 - 1,82
Hevylite® IgM λ	0,17 - 0,94
Cociente Hevylite® IgM κ/λ	0,96 - 2,30
Hevylite® IgA κ	0,48 - 2,82
Hevylite® IgA λ	0,36 - 1,98
Cociente Hevylite® IgA κ/λ	0,80 - 2,04

Ig, inmunoglobulina; κ, kappa; λ, lambda.

4.6. Evaluación de la citogenética

Se realizó en cada laboratorio de citogenética de cada hospital participante, mediante la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en células purificadas positivas para CD138 obtenidas de MO en el momento del diagnóstico, según el procedimiento estándar. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según su perfil de FISH: pacientes de alto riesgo citogenético con al menos 1 de las siguientes alteraciones, deleción del17p13 o una translocación t (4; 14) o t(14; 16) y pacientes de riesgo estándar si no presentaba ninguna de estas alteraciones. Si la citogenética no se había realizado, los pacientes fueron incluidos en la categoría de no disponible.

4.7. Tratamiento de los pacientes

El tratamiento de inducción consistió en todos los pacientes en seis ciclos de la combinación de talidomida 50→100→200 mg vía oral, días 1-4→15-28→29 y siguientes de forma continua, dexametasona 40 mg vía oral, días 1 a 4 y 9 a 12 y bortezomib 1,3 mg/m² vía subcutánea, días 1, 4, 8, 11 del ciclo, cada 28 días o esquema VTD. Posteriormente, 43 pacientes recibieron tratamiento de intensificación con melfalán 200 seguido de TASP (el paciente restante recayó justo antes del TASP).

4.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics v23. La SLP se calculó desde el diagnóstico hasta la fecha de progresión o última visita utilizándose el método

MATERIALES Y MÉTODOS

Kaplan-Meier. La prueba log-rank se utilizó para estimar el significado estadístico de las diferencias entre las curvas.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica de cada uno de los hospitales participantes y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado en concordancia con las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

RESULTADOS

5.1. Características de los pacientes

En el periodo comprendido entre septiembre de 2015 y mayo del 2018 se reclutaron de forma prospectiva 44 pacientes con MM de nuevo diagnóstico. La mediana de edad fue de 60 años (extremos, 45-68). Siete pacientes (16%) presentaban enfermedad en estadio III de ISS y siete (16%) tenían alto riesgo citogenético (**Tabla 19**). Durante el periodo de seguimiento, se realizó un total de 128 AMO para la evaluación de ERM por *NGF*. A un paciente se le efectuó un único control por recaída precoz, a 12 dos aspirados, a 21 tres y a diez pacientes cuatro controles. Los momentos de extracción durante el seguimiento fueron pre TASP, a los 100 días, al año y a los 2 años post TASP.

RESULTADOS

Tabla 19. Características de los pacientes al diagnóstico

CARACTERÍSTICA	NÚMERO DE PACIENTES (%)
Edad (años) mediana (extremos)	60 (45-68)
Hombres/mujeres	26 (59)/18 (41)
Estadio ISS	
I	18 (41)
II	19 (43)
III	7 (16)
Estadio R-ISS*	
I	10 (23)
II	23 (52)
III	2 (5)
Creatinina (mg/dL)	
< 2	38 (86)
≥ 2	6 (14)
LDH elevada	3 (7)
Citogenética	
Del17p	1 (3)
t(4;14)	5 (14)
t(14;16)	1 (3)
Otras	28 (80)
Tipo de Inmunoglobulina	
IgG	20 (45)
IgA	17 (39)
Cadena ligera	4 (9)
Oligosecretor	3 (7)

ISS, International staging system; R-ISS, Revised-international staging system; Del, deleción; t, translocación; Ig, inmunoglobulina. * Citogenética disponible en 35 pacientes.

RESULTADOS

5.2. Supervivencia global y supervivencia libre de progresión de todos los pacientes

Con una mediana de seguimiento desde el diagnóstico de 38 meses (22-54 meses), han fallecido 4/44 pacientes mostrando una SG del 91%, **Figura 7**.

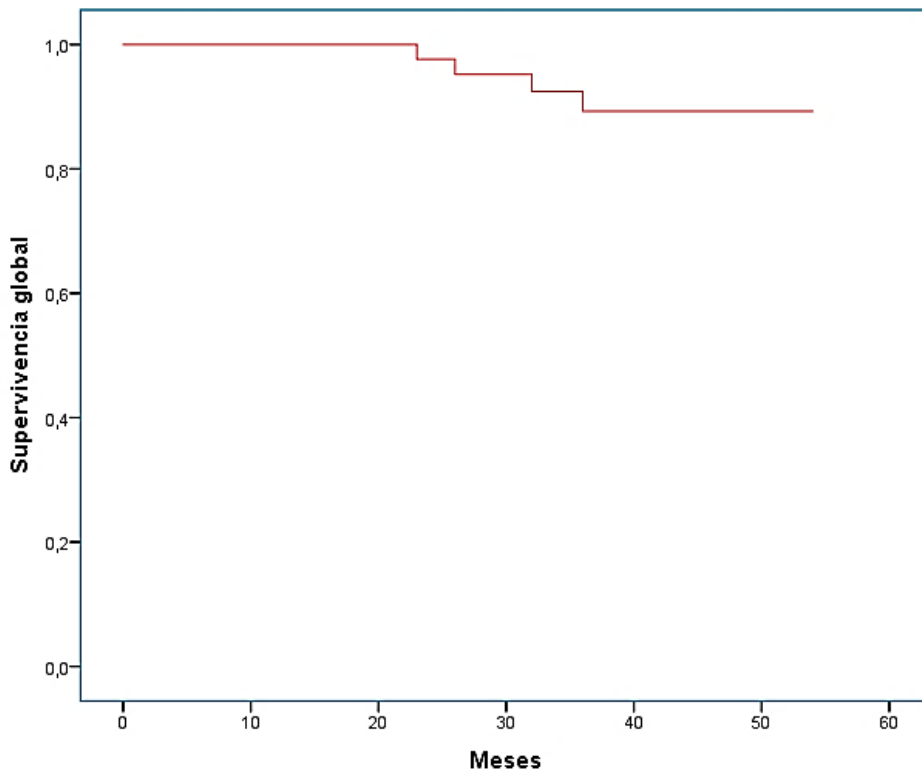


Figura 7. Supervivencia global de todos los pacientes

RESULTADOS

La mediana de seguimiento desde el diagnóstico a fecha de recaída o última visita fue de 33 meses (extremos, 8-51 meses). Después del inicio del tratamiento se objetivó la recaída de 18/44 pacientes de la serie global (41%), presentado una mediana de SLP estimada de 41 meses, **Figura 8**.

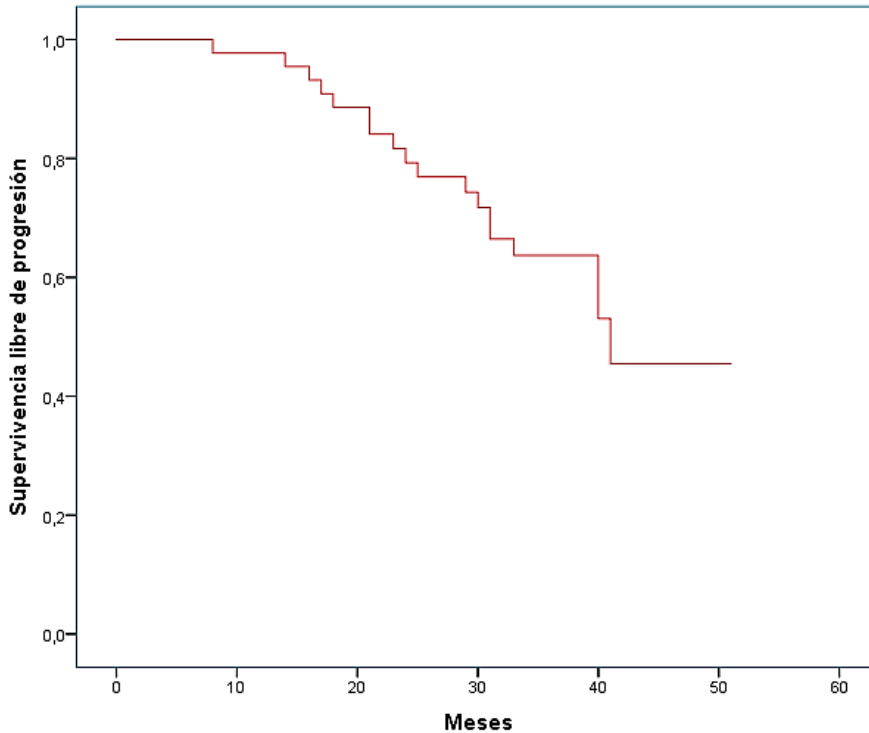


Figura 8. Supervivencia libre de progresión de todos los pacientes

RESULTADOS

5.3. Profundidad de la respuesta y supervivencia libre de progresión

De los 44 pacientes, 29 (66%) alcanzaron RC y 15 (34%) MBRP. En conjunto, 27 pacientes (61%) consiguieron la mejor respuesta antes del TASP y 17 (39%) después del trasplante. La situación de respuesta del paciente y el resultado de las ERM de todos controles de MO realizados en los pacientes pre TASP, a los 100 días, al año y a los dos años del TASP se muestran en la **Figura 9**. Cuando se analizó la SLP según los criterios habituales de respuesta, había recaído 9 de los 29 pacientes en RC frente a 9 de 15 que se encontraban con una MBRP. Con una mediana de seguimiento de 33 meses, la SLP de los paciente en RC no se había alcanzado y era de 31 meses en los pacientes con MBRP ($p=0,03$), **Figura 10**.

RESULTADOS

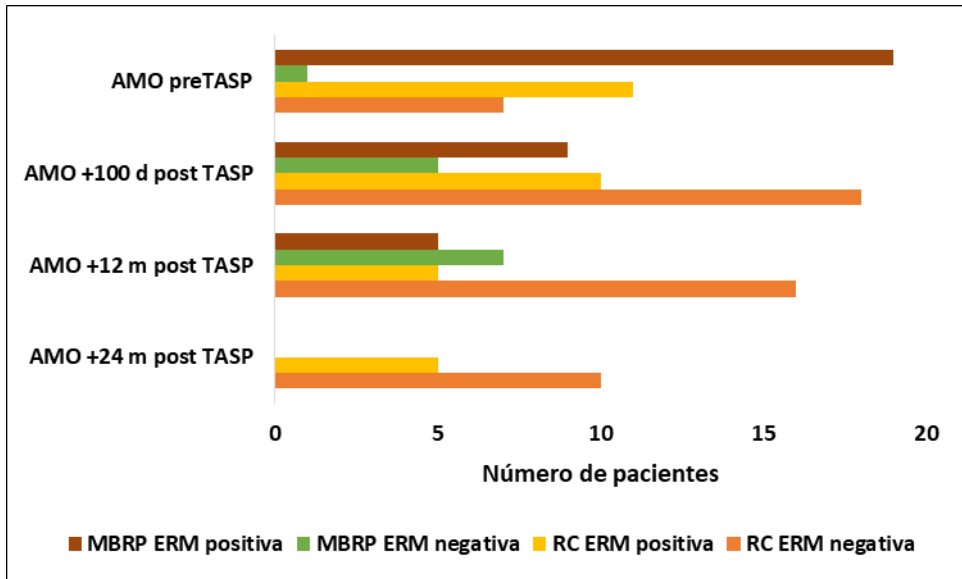


Figura 9. Esquema de los resultados de los controles de ERM en MO realizados durante el estudio.

ERM, enfermedad residual mínima; MBRP, muy buena respuesta parcial; RC, respuesta completa; AMO, aspirado de médula ósea; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; d, días; m, meses.

RESULTADOS

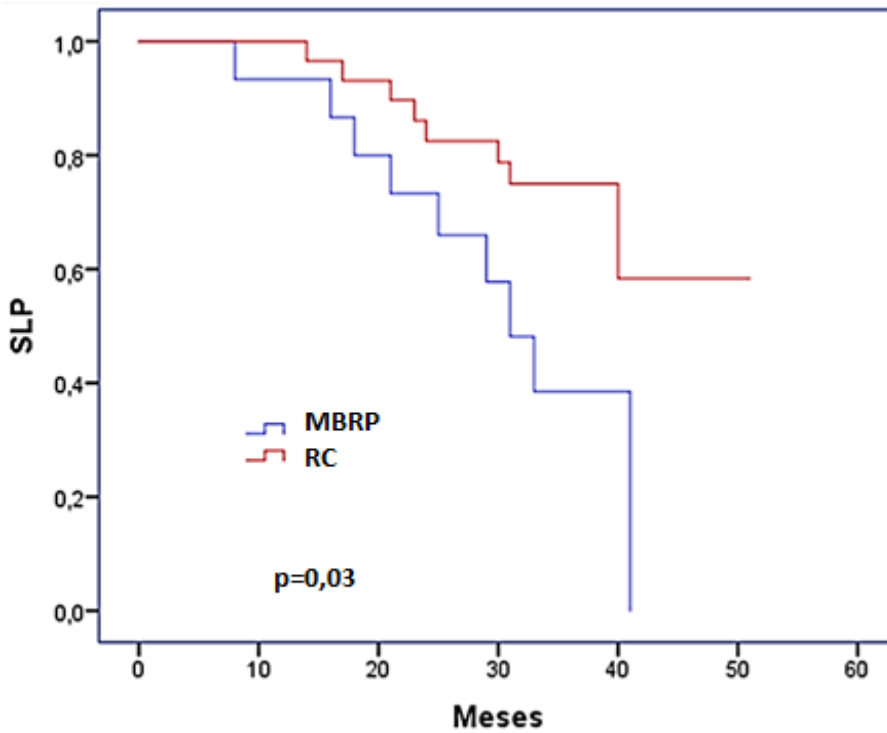


Figura 10. Análisis de la supervivencia libre de progresión (SLP) según la respuesta alcanzada por los pacientes (MBRP, muy buena respuesta parcial vs RC, respuesta completa).

5.4. Resultado del impacto de la valoración de la enfermedad residual mínima por *Next Generation Flow* en la supervivencia libre de progresión

Con una mediana de seguimiento de 33 meses (extremos 8-51), analizamos en todos los pacientes el resultado positivo o negativo de los controles de ERM realizados pre TASP, a los 100 días y al año del TASP. En aquellos pacientes en los que no tenían valoración de la ERM pre TASP, ésta se consideró positiva y si no tenían evaluación de la ERM a los 100 días o al año post TASP, bien por recaída o por no realizada, se valoró el resultado de la ERM inmediatamente anterior. En la **Tabla 20** se muestran los resultados de la detección de ERM realizada en los pacientes en cada uno de los tres momentos evolutivos. Al final del estudio habían recaído 18 de los 44 (41%) pacientes. De éstos, 13 (72%) tuvieron el último control de ERM positivo y fue negativo en los 5 (28%) restantes. Cuando realizamos el análisis estadístico del impacto de la ERM positiva o negativa en la SLP de todos los pacientes en cada uno de los tres momentos (pre TASP, a los 100 días del TASP y al año del TASP) los resultados mostraron una ventaja estadísticamente significativa para los pacientes con ERM negativa efectuada a los 100 días del TASP (no alcanzado vs 33 meses, $p=0,02$) y al año post TASP (no alcanzada vs 30 meses, $p= 0,0004$), las curvas de los tres análisis se representan en las **Figuras 11, 12 y 13**.

RESULTADOS

Tabla 20. Evolución del número de pacientes con ERM positiva o negativa por NGF en cada determinación

	Pre TASP	100 días post TASP	12 meses post TASP	Recaída
ERM positiva				
Número de pacientes (%)	36 (82)	21 (48)	17 (39)	13 (30)
ERM negativa				
Número de pacientes (%)	8 (18)	23 (52)	27 (61)	5 (11)

ERM, enfermedad residual mínima; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica.

RESULTADOS

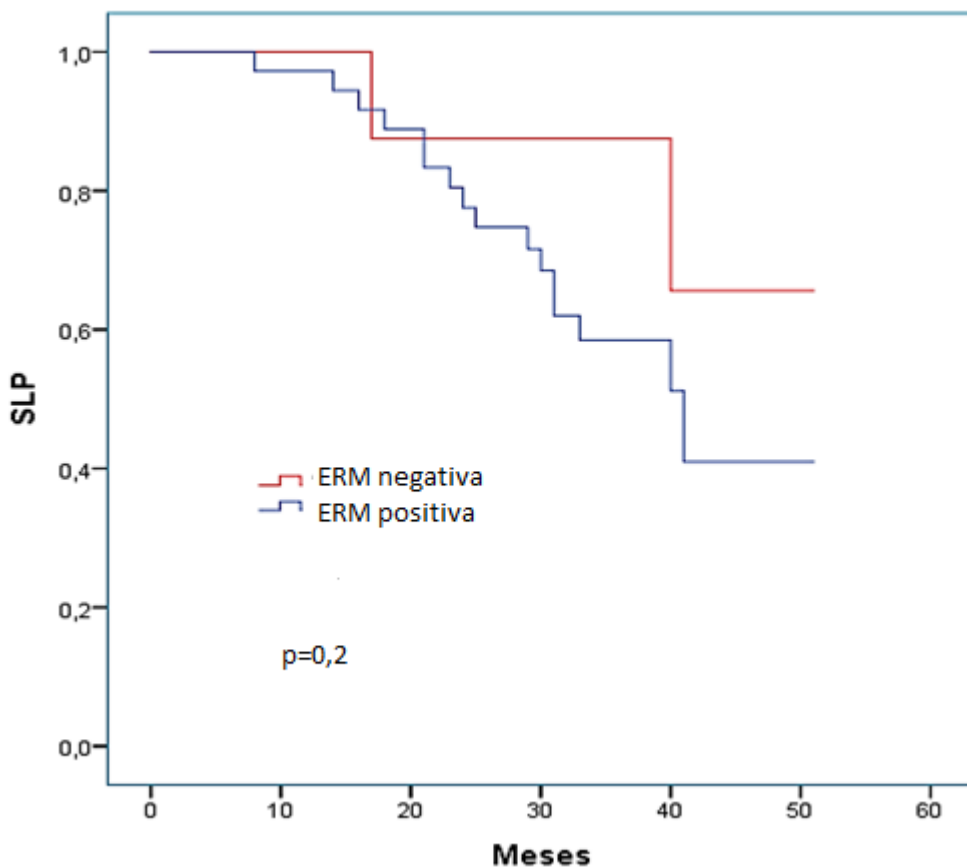


Figura 11. Resultado de SLP en todos los pacientes según ERM negativa o positiva realizada pre TASP.

SLP, supervivencia libre de progresión; ERM, enfermedad mínima residual; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica.

RESULTADOS

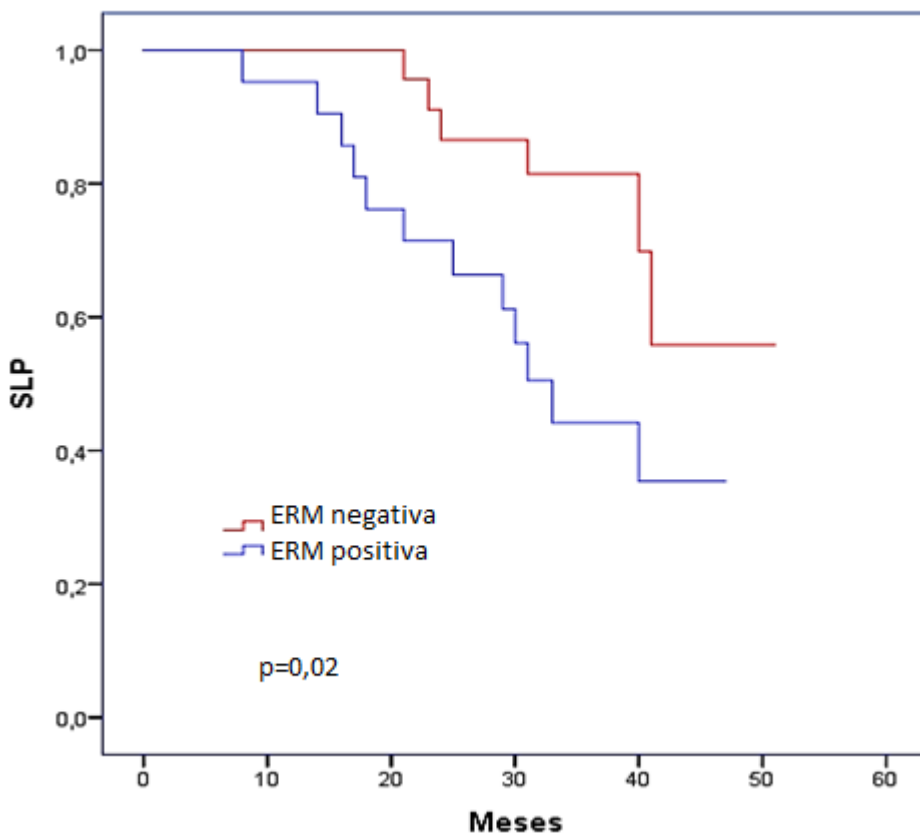


Figura 12. Resultado de SLP en todos los pacientes según ERM negativa o positiva realizada a los 100 días post TASP.

SLP, supervivencia libre de progresión; ERM, enfermedad mínima residual; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica.

RESULTADOS

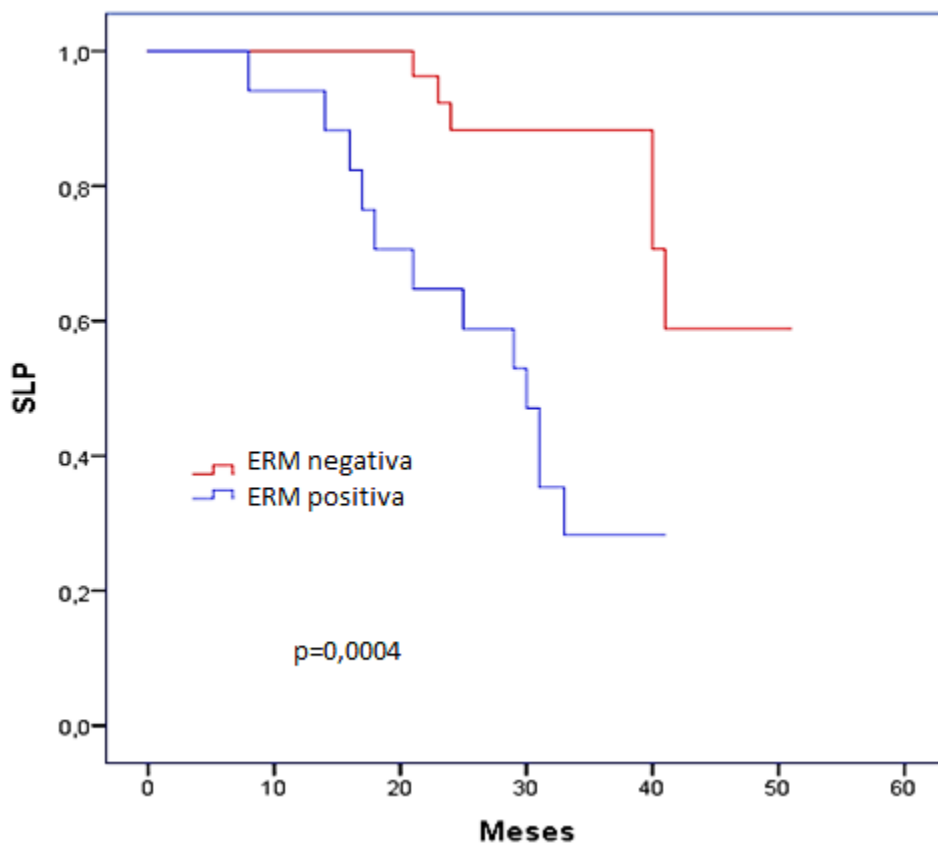


Figura 13. Resultado SLP en todos los pacientes según ERM negativa o positiva realizada al año post TASP.

SLP, supervivencia libre de progresión; ERM, enfermedad mínima residual; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica.

RESULTADOS

En nuestro estudio, 15 (34%) de los 44 pacientes presentaban una MBRP y siete de ellos (46%) alcanzaron una ERM negativa. Las características de estos pacientes se muestran en la **Tabla 21**. Con una mediana de seguimiento de 30 meses (extremos, 8-41) solo uno de los siete pacientes con ERM negativa había recaído frente a los ocho que presentaban ERM positiva, con una SLP no alcanzada en el primer grupo frente 21 meses en el segundo ($p=0,0004$) (**Figura 14**).

Por último, de los siete pacientes con citogenética de alto riesgo, uno alcanzó RC con ERM negativa, tres RC con ERM positiva y los tres restantes consiguieron una MBRP con ERM positiva.

RESULTADOS

Tabla 21. Características de los pacientes en MBRP

CARACTERÍSTICA	ERM POSITIVA	ERM NEGATIVA
Número	8	7
Edad, mediana y extremos (años)	59(45-68)	60(47-67)
Hombres/mujeres	7/1	5/2
Estadio ISS		
I	1	2
II	4	4
III	3	1
Estadio R-ISS		
I	1	2
II	5	4
III	2	0
Citogenética alto riesgo	3	0
Del17p	0	0
t(4;14)	2	0
t(14;16)	1	0
Citogenética no disponible	0	1
Creatinina \geq 2 mg/dL	2	0
LDH elevada	1	1
Tipo de Inmunoglobulina		
IgG	3	4
IgA	2	3
Cadenas ligeras	3	0

ISS, International staging system; R-ISS revised International staging system; Ig, inmunoglobulina.

RESULTADOS

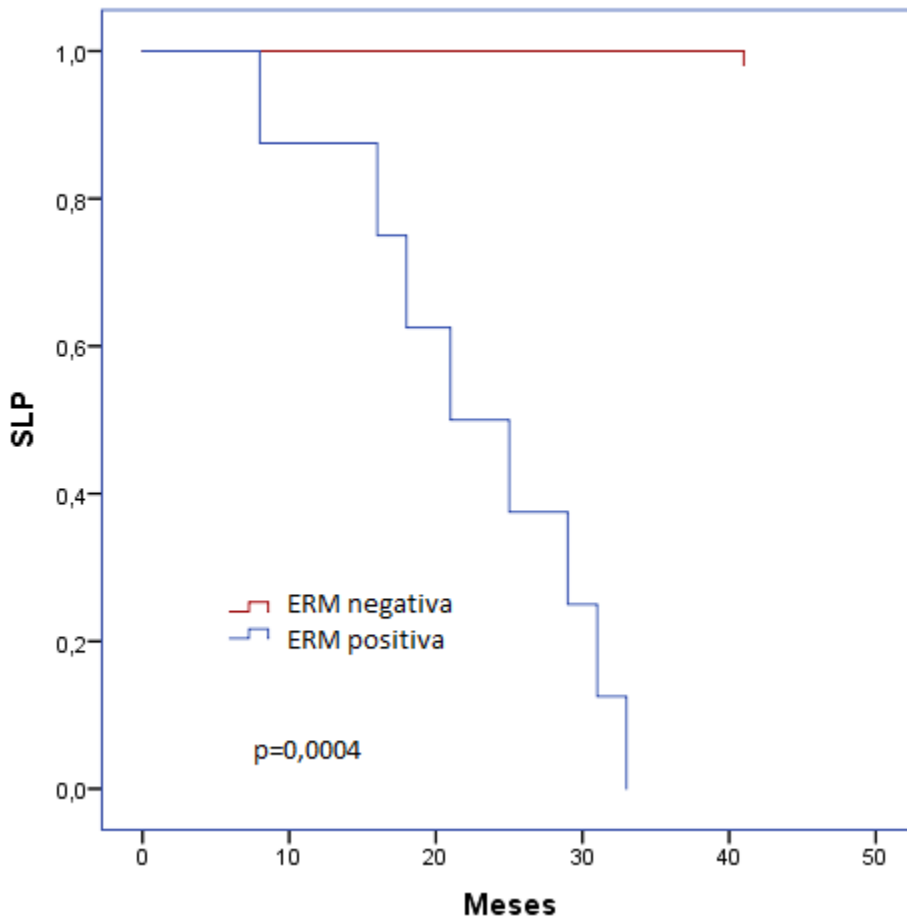


Figura 14. SLP de los pacientes en MBRP según presentaban ERM positiva o negativa a los 12 meses post TASP.

SLP, supervivencia libre de progresión; ERM: enfermedad mínima residual; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica.

RESULTADOS

5.5. Análisis de los pacientes con respuesta completa mantenida

De los 44 pacientes, 17 (40%) han mantenidos en el momento de finalizar el estudio una RC más de 24 meses (33 meses de mediana y extremos 25-47 meses). Dos de estos pacientes han recaído, ambos a los 40 meses del inicio del tratamiento (**Figura 15**).

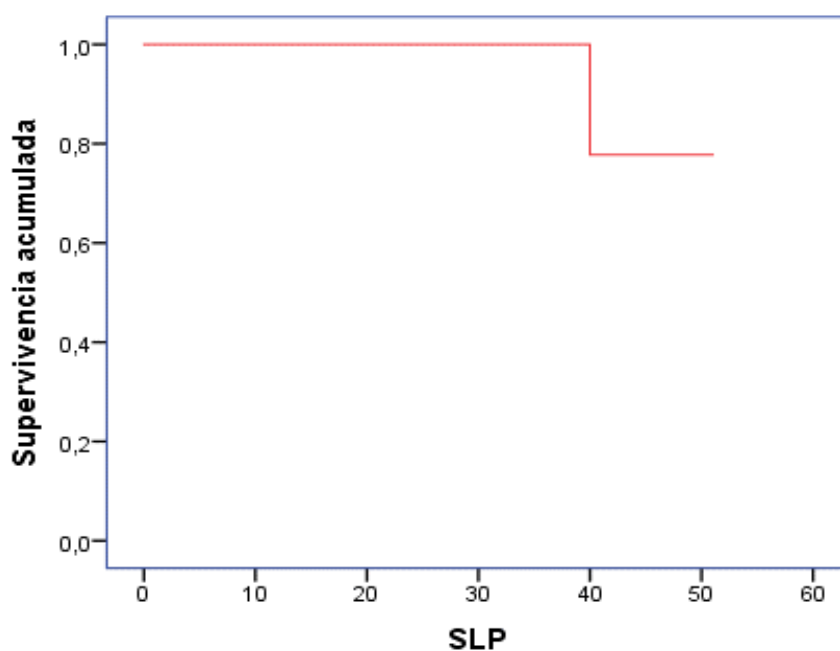


Figura 15. SLP de los pacientes en respuesta completa mantenida durante 24 meses.

SLP, supervivencia libre de progresión.

5.6. Análisis de las pacientes enfermedad residual mínima negativa mantenida

Finalmente con una mediana de seguimiento de 37 meses al finalizar el estudio, diez pacientes (22%) tuvieron una RC con ERM negativa mantenida y solo uno de ellos ha recaído a los 41 meses del diagnóstico.

5.7. Impacto del resultado del ensayo Hevylite® en la SLP

En 18 de 44 pacientes se dispuso de muestras de suero para el análisis de *HLC* y valoración de ERM a los 100 días post TASP. La distribución del tipo de cadena pesada fue de IgG 9 pacientes e IgA 9 pacientes. En total cuatro de ellos presentaban una ratio *HLCi/HLCni* (*rHLC*) alterada. De estos cuatro pacientes, 3 estaban en MBRP y 1 en RC. Los pacientes que presentaron ambos resultados positivos (*rHLC* alterada a favor de la cadena involucrada con ERM positiva) y ambos resultados negativos (*rHLC* no alterada con ERM negativa) fueron 13/18 (72%) (**Tabla 22**). En los 18 pacientes, con una mediana de seguimiento de 37 meses, 2/11 (18%) con ERM negativa han recaído (SLP no alcanzada) frente a 5/7 (71%) con ERM positiva (SLP: 32 meses) ($p= 0,01$). Sin embargo, 5/14 (35%) pacientes con *rHLC* no alterada y 2/4 (50%) de los pacientes con *rHLC* alterada han recaído respectivamente, sin encontrar diferencias en términos de SLP.

RESULTADOS

Tabla 22. Relación de los resultados de la valoración de la ERM por NGF vs rHLC a los 100 días del TASP

ERM por NGF	rHLC	Tipo de respuesta e Ig (núm. pacientes)			
		MBRP		RC	
		IgG	IgA	IgG	IgA
NEGATIVA	NO ALTERADA	4	0	0	6
POSITIVA	ALTERADA	1	2	0	0
NEGATIVA	ALTERADA	0	0	1	0
POSITIVA	NO ALTERADA	2	0	1	1

ERM, enfermedad residual mínima; rHLC, ratio Heavy + Light Chain; NGF, next generation flow; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; MBRP, muy buena respuesta parcial; RC, respuesta completa; Ig, inmunoglobulina.

RESULTADOS

5.8. Análisis de la calidad de las muestras

En 123 de los controles de MO realizados para detección de ERM se pudo efectuar el estudio de la calidad de la muestra. En el momento del análisis, en 45 muestras los pacientes estaban en MBRP y en 78 en RC. De las 45 muestras que los pacientes estaban en MBRP, 12 (26%) fueron negativas y en 33 (73%) positivas. De las muestras de los 78 pacientes que estaban en RC, 49 (62%) presentaron una ERM negativa y 29 (38%) positivas.

Respecto a la celularidad adquirida y el LOD de todas las muestras, calculado según recomendaciones de Arroz y cols, 18 muestras (15%) contaban con menos de 3×10^6 células (LOD $> 0,001, 10^{-5}$), 10 (8%) tuvieron más de 3 y menos de 5×10^6 células evaluables (LOD $< 0,001, 10^{-5}$ y $> 0,0006, 10^{-6}$), en 50 (41%) se alcanzó ≥ 5 y $< 10 \times 10^6$ de células (LOD $< 0,0006, 10^{-6}$ y $> 0,0003, 10^{-6}$) y 45 (36%) tuvieron más de 10×10^6 células de adquisición (LOD $< 0,0003, 10^{-6}$) (**Tabla 8**).

Posteriormente se valoró la calidad de las 78 muestras de MO de los pacientes que estaban en ese momento en RC (49 con ERM negativa y 29 con ERM positiva). Para ello, se analizó la presencia o no de las poblaciones normales de MO según recomendaciones de Flores-Montero y cols, [85] (mastocitos, eritroblastos, células B precursoras CD27 positivas y CD27 negativas, linfocitos B maduros y precursores mieloides) en las muestras tanto con ERM positiva como negativa (**Tabla 23**). El análisis reveló que el porcentaje de muestra de MO con poblaciones disminuidas, era similar en los pacientes con ERM positiva y ERM negativa. De hecho,

RESULTADOS

incluso se identificó un mayor número de muestras de MO con ERM positiva que tienen un bajo título de mastocitos que constituye la población más representativa en lo que se refiere a la calidad de la muestra. Al analizar los porcentajes de las poblaciones medulares en la última muestra de MO de los cuatro pacientes en RC con ERM negativa que recayeron, tres de ellas mostraron una muestra de mala calidad, dos por la baja adquisición final de células para el análisis ($< 3.000.000$) y la restante por la ausencia de mastocitos a pesar de una adecuada adquisición celular (5.576.874 eventos celulares) por lo que probablemente los resultados pudieron ser falsos negativos (**Tabla 24**).

RESULTADOS

Tabla 23. Porcentaje de poblaciones medulares bajas en muestras con resultado ERM negativo y ERM positivo en pacientes en remisión completa

Poblaciones en MO	Medianas de valores normales (extremos, % de CNT)	% de muestras con niveles bajos	
		ERM Negativa	ERM Positiva
Mastocitos	0,006 (0002-0,03)	12 (6 de 49)	21 (6 de 29)
Eritroblastos	6,4 (2–11,5)	0	10 (3 de 29)
Células B precursoras CD27+	0,08 (0,004-0,4)	24 (12 de 49)	24 (7 de 29)
Células B precursoras CD27–	0,4 (0,05–2,2)	14 (7 de 49)	10 (3 de 29)
Linfocitos B maduros	1,6 (0,6–3,5)	24 (12 de 49)	34 (10 de 29)
Precursores mieloides	1,8 (0,2–3,6)	10 (5 de 49)	10 (3 de 29)

MO, médula ósea; ERM, enfermedad residual mínima; CNT, celularidad nucleada total.

RESULTADOS

Tabla 24. Distribución de las poblaciones medulares en pacientes en RC con ERM negativa en recaída

	PACIENTE 1	PACIENTE 2	PACIENTE 3	PACIENTE 4
Celularidad adquirida total (tubo 1 y tubo 2)	9.875.964	5.576.874	2.219.750	738.879
Poblaciones MO % valores normales de CNT, mediana (extremos)	PACIENTE 1 (% de CNT)	PACIENTE 2 (% de CNT)	PACIENTE 3 (% de CNT)	PACIENTE 4 (% de CNT)
Mastocitos 0,006 (0,002-0,03)	0,02	0	0,05	0,01
Eritroblastos 6,4 (2-11,5)	3,6	2,7	5,8	9,12
Células B precursoras CD27+ 0,08 (0,004-0,4)	0,003	0,003	0,4	0,03
Células B precursoras CD27- 0,4 (0,05-2,2)	0,02	0,13	0,3	0,05
Linfocitos B maduros 1,6 (0,6-3,5)	1,6	2,34	1,1	1,53
Precursores mieloides 1,8 (0,2-3,6)	0,5	0,6	1,5	0,65

CNT, celularidad nucleada total; MO, médula ósea.

6.DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Numerosas publicaciones en MM han confirmada la relación entre la profundidad de la respuesta y la SLP tanto en los pacientes candidatos como en los no candidatos a TASP [1, 91, 102-116]. Por este motivo, actualmente alcanzar una RC mantenida es el objetivo prioritario de todo tratamiento, especialmente en pacientes en fases precoces de la enfermedad [117-119].

De los 44 pacientes de nuestra serie, 29 alcanzaron RC y 15 MBRP. Con una mediana de seguimiento desde el inicio del tratamiento de 33 meses (extremos, 8-51), la SLP de los pacientes con MBRP fue significativamente menor que la de los pacientes que consiguieron RC (31 meses vs no alcanzada; $p=0,03$), datos que coinciden con lo publicado en la literatura [111].

Respecto a la valoración de la ERM por *NGF* en los pacientes en tratamiento con los nuevos fármacos, existen varias publicaciones recientes que han demostrado su impacto pronóstico tanto en la SLP como en la SG en pacientes con MM candidatos a TASP. Así, en el protocolo GEM2012MENOS65 que incluyó 458 pacientes, se estudió la ERM después de la de inducción, a los 100 días del TASP y tras la consolidación. Los resultados mostraron una SLP a los 3 años del 87% frente al 50% y una SG del 96% vs 88% en los pacientes con ERM indetectable vs persistente después de la consolidación [120]. Más recientemente, en el estudio internacional, multicéntrico CASSIOPEA se comparó cuatro ciclos de inducción con VTd frente a un esquema cuádruple con daratumumab más VTd (Dara-VTd) seguido de TASP y dos ciclos de consolidación con el mismo régimen que en la inducción. Los

DISCUSIÓN

resultados, demostraron que Dara-VTd mejoraba la profundidad de la respuesta tanto antes como después del TASP con mayor número de pacientes que alcanzaban ERM negativa tras el TASP y una SLP más prolongada [121]. En otro análisis de 79 pacientes con MM de nuevo diagnóstico incluidos en los ensayos clínicos fase 3, NCT01091831 y NCT01208766 (EMN02/HO95MM), la evaluación de la ERM por CMF con sensibilidades de 10^{-4} - 10^{-5} tras la intensificación/consolidación fue el más potente predictor de SLP [122]. Este resultado se confirmó posteriormente tras una mediana de seguimiento de 60 meses, mostrando un riesgo más reducido de progresión o muerte de los pacientes que alcanzaban ERM negativa, antes de empezar el mantenimiento respecto a los pacientes que mantuvieron la ERM positiva [123]. Nuestro estudio concuerda con lo referido, en el sentido de que los pacientes que presentan una ERM negativa vs ERM positiva a los 100 días y al año del TASP, tienen una mayor SLP, no alcanzada vs 33 meses ($p=0,02$) y no alcanzada vs 30 meses ($p=0,0004$) respectivamente.

Con respecto a los pacientes en MBRP, los resultados conjuntos de pacientes incluidos en los ensayos clínicos GEM2005MENOS65 y GEM2010MAS65, demostraron que los pacientes en RC con ERM positiva después del tratamiento tienen un pronóstico similar al de los pacientes en MBRP o menos [91]. De estos datos se podría deducir que todos los pacientes con una MBRP o peor deberían tener la ERM positiva, sin embargo, esto no siempre es así. La eliminación tumoral y el aclaramiento del CM en el suero tras un tratamiento efectivo puede seguir diferentes

DISCUSIÓN

dinámicas, ya que la vida media de las IgA e IgG es relativamente alta (~3–4 semanas) [124] y por lo tanto, la detección del CM no necesariamente refleja la persistencia de CPP en la MO. De hecho, muchos de estos casos de MBRP con ERM negativa pasan pronto a RC, por lo que algunos autores sugieren en la literatura que la evaluación de la ERM debería realizarse en el contexto de RC dado que el momento de alcanzar una ERM negativa no parece especialmente relevante desde el punto de vista pronóstico [120]. En nuestro estudio, cuando comparamos la SLP de los pacientes en MBRP con ERM negativa (n=7) o positiva (n=8), y a pesar del bajo número de casos, ésta fue significativamente más larga en los primeros (no alcanzadas vs 21 meses; $p=0,0004$) y similar a la observada en el grupo de pacientes en RC. Es llamativo que probablemente por la mayor sensibilidad de la valoración de la ERM por *NGF* los pacientes con MBRP que presentaban ERM persistentemente positiva, el porcentaje de CPP encontradas en las muestras de MO era muy elevado (10^{-1} - 10^{-2}) con una mediana de 0,44% (0,01-0,8%). Por otra parte, de los siete pacientes en MBRP y ERM negativa, uno ha recaído y seis permanecen en respuesta (cinco han pasado a RC y uno sigue en MBRP). Estos resultados concuerdan con lo publicado y podrían sugerir que los pacientes con MBRP con ERM negativa por *NGF* realmente son y se comportan como pacientes en RC con ERM negativa [91]. Así, la evaluación de la ERM por *NGF* a parte de tener un impacto pronóstico en pacientes en MBRP también podría ayudar a discriminar pacientes con MBRP “reales”, es decir, los que presentaran una ERM positiva mantenida

DISCUSIÓN

de pacientes con MBRP “que van a evolucionar a RC” que serían aquellos con ERM negativa.

Otro aspecto muy debatido en la literatura es el impacto de la ERM negativa en los pacientes con MM con citogenética de alto riesgo. Se ha demostrado que estos paciente alcanzan ERM negativa con menos frecuencia que los pacientes de riesgo citogenético estándar (alrededor de un 10%) [125, 126]. Sin embargo, se ha comprobado que una vez alcanzada ésta, la SLP es similar a la de los pacientes con citogenética de riesgo estándar [31, 91, 120]. Nuestros resultados, aunque en un reducido número de pacientes, parecen coincidir con lo descrito en la literatura. Así, de los siete pacientes con citogenética de alto riesgo, seis tenían ERM positiva, (tres en MBRP y tres en RC) y uno ERM negativa (en RC). Los seis pacientes con ERM positiva han recaído entre 4 y 43 meses, mientras que el paciente con ERM negativa sigue en respuesta a los 41 meses del diagnóstico.

Las estrategias del tratamiento de MM han cambiado mucho en los últimos años y en este momento se propugna el uso de tres fases en los pacientes candidatos a TASP, inducción y TASP, consolidación y mantenimiento. Para la inducción y consolidación se deben seleccionar fármacos que consigan una respuesta profunda y rápida con el fin de alcanzar la RC. Sin embargo, para la fase de mantenimiento, se deben considerar medicamentos poco tóxicos y con actividad inmunomoduladora para obtener y mantener una ERM negativa. De hecho, publicaciones previas han demostrado que un número significativo de pacientes con ERM positiva pueden pasar

DISCUSIÓN

a ERM negativa con el tratamiento de mantenimiento con lenalidomida [126, 127]. Actualmente está en debate si alcanzar una ERM negativa y mantenerla en el tiempo (ERM negativa mantenida) tiene un valor pronóstico favorable. En los criterios de consenso del IMWG del 2016 ya se recomendó la monitorización de la ERM durante el curso de la enfermedad [13]. Desde entonces se ha hecho evidente que aunque la negatividad de ERM en el momento de alcanzar la RC claramente predice una supervivencia más larga, la estratificación del riesgo es significativamente mejor cuando este resultado se reproduce entre los 6 a 12 meses [128]. Además, se plantea si la monitorización de la ERM puede ser útil para guiar las decisiones de tratamiento para adaptar el tipo y duración del tratamiento hasta alcanzar su negatividad [121, 126, 127, 129-131] o para decidir cuándo comenzar el retratamiento en pacientes en los que una vez alcanzada la ERM negativa, ésta se vuelve positiva [132]. Recientemente se ha publicado un consenso internacional para intentar protocolizar la ejecución y presentación de informes en la evaluación de la ERM en MM dentro de ensayos clínicos. En este documento se realizan declaraciones de consenso en sintonía con nuestro trabajo [133] y aconsejan su realización en las distintas fases del tratamiento, es decir, al final de la inducción, post TASP y antes del inicio del mantenimiento, con monitorización a partir de entonces para orientar las decisiones terapéuticas. También cada vez más están surgiendo publicaciones [6] [9, 134] que apoyan la aplicación de la ERM en la práctica clínica y en el seguimiento de los pacientes, proponiendo que un resultado ERM negativo todavía tiene un cierto grado de incertidumbre por la posibilidad de ser un

DISCUSIÓN

falso negativo, sin embargo la persistencia de ERM positiva es un indicador claro de pronóstico adverso, incluso entre pacientes en RC. En consecuencia, parece más seguro tomar decisiones clínicas basadas en ERM persistentemente positiva que en ERM negativa. Actualmente se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos con diferentes estrategias terapéuticas guiados a controlar y mantener silente la enfermedad a largo plazo [6, 135].

En nuestra serie, con una mediana de seguimiento de 33 meses (extremos, 8-51), 36 (82%) de los 44 pacientes tuvieron una primera ERM pre TASP positiva, persistiendo al final del seguimiento 17 (39%) con la última ERM realizada positiva, 13 de los cuales han recaído (76%). De los ocho pacientes con ERM negativa en la valoración pre TASP, solo dos de ellos ha pasado a ERM positiva. En conjunto, al final del seguimiento 27 (61%) pacientes estaban con ERM negativa, cinco de los cuales han recaído. Es decir, al final del seguimiento hay 5/44 (11%) pacientes con ERM negativa que han recaído y 4/44 (9%) de pacientes con ERM positiva que continúan en repuesta. Por otra parte, observamos que los cambios en el resultado de la ERM de los pacientes durante el tratamiento muestran todas las combinaciones, aunque la más frecuente es en aquellos pacientes que empezaron con ERM positiva y pasaron a negativa, 21/44 (47%). También se observa que, de los 18 pacientes en recaída, 12 (66%) presentaban una ERM persistentemente positiva. En conjunto, nuestros resultados confirman la necesidad de realizar estudios de ERM durante el seguimiento de la enfermedad como se aconseja en la literatura, debido al importante

DISCUSIÓN

porcentaje de pacientes que negativizan la ERM durante el tratamiento y al mal pronóstico de mantener un ERM positiva.

Por último, como ya hemos comentado en los resultados, de los 17 pacientes (40%) que presentan una RC mantenida (24 meses o más) solo han recaído dos (11%) en el momento de finalizar este estudio, y de los 10 (22%) que presentan una RC con ERM negativa mantenida (diferencia mínima entre los controles de ERM de un año) solo ha recaído uno tras una mediana de seguimiento de 37 meses. Estos datos, al igual que lo publicado en la literatura[96], parecen confirmar que los pacientes con RC y ERM negativa mantenida tienen menos riesgo de recaída. En conclusión, lo que parece obvio y así lo sugieren nuestros resultados es que la monitorización de la ERM en el MM ayudará a conocer las distintas cinéticas de la enfermedad permitiendo adaptar el tratamiento para intentar prolongar la duración de la respuesta y, quizá, la supervivencia de los pacientes.

Con respecto a la comparación de los resultados de la ERM por *NGF* (positiva/negativa) con la presencia de un resultado normal/anormal del *rHLC*, se observó concordancia en 13 de 18 pacientes (72%). Cuando analizamos en estos 18 pacientes la SLP según el resultado de la ERM, se observó un beneficio de los pacientes con un resultado negativo (no alcanzada vs 32 meses). Sin embargo, no se objetivó que el resultado del *rHLC* influyese en la SLP, quizá por el bajo número de pacientes en este subanálisis.

Desde el punto de vista metodológico, la adaptación de una técnica de ERM por CMF altamente estandarizada y sensible en la

DISCUSIÓN

rutina de un laboratorio de CMF dentro de la asistencia diaria no está exento de dificultades. Tras la encuesta realizada en 2013 [27] en los Estados Unidos en la que se mostraba una gran variabilidad en la determinación de la ERM por CMF en un grupo de laboratorios, se realizó una segunda encuesta más reciente [136] que mostró una mejoría sustancial en la estandarización de la técnica pero todavía casi la mitad de los laboratorios adquirían menos celularidad y por tanto conseguían menos sensibilidad del estándar requerido por el *IMWG* [13] sin realizar pre lisis en la preparación de la muestra como recomienda el método ya descrito de EuroFlow [85].

Varios son los motivos que pueden hacer que una prueba de ERM realizada por *NGF* no sea un fiel reflejo de la enfermedad existente en el paciente. En primer lugar, esto puede ser debido a que el MM es sobre todo una enfermedad de la MO, los análisis de ERM se centran principalmente en muestras medulares con la imposibilidad de poder detectar la enfermedad extramedular. En segundo lugar, ya desde la realización del AMO se debe tener mucho cuidado en obtener una muestra de calidad que debe ser el del primer aspirado y de no más de 2 mL para no producir una hemodilución y la consiguiente reducción de, al menos, 20 veces la proporción de células plasmáticas que en muestras no hemodiluidas [36, 137]. Otra dificultad añadida a la implementación de la técnica de la ERM por *NGF* en la rutina de la mayoría de hospitales, es el hecho de la necesidad de usar dos tubos que comparten seis AcMo e incluyen diez AcMo, con un aumento de los costes económicos.

DISCUSIÓN

Así, hay publicaciones con alternativas de un solo tubo de 10 colores [138] e incluso comparaciones con un solo tubo de ocho colores [139, 140]. También hay que sumar la necesidad de invertir mayor tiempo en la preparación y adquisición de las muestras (alrededor de 4 horas) debido al método *bulk lysis* y al cada vez mayor número de células necesarias (hasta 5 millones por tubo), con el consiguiente aumento de mano de obra. Si se tiene en cuenta que en un laboratorio de citometría como los de los servicios que han participado en este estudio, se reciben una media de 30 o más muestras por día con sus necesidades mínimas de preparación de media hora y adquisiciones de entre uno y cinco minutos por muestra, se calcula que el tiempo invertido durante el procedimientos es de aproximadamente seis horas con muestras rutinarias.

Otro inconveniente es que a la hora del análisis se necesitan ordenadores con suficiente capacidad y un software actualizado para optimizar el tiempo y la interpretación de la muestra adquirida, sin olvidarse de la importancia de la experiencia del especialista que analiza la muestra. Todo lo anterior, por tanto, conlleva una sobrecarga de trabajo y encarecimiento de la prueba y puede plantear barreras para una amplia adopción en todos los laboratorios y limitar su aplicabilidad a centros con unidades de ensayos clínicos, lo que le restaría la utilidad clínica deseada. Así, aun hoy en día su práctica no está generalizada en laboratorios de CMF en los que se realizan ERM a los pacientes con MM.

DISCUSIÓN

Nuestro trabajo se ha adelantado a estas publicaciones poniendo en práctica la implementación de la realización de la ERM por *NGF* en la rutina de tres laboratorios de la vida real y cuyos resultados se muestran consistentes, primero por el impacto estadísticamente significativo en la SLP y segundo por la buena calidad de las muestras. Así, de las 123 muestras analizadas, la gran mayoría cumplía con el primer requisito de calidad que es el número de células adquiridas, teniendo el 85% de ellas un aceptable LOD $<0,001\%$ e idealmente el 77% un LOQ $<0,001\%$. Consecuentemente con esto, cuando analizamos la calidad de las muestras según el número de poblaciones medulares encontradas, vemos que el porcentaje de aquellas muestras con ERM negativo que no alcanzan los niveles establecidos (hasta un 24% según poblaciones) es bajo y concordante con lo referido en la literatura [85]. Cuando hacemos la comparativa de las muestras con resultado ERM positivo vs las que han obtenido un resultado negativo, observamos que no hay diferencias entre las poblaciones medulares y que, al contrario de lo que se esperaría, las muestras con resultado ERM negativo presentan un porcentaje más alto de mastocitos. Al analizar estas poblaciones medulares en aquellos pacientes con ERM negativa que han recaído, reparamos que en dos de ellas la celularidad adquirida no alcanza los estándares ideales establecidos ($< 3.000.000$ de células) y otra no tenía mastocitos, indicativos ambos de una muestra de mala calidad y, probablemente, sugestivas de falsos negativos.

DISCUSIÓN

En conclusión, nuestro estudio muestra que la aplicabilidad del análisis de ERM por *NGF* en pacientes con MM en la rutina de un laboratorio clínico es posible y necesario, aunque es cierto que queda camino por recorrer. Un asunto importante es el que respecta al principal punto de partida que es el número de células obtenidas para analizar y que pueden ser insuficientes por varias circunstancias, desde la falta de comunicación entre el médico que realiza el AMO y el laboratorio, obteniendo la muestra como si fuera un diagnóstico y no una ERM, la mala extracción con muestras de mucho volumen o que no sean de la primera embolada y la consecuente hemodilución o la errónea distribución de los tubos no reservando el de mejor calidad a la CMF. Otros aspectos como la incorporación de nuevos citómetros, programas de análisis, ordenadores de suficiente capacidad y más personal, son cuestiones que van más allá de nuestras posibilidades actuales y para las que se requeriría una colaboración más estrecha entre las diferentes instituciones.

CONCLUSIONES

7.CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Esta Tesis Doctoral se ha centrado en la valoración prospectiva del impacto de la respuesta al tratamiento, medida con los métodos de valoración de respuesta tradicionales y con algunas de las últimas tecnologías como la cuantificación de la ERM por *NGF* o las *HLC*, en la SLP de pacientes con MM de nuevo diagnóstico y candidatos a TASP tratados con un esquema estándar, dentro de la práctica diaria de un grupo de hospitales de la Comunidad Valenciana, obteniéndose las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes en MBRP tienen una SLP significativamente más reducida que los pacientes que alcanzan RC tras el tratamiento inicial.
2. Los pacientes que alcanzan ERM negativa medida por *NGF* a los 100 días post TASP y al año post TASP, tienen una SLP significativamente mayor que los pacientes con ERM positiva.
3. Nuestro estudio sugiere que el grupo de pacientes con mejor pronóstico es el que alcanza una RC con ERM negativa mantenida.
4. En nuestro estudio no se ha observado que el resultado de la ERM medida por la técnica de Hevylite® influyese en la SLP, quizá debido al bajo número de pacientes disponibles.

CONCLUSIONES

5. Nuestro estudio muestra que es posible implementar la monitorización de los pacientes con MM mediante la realización de la ERM por *NGF* en la práctica rutinaria de los laboratorios clínicos de CMF, obteniendo muestras de buena calidad.

BIBLIOGRAFÍA

8.BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. van de Velde, H.J., et al., *Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma*. *Haematologica*, 2007. **92**(10): p. 1399-406.
2. Martinez-Lopez, J., et al., *Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation*. *Blood*, 2011. **118**(3): p. 529-34.
3. Alegre Amor, A., *Discrasia de células plasmáticas. Gammopatías monoclonales. Mieloma múltiple.*, in *Pregrado de Hematología 4ª edición*. 2017, Moraleda Jiménez, J.M.: Madrid. Editorial Luzàn 5,S.A. p. 417-441.
4. Liedtke, M. and R. Fonseca, *Plasma cell disorders*, in *American Society of Hematology Self-Assessment Program, Seventh Edition*, A. Cuker, et al., Editors. 2019, American Society of Hematology. p. 0.
5. Martinez-Lopez, J., et al., *Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality*. *Blood*, 2015. **126**(7): p. 858-62.
6. Burgos, L., et al., *Measurable residual disease in multiple myeloma: ready for clinical practice?* *J Hematol Oncol*, 2020. **13**(1): p. 82.
7. Mazzotti, C., et al., *Myeloma MRD by deep sequencing from circulating tumor DNA does not correlate with results obtained in the bone marrow*. *Blood Adv*, 2018. **2**(21): p. 2811-2813.

BIBLIOGRAFÍA

8. Sanoja-Flores, L., et al., *Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy*. *Blood*, 2019. **134**(24): p. 2218-2222.
9. Mina, R., S. Oliva, and M. Boccadoro, *Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: State of the Art and Future Perspectives*. *J Clin Med*, 2020. **9**(7).
10. Blade, J., et al., *Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant*. *Br J Haematol*, 1998. **102**(5): p. 1115-23.
11. Durie, B.G., et al., *International uniform response criteria for multiple myeloma*. *Leukemia*, 2006. **20**(9): p. 1467-73.
12. Rajkumar, S.V., et al., *Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1*. *Blood*, 2011. **117**(18): p. 4691-5.
13. Kumar, S., et al., *International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(8): p. e328-e346.
14. Puig, N., *Análisis celular con citometría de flujo. Fundamentos y aplicaciones*, ed. S.L. Pharma and Health Consulting. 2015, Madrid, España.

BIBLIOGRAFÍA

15. Rawstron, A.C., et al., *Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders*. Haematologica, 2008. **93**(3): p. 431-8.
16. van Dongen, J.J., et al., *EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes*. Leukemia, 2012. **26**(9): p. 1908-75.
17. San Miguel, J.F., et al., *Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1853-6.
18. Paiva, B., et al., *Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders*. Cytometry B Clin Cytom, 2010. **78**(4): p. 239-52.
19. Paiva, B., et al., *Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2011. **29**(12): p. 1627-33.
20. Mathis, S., et al., *Comparison of cross-platform flow cytometry minimal residual disease evaluation in multiple myeloma using a common antibody combination and analysis strategy*. Cytometry B Clin Cytom, 2015. **88**(2): p. 101-9.
21. Sarasquete, M.E., et al., *Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain*

BIBLIOGRAFÍA

- reaction and flow cytometry*. Haematologica, 2005. **90**(10): p. 1365-72.
22. de Tute, R.M., et al., *A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma*. Leukemia, 2007. **21**(9): p. 2046-9.
23. Gupta, R., et al., *Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma*. Am J Clin Pathol, 2009. **132**(5): p. 728-32.
24. Rawstron, A.C., et al., *Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study*. J Clin Oncol, 2013. **31**(20): p. 2540-7.
25. Robillard, N., et al., *A single-tube multiparameter seven-colour flow cytometry strategy for the detection of malignant plasma cells in multiple myeloma*. Blood Cancer J, 2013. **3**: p. e134.
26. Flores-Montero, J., et al., *Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma*. Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 61-72.
27. Flanders, A., M. Stetler-Stevenson, and O. Landgren, *Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity*. Blood, 2013. **122**(6): p. 1088-9.
28. *Special Issue: Multiple Myeloma Special Issue: The Flow Cytometric Detection of Minimal Residual Disease*, in Vol 90.

BIBLIOGRAFÍA

- Issue 1. Cytometry Part B: Clinical Cytometry.* January, 2016: 10.1002/cyto.b.21359. p. 1-100.
29. Landgren, O. and R.G. Owen, *Better therapy requires better response evaluation: Paving the way for minimal residual disease testing for every myeloma patient.* Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 14-20.
 30. Rawstron, A.C., B. Paiva, and M. Stetler-Stevenson, *Assessment of minimal residual disease in myeloma and the need for a consensus approach.* Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 21-5.
 31. Paiva, B., et al., *Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients.* Blood, 2016. **127**(25): p. 3165-74.
 32. Stetler-Stevenson, M., et al., *Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition.* Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 26-30.
 33. Arroz, M., et al., *Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting.* Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 31-9.
 34. Oldaker, T.A., P.K. Wallace, and D. Barnett, *Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma.* Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 40-6.

BIBLIOGRAFÍA

35. Wood, B.L., *Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry*. Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 47-53.
36. Rawstron, A.C., et al., *Measuring disease levels in myeloma using flow cytometry in combination with other laboratory techniques: Lessons from the past 20 years at the Leeds Haematological Malignancy Diagnostic Service*. Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 54-60.
37. Gormley, N.J., et al., *Regulatory perspective on minimal residual disease flow cytometry testing in multiple myeloma*. Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 73-80.
38. Muccio, V.E., et al., *Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents*. Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 81-90.
39. Pojero, F., et al., *Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases*. Cytometry B Clin Cytom, 2016. **90**(1): p. 91-100.
40. San Miguel, J.F., et al., *Immunophenotypic heterogeneity of multiple myeloma: influence on the biology and clinical course of the disease. Castellano-Leones (Spain) Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies*. Br J Haematol, 1991. **77**(2): p. 185-90.
41. Harada, H., et al., *Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2658-63.

BIBLIOGRAFÍA

42. Jackson, N., et al., *An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens*. Clin Exp Immunol, 1988. **72**(3): p. 351-6.
43. Orfao, A., et al., *A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique*. Cytometry, 1994. **17**(4): p. 332-9.
44. Arana, P., et al., *Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: a PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials*. Leukemia, 2018. **32**(4): p. 971-978.
45. Wijdenes, J., et al., *A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1*. Br J Haematol, 1996. **94**(2): p. 318-23.
46. Sherbenou, D.W., et al., *The development of potential antibody-based therapies for myeloma*. Blood Rev, 2015. **29**(2): p. 81-91.
47. Yang, Y., et al., *Heparan sulfate regulates targeting of syndecan-1 to a functional domain on the cell surface*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 12888-93.
48. Tembhare, P.R., et al., *Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases*. Leuk Res, 2014. **38**(3): p. 371-6.

BIBLIOGRAFÍA

49. Pojero, F., et al., *Old and new immunophenotypic markers in multiple myeloma for discrimination of responding and relapsing patients: The importance of "normal" residual plasma cell analysis*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2015. **88**(3): p. 165-82.
50. Liu, D., et al., *Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma*. *J Clin Pathol*, 2012. **65**(9): p. 823-9.
51. Cannizzo, E., et al., *Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. **78**(4): p. 231-8.
52. Paiva, B., et al., *Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance*. *Leukemia*, 2017. **31**(2): p. 382-392.
53. Arana, P., et al., *Prognostic value of antigen expression in multiple myeloma: a PETHEMA/GEM study on 1265 patients enrolled in four consecutive clinical trials*. *Leukemia*, 2017. **32**: p. 971.
54. Peceliunas, V., et al., *Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2011. **80**(5): p. 318-23.
55. Kumar, S., T. Kimlinger, and W. Morice, *Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2010. **23**(3): p. 433-51.

BIBLIOGRAFÍA

56. An, G., et al., *t(11;14) multiple myeloma: a subtype associated with distinct immunological features, immunophenotypic characteristics but divergent outcome*. *Leuk Res*, 2013. **37**(10): p. 1251-7.
57. Yokoi, S., et al., *Cytogenetic Study and Analysis of Protein Expression in Plasma Cell Myeloma with t(11;14)(q13;q32): Absence of BCL6 and SOX11, and Infrequent Expression of CD20 and PAX5*. *J Clin Exp Hematop*, 2015. **55**(3): p. 137-43.
58. Wang, H., et al., *[Diagnostic Value of CD27 Antigen in Patients with Multiple Myeloma]*. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2017. **25**(4): p. 1069-1073.
59. Guikema, J.E., et al., *CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(1): p. 36-43.
60. Moreau, P., et al., *Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome*. *Br J Haematol*, 2006. **132**(2): p. 168-70.
61. Pellat-Deceunynck, C., et al., *Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells*. *Blood*, 1994. **84**(8): p. 2597-603.
62. Mateo, G., et al., *Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(16): p. 2737-44.

BIBLIOGRAFÍA

63. Robillard, N., et al., *CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(6): p. 1521-6.
64. Shapiro, V.S., M.N. Mollenauer, and A. Weiss, *Endogenous CD28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: implications for multiple myeloma progression*. Blood, 2001. **98**(1): p. 187-93.
65. Robillard, N., et al., *CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target*. Leukemia, 2005. **19**(11): p. 2021-2.
66. Shim, H., et al., *Expression of myeloid antigen in neoplastic plasma cells is related to adverse prognosis in patients with multiple myeloma*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 893243.
67. Sahara, N., et al., *Clinicopathological and prognostic characteristics of CD33-positive multiple myeloma*. Eur J Haematol, 2006. **77**(1): p. 14-8.
68. Oka, S., K. Ono, and M. Nohgawa, *Clinical effects of CD33 and MPC-1 on the prognosis of multiple myeloma treated with bortezomib*. Leuk Lymphoma, 2019: p. 1-6.
69. Moreau, P., et al., *Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma*. Haematologica, 2004. **89**(5): p. 547-51.
70. Guo, J., et al., *The prognostic impact of multiparameter flow cytometry immunophenotyping and cytogenetic aberrancies in*

BIBLIOGRAFÍA

- patients with multiple myeloma*. Hematology, 2016. **21**(3): p. 152-61.
71. Gonsalves, W.I., et al., *The prognostic significance of CD45 expression by clonal bone marrow plasma cells in patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Leuk Res, 2016. **44**: p. 32-9.
72. Iqbal, M.S., et al., *Constitutively lower expressions of CD54 on primary myeloma cells and their different localizations in bone marrow*. Eur J Haematol, 2009. **83**(4): p. 302-12.
73. Pellat-Deceunynck, C., et al., *The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma*. Leukemia, 1998. **12**(12): p. 1977-82.
74. Pan, Y., et al., *Absence of both CD56 and CD117 expression on malignant plasma cells is related with a poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Leuk Res, 2016. **40**: p. 77-82.
75. Paiva, B., et al., *Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients*. Leukemia, 2012. **26**(8): p. 1862-9.
76. Ceran, F., et al., *The Assessment of CD56 and CD117 Expressions at the Time of the Diagnosis in Multiple Myeloma Patients*. Turk J Haematol, 2017. **34**(3): p. 226-232.
77. Aref, S., E. Azmy, and A.H. El-Gilany, *Upregulation of CD200 is associated with regulatory T cell expansion and disease*

BIBLIOGRAFÍA

- progression in multiple myeloma*. Hematol Oncol, 2017. **35**(1): p. 51-57.
78. Conticello, C., et al., *CD200 expression in patients with Multiple Myeloma: another piece of the puzzle*. Leuk Res, 2013. **37**(12): p. 1616-21.
79. Moreaux, J., et al., *CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4194-7.
80. Alapat, D., et al., *Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma*. Am J Clin Pathol, 2012. **137**(1): p. 93-100.
81. Douds, J.J., et al., *Diagnostic and prognostic significance of CD200 expression and its stability in plasma cell myeloma*. J Clin Pathol, 2014. **67**(9): p. 792-6.
82. Ise, T., et al., *Elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant cells of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, and mantle cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(1): p. 169-74.
83. Keeney, M., et al., *Marked Variability in Reported Minimal Residual Disease Lower Level of Detection of 4 Hematolymphoid Neoplasms: A Survey of Participants in the College of American Pathologists Flow Cytometry Proficiency Testing Program*. Arch Pathol Lab Med, 2015. **139**(10): p. 1276-80.
84. Domingo Rodriguez Esther, *Desarrollo de una técnica de citometría de flujo multiparamétrica que permite detectar enfermedad mínima residual por debajo del límite establecido, in*

BIBLIOGRAFÍA

- Tesis doctoral. Facultad de ciencias.* 2011, Universidad de Navarra: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra.
85. Flores-Montero, J., et al., *Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma.* *Leukemia*, 2017. **31**(10): p. 2094-2103.
86. Rawstron, A.C., et al., *Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation.* *Blood*, 2002. **100**(9): p. 3095-100.
87. Paiva, B., et al., *Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation.* *Blood*, 2008. **112**(10): p. 4017-23.
88. Paiva, B., et al., *High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma.* *Blood*, 2012. **119**(3): p. 687-91.
89. Rawstron, A.C., et al., *Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction.* *Blood*, 2015. **125**(12): p. 1932-5.
90. Roussel, M., et al., *Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study*

BIBLIOGRAFÍA

- by the Intergroupe Francophone du Myelome. J Clin Oncol, 2014. 32(25): p. 2712-7.*
91. Lahuerta, J.J., et al., *Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three PETHEMA/GEM Clinical Trials. J Clin Oncol, 2017. 35(25): p. 2900-2910.*
 92. Landgren, O., et al., *Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: a meta-analysis. Bone Marrow Transplant, 2016. 51(12): p. 1565-1568.*
 93. Munshi, N.C., et al., *Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. JAMA Oncol, 2017. 3(1): p. 28-35.*
 94. Munshi, N.C., et al., *Expanded Meta-Analyses Confirms the Association between MRD and Long-Term Survival Outcomes in Multiple Myeloma (MM). Blood, 2019. 134(Supplement_1): p. 4742-4742.*
 95. Paiva, B., et al., *The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapsed multiple myeloma. Haematologica, 2015. 100(2): p. e53-5.*
 96. Terpos, E., et al., *Impact of Minimal Residual Disease Detection by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma Patients with Sustained Complete Remission after Frontline Therapy. Hemasphere, 2019. 3(6): p. e300.*
 97. Kazandjian, D., et al., *Remission and Progression-Free Survival in Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma Treated With*

BIBLIOGRAFÍA

- Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone: Five-Year Follow-up of a Phase 2 Clinical Trial.* JAMA Oncology, 2018. **4**(12): p. 1781-1783.
98. Paiva, B., R. García-Sanz, and J.F. San Miguel, *Multiple Myeloma Minimal Residual Disease.* Cancer Treat Res, 2016. **169**: p. 103-122.
99. Ludwig, H., et al., *Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients.* Leukemia, 2013. **27**(1): p. 213-9.
100. Michallet, M., et al., *Heavy+light chain monitoring correlates with clinical outcome in multiple myeloma patients.* Leukemia, 2018. **32**(2): p. 376-382.
101. Lopez-Anglada, L., et al., *Prognostic utility of serum free light chain ratios and heavy-light chain ratios in multiple myeloma in three PETHEMA/GEM phase III clinical trials.* PLoS One, 2018. **13**(9): p. e0203392.
102. Gay, F., et al., *Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients.* Blood, 2011. **117**(11): p. 3025-31.
103. San Miguel, J.F., et al., *Impact of prior treatment and depth of response on survival in MM-003, a randomized phase 3 study comparing pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus*

BIBLIOGRAFÍA

- high-dose dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma*. Haematologica, 2015. **100**(10): p. 1334-9.
104. San-Miguel, J.F., et al., *Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(11): p. 1195-206.
105. Landgren, O. and K. Iskander, *Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes*. J Intern Med, 2017. **281**(4): p. 365-382.
106. Korde, N., et al., *Treatment With Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone With Lenalidomide Extension in Patients With Smoldering or Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. JAMA Oncol, 2015. **1**(6): p. 746-54.
107. Usmani, S.Z., et al., *Clinical predictors of long-term survival in newly diagnosed transplant eligible multiple myeloma - an IMWG Research Project*. Blood Cancer J, 2018. **8**(12): p. 123.
108. Bladé, J., et al., *High-dose therapy autotransplantation/intensification vs continued standard chemotherapy in multiple myeloma in first remission. Results of a non-randomized study from a single institution*. Bone Marrow Transplantation, 2000. **26**(8): p. 845-849.

BIBLIOGRAFÍA

109. Alexanian, R., et al., *Impact of complete remission with intensive therapy in patients with responsive multiple myeloma*. Bone Marrow Transplantation, 2001. **27**(10): p. 1037-1043.
110. Iacobelli, S., et al., *Impact of CR before and after allogeneic and autologous transplantation in multiple myeloma: results from the EBMT NMAM2000 prospective trial*. Bone Marrow Transplantation, 2015. **50**(4): p. 505-510.
111. Kumar, L., et al., *Complete response after autologous stem cell transplant in multiple myeloma*. Cancer Med, 2014. **3**(4): p. 939-46.
112. Kapoor, P., et al., *Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2013. **31**(36): p. 4529-35.
113. Lahuerta, J.J., et al., *Influence of Pre- and Post-Transplantation Responses on Outcome of Patients With Multiple Myeloma: Sequential Improvement of Response and Achievement of Complete Response Are Associated With Longer Survival*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(35): p. 5775-5782.
114. Barlogie, B., et al., *Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma*. Cancer, 2008. **113**(2): p. 355-9.
115. Chanan-Khan, A.A. and S. Giralt, *Importance of achieving a complete response in multiple myeloma, and the impact of novel agents*. J Clin Oncol, 2010. **28**(15): p. 2612-24.

BIBLIOGRAFÍA

116. Harousseau, J.L., M. Attal, and H. Avet-Loiseau, *The role of complete response in multiple myeloma*. Blood, 2009. **114**(15): p. 3139-46.
117. Terpos, E., et al., *Real-world effectiveness and safety of ixazomib-lenalidomide-dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma*. Ann Hematol, 2020. **99**(5): p. 1049-1061.
118. Joseph, N.S., et al., *Long-Term Follow-Up Results of Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Induction Therapy and Risk-Adapted Maintenance Approach in Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. J Clin Oncol, 2020. **38**(17): p. 1928-1937.
119. Ishida, T., et al., *Continuous lenalidomide treatment after bortezomib-melphalan-prednisolone therapy for newly diagnosed multiple myeloma*. Ann Hematol, 2020. **99**(5): p. 1063-1072.
120. Paiva, B., et al., *Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma*. J Clin Oncol, 2020. **38**(8): p. 784-792.
121. Moreau, P., et al., *Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study*. Lancet, 2019. **394**(10192): p. 29-38.
122. Gambella, M., et al., *Minimal residual disease by flow cytometry and allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative*

BIBLIOGRAFÍA

- polymerase chain reaction in patients with myeloma receiving lenalidomide maintenance: A pooled analysis.* Cancer, 2019. **125**(5): p. 750-760.
123. Cavo, M., et al., *Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib-melphalan-prednisone, with or without bortezomib-lenalidomide-dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study.* Lancet Haematol, 2020. **7**(6): p. e456-e468.
124. Mankarious, S., et al., *The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin.* The Journal of laboratory and clinical medicine, 1988. **112**(5): p. 634-640.
125. Perrot, A., et al., *Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma.* Blood, 2018. **132**(23): p. 2456-2464.
126. Oliva, S., et al., *Minimal residual disease (MRD) monitoring by multiparameter flow cytometry (MFC) in newly diagnosed transplant eligible multiple myeloma (MM) patients: Results from the EMN02/HO95 phase 3 trial.* Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(15_suppl): p. 8011-8011.
127. de Tute, R.M., et al., *Minimal Residual Disease in the Maintenance Setting in Myeloma: Prognostic Significance and*

BIBLIOGRAFÍA

- Impact of Lenalidomide*. Blood, 2017. **130**(Supplement 1): p. 904-904.
128. Avet-Loiseau, H., et al., *Evaluation of Sustained Minimal Residual Disease (MRD) Negativity in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM) Patients (Pts) Treated with Daratumumab in Combination with Lenalidomide Plus Dexamethasone (D-Rd) or Bortezomib Plus Dexamethasone (D-Vd): Analysis of Pollux and Castor*. Blood, 2018. **132**(Supplement 1): p. 3272-3272.
129. Gay, F., et al., *Efficacy of carfilzomib lenalidomide dexamethasone (KRd) with or without transplantation in newly diagnosed myeloma according to risk status: Results from the FORTE trial*. Journal of Clinical Oncology, 2019. **37**(15_suppl): p. 8002-8002.
130. Costa, L.J., et al., *Daratumumab, Carfilzomib, Lenalidomide and Dexamethasone (Dara-KRd) Induction, Autologous Transplantation and Post-Transplant, Response-Adapted, Measurable Residual Disease (MRD)-Based Dara-Krd Consolidation in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma (NDMM)*. Blood, 2019. **134**(Supplement_1): p. 860-860.
131. Landgren, O., et al., *Weekly Carfilzomib, Lenalidomide, Dexamethasone and Daratumumab (wKRd-D) Combination Therapy Provides Unprecedented MRD Negativity Rates in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Clinical and Correlative Phase 2 Study*. Blood, 2019. **134**(Supplement_1): p. 862-862.

BIBLIOGRAFÍA

132. Oliva, S., et al., *Minimal residual disease after transplantation or lenalidomide-based consolidation in myeloma patients: a prospective analysis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(4): p. 5924-5935.
133. Costa, L.J., et al., *International harmonization in performing and reporting minimal residual disease assessment in multiple myeloma trials*. *Leukemia*, 2020.
134. Gozzetti, A., et al., *Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: State of the Art and Applications in Clinical Practice*. *J Pers Med*, 2020. **10**(3).
135. Suzuki, K., *Latest treatment strategies aiming for a cure in transplant-eligible multiple myeloma patients: how I cure younger MM patients with lower cost*. *Int J Hematol*, 2020. **111**(4): p. 512-518.
136. Salem, D., et al., *Myeloma minimal residual disease testing in the United States: Evidence of improved standardization*. *American Journal of Hematology*, 2016. **91**(12): p. E502-E503.
137. Manasanch, E.E., et al., *Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method*. *Leuk Lymphoma*, 2015. **56**(5): p. 1416-24.
138. Roshal, M., et al., *MRD detection in multiple myeloma: comparison between MSKCC 10-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube methods*. *Blood Adv*, 2017. **1**(12): p. 728-732.

BIBLIOGRAFÍA

139. Takamatsu, H., et al., *Comparison of minimal residual disease detection in multiple myeloma by SRL 8-color single-tube and EuroFlow 8-color 2-tube multiparameter flow cytometry*. Int J Hematol, 2019. **109**(4): p. 377-381.
140. Takamatsu, H., *Clinical value of measurable residual disease testing for multiple myeloma and implementation in Japan*. Int J Hematol, 2020. **111**(4): p. 519-529.

ANEXOS

9.ANEXOS

9.1. Anexo 1. PNT del marcaje y procesamiento de la muestra según los estándares EuroFlow

PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE MUESTRAS DEL PROYECTO CLÍNICO GREMI PARA DETECCIÓN DE ERM EN MM. PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO DE ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN MIELOMA MÚLTIPLE

1. OBJETO:

Este procedimiento tiene como objeto describir el procesamiento de las muestras para estudio de enfermedad residual mínima (ERM) en pacientes incluidos en el proyecto GREMI ERM MM

2. ALCANCE:

El procedimiento se aplica a las muestras de médula ósea de los pacientes con MM para estudio de ERM que alcancen MBRP o mejor y se le haya hecho el fenotipo del diagnóstico dentro del ensayo GREMI. Las muestras son remitidas al laboratorio de CMF en tres tubos con 2 mL de MO cada uno con anticoagulante EDTA y de la primera embolada de la extracción. Previo al procedimiento realizaremos un recuento leucocitario en la muestra a estudio que debe contener al menos 10×10^6 células nucleadas por cada tubo de ERM que se vaya a marcar.

3. DESCRIPCIÓN:

ANEXOS

El marcaje de la muestra se realiza siguiendo el panel de ERM.

Para el estudio de ERM en médula ósea se procesarán dos tubos, un primer tubo en el cual solo marcaremos las células con anticuerpos monoclonales de superficie de membrana, y otro segundo tubo en el que marcaremos las células con anticuerpos monoclonales de superficie de membrana y citoplasmáticos. Con el primer tubo seguiremos el procedimiento del apartado A, y con el segundo tubo seguiremos el procedimiento del apartado B.

Para el procesamiento de la muestra los pasos a seguir son:

1. Marcaje de los monoclonales (AcMos) de superficie de membrana.

Poner 2 mL de médula ósea en tanto tubos Falcon de 50 mL que sea posible en función del volumen de médula ósea remitido.

Llenar los tubo Falcon de 50 mL (tantos como permita el volumen de muestra de médula ósea remitido) con solución hemolizante PharmLyse de Becton Dickinson, San Jose, CA, hasta alcanzar un volumen de 50 mL.

Mezclar bien por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos en agitador.

Centrifugar a 800g (2200 rpm) durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante por decantación, secando con papel el borde del tubo (una decantación y secar la gota con un papel) Normalmente quedan 300 μ L de la suspensión celular en el tubo.

ANEXOS

□ Resuspender vigorosamente el botón celular en vórtex y golpeado el tubo añadir 2 mL de PBS + 0,09% de NaN₃ (azida de sodio) + 0,5% de BSA (Staining Buffer Solution de e-Bioscience Waltham, Massachusetts, o Pharmingen Stain Buffer BSA de Becton Dickinson, San Jose, CA), para conservar la celularidad.

□ Completar el tubo hasta un volumen final de 50 mL con PBS + 0,09% de NaN₃ + 0,5% de BSA

□ Mezclar manualmente invirtiendo el tubo varias veces.

□ Centrifugar a 800g (2.200 rpm) durante 5 minutos.

□ Eliminar el sobrenadante por decantación, secando con papel el borde del tubo.

□ Resuspender enérgicamente con vórtex el botón celular en 2 mL de PBS + 0,09% de NaN₃ + 0,5% de BSA y golpear tubo para que no quede grumo.

□ Mezclar y transferir todas las muestras de MO a otro tubo Falcon de 15 mL (mejor con pipeta y recoger la espuma con pipeta que se produce por el BSA).

□ Añadir a los tubos Falcon iniciales ahora vacíos, 2 mL de PBS + 0,09% de NaN₃ + 0,5% de BSA para recuperar las células que hayan podido quedar adheridas en el tubo (si el tubo de 15 mL de Falcon está muy lleno pueden ser un mL), agitar bien y golpear el tubo para recuperar lo que haya podido quedar en las paredes y recogerlo con pipeta grande y añadirlo al tubo Falcon de 15 mL. Recoger bien la muestra y la espuma con pipeta. Con los Falcon de 50 ya no vamos a trabajar y se desechan.

ANEXOS

□ En el Falcon de 15mL, habrá unos 7,5 mL de mezcla y entonces centrifugar a 540g (1.800 rpm) durante 5 minutos.

□ Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur (apurando) si el volumen celular es menor de 300 μ L (que lo será porque sólo queda el pellet) añadir 400 μ L de PBS + 0,09% de NaN3 + 0,5% de BSA. Ajustar la concentración celular final a 1×10^5 células/ μ L.

□ Agitar en vortex enérgicamente o golpeando el tubo hasta deshacer grumos. Se puede hacer *raking*, coger gradilla y rascar. Aquí insistir en que no quede grumo.

□ Rotular los dos tubo de citometría con el nombre de los AcMo que quieran identificarse y añadir en orden los AcMo correspondientes en el tubo en las cantidades recomendadas según el panel de estudio de ERM (esto se puede preparar antes siempre que se guarden en oscuridad) excepto los citoplasmáticos del segundo tubo.

□ Añadir a cada tubo con los monoclonales 200 μ L de MO.

□ Agitar en vórtex unos segundos.

□ Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

A PARTIR DE AQUÍ SEGUIREMOS DOS RUTAS DISTINTAS SEGÚN SE TRATE DE LOS ANTÍGENOS DE SUPERFICIE O LOS CITOPLASMÁTICOS.

ANEXOS

A) MARCAR ANTÍGENOS DE SUPERFICIE

- Añadir 2 mL de solución de lisis FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, San Jose, CA).
- Mezclar en vórtex.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Centrifugar 5 minutos a 540g (1.800 rpm).
- Eliminar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur con cuidado de no arrastrar el botón celular y resuspenderlo en 2 mL de PBS + 0,09% de NaN₃ + 0,5% de BSA.
- Centrifugar 5 minutos a 540g (1.800 rpm).
- Eliminar el sobrenadante con pipeta Pasteur con cuidado de no arrastrar el botón celular y resuspenderlo en 500 µL de BD FACS flow solution (Becton Dickinson, San Jose, CA).
- Agitar en vórtex o mediante *racking* hasta que la muestra quede homogénea y no se observen agregados celulares que podrían obstruir el citómetro. Si los hay se filtrará la muestra.

ANEXOS

Realizar la adquisición por el citómetro de flujo FACSCanto inmediatamente de 5.000.000 de eventos. Se pone justo antes de la adquisición el Brilliant Stain Buffer 50 μ l (va con el 138). Si el citómetro no está disponible, conservar el tubo en nevera a 2-8° C en oscuridad durante un tiempo máximo de 1 hora.

MARCAJE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CITOPLASMÁTICOS.

Añadir 2 mL de PBS + 0,5% BSA + 0,09% NaN₃ a la muestra.

Mezclar en vórtex.

Centrifugar 5 minutos a 540g (1800rpm).

Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, con cuidado de no arrastrar el botón celular. El volumen residual del tubo es aproximadamente 200 μ L.

Resuspender el botón celular por agitación.

Añadir 100 μ L de reactivo A (o solución fijadora) BD IntraSure Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA) y agitar en vórtex.

ANEXOS

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Añadir 2 mL de solución de lisis FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Mezclar en vórtex. Incubar 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Centrifugar durante 5 minutos a 800g (2.200rpm).

Eliminar el sobrenadante con pipeta Pasteur, dejando un volumen residual de 200 μ L aproximadamente.

Resuspender el botón celular agitando en vórtex.

Añadir 100 μ L de reactivo B (solución permeabilizante) de BD IntraSure Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Mezclar en vórtex.

Añadir el volumen apropiado de AcMo citoplasmáticos (Ig κ/λ) recomendadas según el panel de estudio.

Mezclar en vórtex.

Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad.

Añadir 2 mL de PBS + 0,5% BSA + 0,09% NaN₃.

Mezclar en vórtex.

Centrifugar durante 5 minutos a 540g (1.800rpm).

ANEXOS

- Eliminar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur, dejando un volumen residual de 200 μ L aproximadamente.
- Resuspender el botón celular en 500 μ L de BD FACS flow solution (Becton Dickinson, San Jose, CA).
- Realizar la adquisición por el citómetro de flujo FACSCanto inmediatamente de 5.000.000 de eventos. Se pone justo antes de la adquisición el Brilliant Stain Buffer 50 μ L (va con el 138) Si el citómetro no está disponible, conservar el tubo en nevera a 2-8° C en oscuridad durante un tiempo máximo de 1 hora.

ANEXOS

9.2. Anexo 2. PNT del informe final

INFORMES DEL ESTUDIO DE ERM EN MM

Comentarios internos (no visible para el médico clínico, no se imprime):

Paciente CÓDIGO GREMI

MOMENTO ESTUDIO

Datos no visibles para el médico solicitante de la prueba:

Calidad de la muestra:

Celularidad total (CT) o CT adquirida (CTA) (sin residuo con FSC/SSC bajo): número de eventos celulares adquiridos incluyendo eritroblastos.

LOD, (30/CTA) x100:

LOQ, (50/CTA) x100:

% de células respecto a la CTA:

% Eritroblastos (CD117-, CD38-, CD45-/+débil, SSC bajo)

% Progenitores mieloides (CD117+/CD38+/CD45+débil/SSC intermedio)

% Células B precursoras CD27- (CD19+/CD45+d/CD38++/CD27-)

% Células B precursoras CD27+ (CD19+/CD45+d/CD38++, CD27+)

% Linfocito B maduro (CD19+/CD45+/CD38+d/Ig(c)

% Mastocitos. (CD117+++ /CD45+d)

ANEXOS

Células plasmáticas

Estudio realizado sobre la población CD138/CD38 positiva de médula ósea (CTA).

Células plasmáticas %

Un % de las CP son normales y policlonales (κ y λ).

Un % de las CP son atípicas con monoclonalidad (κ o λ).

Marcadores de células plasmáticas

% Células plasmáticas con marcadores de identificación e intensidad de expresión según valoración respecto a controles internos del resto de la celularidad:

CD38: intensidad

CD138:

CD 117:

CD 56:

CD 81:

CD 27:

CD 19:

CD 45:

κ :

λ :

Datos visibles para el médico solicitante:

ANEXOS

Conclusión:

ERM: Se observa un ___ % de células plasmáticas sobre celularidad nucleada total.

Un ___% son células plasmáticas aparentemente normales y policlonales, mientras que un ___% son células plasmáticas atípicas con un predominio de κ o λ .

Conclusión:

ERM POSITIVA/NEGATIVA (se considerará ERM positiva la presencia de $\geq 0,00001\%$ o 1×10^{-5} de células plasmáticas aberrantes: 50 de 5.000.000 de células).

9.3. Anexo 3. Protocolo recogida de muestras estudio medula por inmunofenotipo

RECOGIDA DE MUESTRAS PARA ESTUDIO MEDULAR POR INMUNOFENOTIPO

PROCEDIMIENTO

El procedimiento de recogida de muestras para este estudio será el establecido en el estudio de la enfermedad residual mínima (ERM) mediante citometría de flujo (CFM) de alta sensibilidad en pacientes con mieloma múltiple (MM) en muy buena respuesta parcial (MBRP) o completa (Código: GREMI--ERM--001).

El objetivo del presente estudio es analizar el valor pronóstico de la ERM medida por CFM y diez AcMo conjugados con ocho diferentes fluorocromos en pacientes con MM que alcancen MBRP o mejor, después del tratamiento según los esquemas terapéuticos usados en la práctica clínica habitual y comparar la utilidad de la medición de la ERM por CFM con las técnicas de laboratorio serológicas, habitualmente empleadas y con las más novedosas mediante la determinación de cadenas ligeras con el ensayo Hevylite®, para evaluar la respuesta de la enfermedad al tratamiento. Para ello se recogerán muestras de suero en los mismos tiempos establecidos para la recogida de muestra de médula ósea.

ANEXOS

Existen DOS MOMENTOS de envío de muestras:

PACIENTES CANDIDATOS A ENTRAR EN EL ESTUDIO: (pacientes que en algún momento puede alcanzar una MBRP o mejor) que serán:

Pacientes con primer diagnóstico de mieloma múltiple que sean sintomáticos y vayan a recibir tratamiento activo de primera línea y no vayan a entrar en ningún ensayo clínico

INCLUSIÓN DEL PACIENTE EN EL ESTUDIO DEL GREMI ERM-MM
(Código: GREMI--ERM--001):

Pacientes que se haya remitido muestra para el estudio al diagnóstico y que

Tras el tratamiento alcancen una:

Muy buena respuesta parcial o

Respuesta completa o

Respuesta completa estricta

Los momentos establecidos en el estudio para la recogida de muestras para ERM son:

A) Si alcanza MBRP o mejor antes del TASP, se mandarón 5 muestras:

Nada más alcanzar la primera MBRP o mejor. *

Justo antes del TASP. *

A los 100 días del TASP. *

ANEXOS

A los 12 meses del TASP. *

A los 24 meses del TASP. *

* En cada uno de estos momentos también se congelarán muestras de suero del paciente, para un posterior estudio de las cadenas Hevylite® (estudio centralizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia) como se describe en el documento correspondiente.

B) Si alcanza MBRP o mejor tras el TASP, las muestras se mandarán:

Nada más alcanzar la primera MBRP o mejor. *

A los 12 meses del TASP. *

A los 24 meses del TASP. *

* En cada uno de estos momentos también se congelarán muestras de suero del paciente, para un posterior estudio de las cadenas Hevylite® (estudio centralizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia) como se describe en el documento correspondiente

SI EN ALGÚN MOMENTO DEL SEGUIMIENTO PIERDE LA MBRP SALE DEL ESTUDIO

Así, una vez constatado en cada uno de los momentos descritos, con una determinación en muestra de suero y orina de 24 horas, la situación de MBRP o mejor (**SIEMPRE CONFIRMADA LA RESPUESTA ANTES DEL ESTUDIO DE MÉDULA ÓSEA**), se seguirá el

ANEXOS

siguiente PROCEDIMIENTO DE ENVÍO DE MUESTRAS EN PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO:

Se rellenarán los datos del seguimiento del paciente en un formulario especialmente diseñado para este estudio, de la página web del GREMI, con el nombre ERM-CRD y se imprimirá la hoja cumplimentada

Se **AVISARÁ AL CENTRO RECEPTOR DEL ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPO** con 24 horas de antelación.

Las muestras deberán ir correctamente identificadas: se utilizará la hoja habitual de cada centro de solicitud de IFE en médula ósea INDICANDO **PACIENTE CANDIDATO AL ESTUDIO DE GREMI ERM-MM, con EL NÚMERO DEL GREMI DEL PACIENTE** y nombre del hospital y de la persona que envía las muestras.

Se mandará de 5 a 6 mL de médula ósea en varios tubos de EDTA (los tubos del primer tirón con mejor grumo) para el estudio inmunofenotípico **con la hoja impresa del ERM-CRD** y nombre del hospital y de la persona que envía las muestras.

9.4. Anexo 4. Protocolo recogida de muestras ensayo Hevylite®.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento de recogida de muestras para este ensayo será el establecido en el estudio de la enfermedad residual mínima (ERM) mediante citometría de flujo (CMF) de alta sensibilidad en pacientes

ANEXOS

con mieloma múltiple (MM) en muy buena respuesta parcial o completa (Código: GREMI--ERM--001).

Las muestras se enviarán al Hospital Clínico Universitario de Valencia de forma centralizada.

Existen DOS MOMENTOS de envío de muestras:

PACIENTES CANDIDATOS A ENTRAR EN EL ESTUDIO:

Pacientes que en algún momento puede alcanzar una MBRP o mejor que serán:

Pacientes con primer diagnóstico de mieloma múltiple jóvenes candidatos a TASP que:

Sean sintomáticos y vayan a recibir tratamiento.

Así, una vez constatado que el paciente cumple con los criterios para ser candidato a entrar en el estudio se deberá recoger antes de empezar el tratamiento:

Una muestra de suero que se harán tres alícuotas de 0,5 mL que se almacenarán y congelarán en los racks de Wilmut (ver anexo) entregados a los centros participantes.

Rellenar los datos del paciente en la página web del GREMI en el Registro de pacientes con mieloma múltiple y amiloidosis primaria de nuevo diagnóstico

ANEXOS

2. INCLUSIÓN DEL PACIENTE EN EL ESTUDIO DEL GREMI ERM-MM

(Código: GREMI--ERM--001):

Pacientes que se haya mandado muestra para el estudio al

Diagnóstico y que:

Tras el tratamiento de primera o segunda línea, alcancen una:

Muy buena respuesta parcial o

Respuesta completa o

Respuesta completa estricta

Los momentos establecidos en el estudio para la recogida de muestras para ERM son:

A) Si alcanza MBRP o mejor antes del TASP, se congelarán 5 muestras:

Nada más alcanzar la primera MBRP o mejor. *

Justo antes del TASP. *

A los 100 días del TASP. *

A los 12 meses del TASP. *

A los 24 meses del TASP. *

* En cada uno de estos momentos se congelarán muestras de suero del paciente, para un posterior estudio de las cadenas Hevylite® (estudio centralizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia).

ANEXOS

B) Si alcanza MBRP o mejor tras el TASP, se congelarán tres muestras:

Nada más alcanzar la primera MBRP o mejor. *

A los 12 meses del TASP. *

A los 24 meses del TASP. *

* En cada uno de estos momentos se congelarán muestras de suero del paciente, para un posterior estudio de las cadenas Hevylite® (estudio centralizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia).

SI EN ALGÚN MOMENTO DEL SEGUIMIENTO PIERDE LA MBRP SALE DEL ESTUDIO.

IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras deberán ir correctamente identificadas con el número del paciente: se utilizará el mismo número que el paciente tiene en el Registro del GREMI (ver anexo).

A este número se le añadirá una cifra más separada por un guion que indicará el momento de la recogida de la muestra:

0: En el momento del diagnóstico.*

1: Nada más alcanzar la primera MBRP o mejor.

2: Justo antes del TASP. *

3: A los 100 días del TASP. *

12: A los 12 meses del TASP. *

24: A los 24 meses del TASP. *

ANEXOS

No olvidar que en todos los momentos que esté indicado mandar una muestra de médula ósea, se congelará un tubo de suero (repartido en tres alícuotas de 0,5 mL) del paciente para la determinación de cadenas pesadas mediante el ensayo Hevylite®.

Estas muestras de suero se mandarán con posterioridad de forma centralizada al hospital Clínico Universitario de Valencia.

SISTEMAS DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Se proporcionará a cada centro un rack W-Rack 96 de Wilmut Nirco, el cual consta de 96 tubos de 0,5 mL. Tanto el rack como los tubos están identificados con códigos especiales que va a permitir la completa trazabilidad automática de los mismos.

Como se ha mencionado, cada vez que se recoja muestra de suero, se realizarán tres alícuotas de 0,5 mL que ocuparán tres posiciones consecutivas en el rack.

La identificación de las muestras y asignaciones de sus correspondientes posiciones en el rack, se reflejarán en una hoja de cálculo tipo Excel, individualizada para cada rack y que se descargará de la web de Wilmut introduciendo el código de barras del rack en cuestión.

A través del menú “Trazabilidad Wilmut” situado en la esquina superior derecha de la web de la casa comercial accederemos a una pantalla en la que podremos introducir el código de barras del rack y solicitar la trazabilidad, una vez leídas y aceptadas las condiciones de uso.

ANEXOS

Automáticamente se abrirá una ventana con la hoja Excel que ya podremos guardar en nuestro ordenador y que iremos rellenando conforme vayamos recogiendo las muestras.

Este rack, se enviará una vez finalizado el estudio (en función de la disponibilidad del laboratorio, una vez puesto en marcha el estudio las fechas de envío de muestras podrán sufrir modificaciones que se informarán con la antelación conveniente) al Hospital Clínico Universitario a la dirección ya indicada. En el sobre se introducirá también una copia impresa del archivo Excel con la identificación de las muestras. Es fundamental asegurar que no se rompa la cadena de frío durante el transporte del rack.

La hoja de cálculo asociada al rack también se enviará vía mail al responsable del Laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico de Valencia.

En el apartado “asunto” se escribirá la palabra “Hevylite” seguida del nombre del hospital de procedencia.