

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Medicina



**TESIS DOCTORAL**

**Aplicabilidad y sensibilidad de la biopsia de médula ósea vs.  
aspirado de médula ósea en la valoración de la remisión  
completa en el mieloma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Estela Martín Clavero**

Directores

**Florinda Gilsanz Rodríguez  
Joaquín Martínez-López  
Juan José Lahuerta Palacios**

**Madrid 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Departamento Medicina



**Aplicabilidad y sensibilidad de la biopsia de médula ósea vs. Aspirado de médula ósea en la valoración de la remisión completa en el mieloma**

**Estela Martín Clavero**

**Directores:**

Florinda Gilsanz  
Joaquín Martínez-López  
Juan José Lahuerta Palacios

**TESIS DOCTORAL**  
**Madrid, 2017**

# **AGRADECIMIENTOS**

---

**A mis padres,**  
por su cariño, amor y comprensión,  
porque sin ellos no estaría donde estoy

**A Yuta,**  
por haber estado ahí en todo momento,  
por haberme animado a terminar este proceso,  
por no dejar que me rindiera,  
porque sin él no hubiese conseguido

**A mis pacientes,**  
por todo lo que me enseñan,  
por ser la llama que alimenta mi motivación por el aprendizaje.

**A mis directores de tesis,**  
por haberme ofrecido sus conocimientos,  
experiencia y ayuda.

**A mis amigos,**  
en especial Vir y Javi, por su eterna amistad,  
por su apoyo incondicional.

**Finalmente,**  
a Teresa, Reyes, Juan Ma, Eli, Alai  
y todos los que me habéis ofrecido ayuda en los últimos momentos de crisis.



<b>AGRADECIMIENTOS</b>	3	<b>RESULTADOS</b>	103
<b>INDICE</b>	7	4.1. EVALUACIÓN DE LA PLASMOCITOSIS MEDULAR	105
<b>ABREVIATURAS</b>	11	4.2. DETECCIÓN DE CLONALIDAD	108
<b>RESUMEN</b>	15	4.2.1. RESULTADOS	108
<b>ABSTRACT</b>	27	4.2.2. CONCORDANCIA ENTRE TÉCNICAS	109
<b>INTRODUCCION</b>	37	4.3. PLASMOCITOSIS Y CLONALIDAD	111
1.1. INTRODUCCIÓN AL MIELOMA MÚLTIPLE	39	4.4. IMPACTO PRONÓSTICO	112
1.2.1. CITOMORFOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE MIELOMA	43	4.4.1. PLASMOCITOSIS MEDULAR	112
1.2.2. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	46	4.4.2. CLONALIDAD	116
1.2.3. CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA	48	4.4.3. OBTENCIÓN DE <5% CÉLULAS PLASMÁTICAS CLONALES	122
1.2.4. TÉCNICAS MOLECULARES. PCR FLUORESCENTE	53	4.4.4. ANALISIS DE LA REMISIÓN COMPLETA ESTRICTA	126
1.2.5. MEDICIÓN DEL COMPONENTE MONOCLONAL	54	4.4.5. PRESENCIA DE BANDAS OLIGOCLONALES	136
1.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO	57	4.4.6. SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DETECTADA SOLO POR CMF	140
1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	71	<b>DISCUSION</b>	143
<b>OBJETIVOS</b>	73	5.1. EVALUACIÓN DE LA PLASMOCITOSIS MEDULAR	145
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	75	5.2. DETECCIÓN DE CLONALIDAD	147
2.2. OBJETIVOS	75	5.3. ANALISIS DE SUPERVIVENCIA	150
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	77	5.3.1. REMISIÓN COMPLETA	150
3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES	80	5.3.2. CLONALIDAD	151
3.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS	83	5.3.3. OBTENCIÓN DE <5% CP CLONALES	153
3.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	85	5.3.4. REMISIÓN COMPLETA ESTRICTA	154
3.3.1. ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA	85	5.3.5. ENFERMEDAD DETECTADA SOLO POR CMF	155
3.3.2. BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA	85	5.3.6. PRESENCIA DE BANDAS OLIGOCLONALES	155
3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	86	<b>CONCLUSIONES</b>	157
3.4.1. MUESTRA PARA ESTUDIO CITOLÓGICO	86	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	161
3.4.2. MUESTRA PARA CITOMETRÍA DE FLUJO	89	<b>ANEXOS</b>	173
3.4.3. MUESTRAS PARA ESTUDIOS MOLECULARES	94		
3.4.4. HISTOLOGÍA	96		
3.5. PARÁMETROS ANALIZADOS	98		
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	101		

## **ABREVIATURAS**

---

<b>AMO</b>	Aspirado de médula ósea.	<b>I</b>	lambda
<b>ASO-PCR</b>	allele specific oligonucleotide	<b>MM</b>	Mieloma Multiple
<b>BM</b>	Biología molecular	<b>MO</b>	Médula Ósea
<b>BMO</b>	Biopsia de médula ósea	<b>MRD</b>	Minimal residual disease
<b>BO</b>	Bandas Oligoclonales	<b>OS</b>	Overall Survival
<b>CLS</b>	Cadenas libres en suero	<b>PC</b>	Plasmatic Cell
<b>CMF</b>	Citometría de Flujo Multiparmétrica	<b>PCR</b>	Polimerasa Chain Reaction
<b>CP</b>	Células Clasmáticas	<b>PFS</b>	Progression Free Survival
<b>CPN/CPP</b>	Célula plasmática normal/célula plasmática patológica.	<b>RC</b>	Remisión Completa
<b>EBMT</b>	European Bone Marrow Transplantation	<b>RP</b>	Remisión parcial
<b>EEF</b>	Electroforesis	<b>SCR</b>	stringent Complete Remision
<b>EMN</b>	European Myeloma Net	<b>SLP</b>	Supervivencia Libre de Progresion
<b>EMT</b>	European Myeloma Net	<b>SPSS</b>	Statistical Package for Social Sciences
<b>EMR</b>	Emfermedad Minima Residual	<b>TASPE</b>	Trasplante autólogo con células de sangre periférica.
<b>F-PCR</b>	PCR fluorescente	<b>VBMCP</b>	Vincristina, Carmustina, Melfalán, Ciclofosfamida, Prednisona
<b>FLC</b>	Free light chain	<b>VBAD</b>	Vincristina, Carmustina, Doxorubicina, Dexametasona
<b>IF</b>	Inmunofijación	<b>VD</b>	Velcade Dexametasona
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica	<b>VGPR</b>	Very Good Partial response
<b>IMWG</b>	International myeloma working group	<b>VMP</b>	Velcade Melfalan Prednisona
<b>ISS</b>	International Staging System	<b>VTD</b>	Velcade Talidomida Dexametasona
<b>k</b>	kappa		



## INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple se caracteriza por una expansión clonal de células plasmáticas (CP) patológicas que se acumula en la médula ósea, capaces de producir un componente monoclonal, que puede ser detectado en el suero o en la orina mediante técnicas de electroforesis e inmunofijación. El diagnóstico de mieloma se basa en la detección de ese componente monoclonal en sangre y/o orina y la demostración de células plasmáticas patológicas en médula ósea. Por lo tanto, el estudio de médula ósea es crucial para el diagnóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma. Las células plasmáticas clonales tienen unas características morfológicas, citoquímicas e inmunofenotípicas que las diferencian de las células plasmáticas normales. Esto facilita la identificación de enfermedad residual tras el tratamiento. Inicialmente los criterios de respuesta al tratamiento se basaban únicamente en la reducción del componente monoclonal. En 1998 se acepta internacionalmente el criterio de Remisión completa (RC) definido como ausencia de componente monoclonal detectado por inmunofijación (IF) en sangre/orina y presencia de menos de 5% de CP en médula ósea. Más tarde, en el año 2006 se incorpora a los criterios de respuesta la ausencia de clonalidad de las CP, y se añade una nueva categoría de respuesta al tratamiento: la respuesta completa estricta, que requiere cumplir los requisitos tradicionales de respuesta completa, a los que se añaden dos parámetros: un ratio cadenas libres en suero normal y ausencia de clonalidad, demostrada en la biopsia de médula ósea por inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescencia. En el año 2011 el EMWG publica los actuales criterios de evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma múltiple. Propone dos técnicas diferentes para descartar clonalidad: la citometría de flujo (CMF) de 2 o 4 colores, y la IHQ.

Se han desarrollado diversos estudios comparativos evaluando la capacidad de la IHQ, realizada en biopsia de médula ósea, vs la citología y la CMF, realizadas en el aspirado medular, en la detección de plasmocitosis medular. La mayoría de los grupos analizan médulas en el momento del diagnóstico de mieloma, cuando la infiltración medular es elevada. Todos los grupos defienden la superioridad de la inmunohistoquímica (IHQ) frente a la citología y la CMF en la cuantificación de la plasmocitosis medular. Sin embargo, hay muy pocos estudios que comparen la capacidad de la IHQ, la CMF y la citología en la estimación de la plasmocitosis medular en muestras con poca infiltración medular, y ninguno en pacientes que han alcanzado IF negativa tras el tratamiento. Tampoco existen estudios que comparen la capacidad de detectar clonalidad por IHQ vs CMF en pacientes que alcanzan IF negativa.

## OBJETIVOS

1. Analizar la correlación entre la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y la citología en la estimación de la plasmocitosis medular en pacientes con IF negativa.
2. Comparar la capacidad para detectar clonalidad entre la inmunohistoquímica y la citometría de flujo de baja resolución en pacientes con IF negativa.
3. Analizar la capacidad para detectar clonalidad del estudio de cadenas ligeras libres en suero en pacientes con IF negativa.
4. Establecer un valor pronóstico relacionado con la capacidad de detectar clonalidad con cada una de las técnicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron todos los pacientes diagnosticados de mieloma múltiple entre enero de 2000 y diciembre del 2014 en el hospital universitario Doce de Octubre de Madrid. Se seleccionaron aquellos pacientes en los que, en la evaluación tras el tratamiento, se observó una ausencia de la proteína monoclonal en plasma/orina medida por electroforesis e IF, que tenían disponible aspirado y biopsia de médula ósea en la misma evaluación. Todas las muestras que cumplieron este requisito fueron admitidas. Se aceptó más de una muestra por paciente. Fueron seleccionadas 92 muestras de 61 pacientes.

Las muestras se procesaron según procedimientos estándar. Para la estimación de la plasmocitosis medular por citología se analizaron 500 células en el aspirado de médula ósea. En el estudio inmunohistoquímico, las células plasmáticas fueron marcadas con CD138 para la estimación de la plasmocitosis medular, y *con kappa/lambda* para evaluar la clonalidad. Se analizaron 200 células en la biopsia de médula ósea (MO). Se definió clonalidad como obtención de un ratio *kappa/lambda* alterado (<1:2 o >4).

El análisis por citometría de flujo se realizó tras marcar las células con cuatro antígenos de membrana CD19/CD38/CD56/CD45, y adquirir 2 millones de células. Se utilizaron dos citómetros: FACScalibur y FACSCantoII. Se definió ausencia de clonalidad como la obtención de menos de 20 células plasmáticas patológicas (con inmunofenotipo patológico) con una sensibilidad de  $10^{-4}$ .

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS. La correlación entre las técnicas en la estimación de la plasmocitosis medular se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La concordancia entre técnicas se analizó con el coeficiente *Kappa* de Cohen. Las curvas de supervivencia se realizaron con un análisis univariante de Kaplan-Meier.

## RESULTADOS

Se seleccionaron 92 muestras de 61 pacientes: 31 pacientes disponían de una médula, 23 de dos y 7 de tres. Las 92 muestras fueron válidas para estudio por CMF, 86 para estudio inmunohistoquímico y 84 para estudio morfológico.

En primer lugar, estudiamos la correlación entre la IHQ, la CMF y la citología en la estimación de la plasmocitosis medular. La inmunohistoquímica demostró los mayores valores de infiltración medular con medias de 3,5% CP; porcentajes un poco menores cuantificó la citología con 2%. La CMF demostró los valores más bajos de infiltración medular (media 0,295%). La correlación entre las tres técnicas se analizó con el coeficiente de correlación de Pearson. Únicamente se observó una baja correlación entre la CMF-IHQ (0,568). No se observó correlación entre la citología y la IHQ (0,270) ni entre CMF-citología (0,412).

Comparamos el porcentaje de pacientes en RC RC (<5% de células plasmáticas en MO) en función de la técnica utilizada en la cuantificación de las CP: citología o IHQ. Si la cuantificación se realizaba en la biopsia de médula, el 77% de los pacientes (21 de 86 casos) estaban en RC. Este porcentaje ascendió a 85% en la estimación realizada en el aspirado medular (73 de 84 casos). Analizamos la concordancia entre ambas técnicas.

Disponían de los dos estudios simultáneamente 83 casos. Coincidieron en clasificar a los pacientes en remisión completa en 64 casos (77% de las muestras). En 19 casos (23%) la plasmocitosis estimada por ambas técnicas no coincidían: en 15 muestras la estimación de la plasmocitosis medular fue mayor por IHQ que por citología, y en 4 muestras la citología observó mayor porcentaje de CP que la IHQ. La concordancia en clasificar a los pacientes en RC entre la IHQ y la citología fue baja ( $Kappa=0,268$ ,  $p=0,07$ ). Por lo observado en nuestra serie, la cuantificación de células plasmáticas realizada en la biopsia de médula ósea por IHQ es mayor que la estimada por citología o CMF en el aspirado medular, incluso en muestras en las que el porcentaje de infiltración medular es muy bajo.

Analizamos la capacidad de detectar clonalidad de la CMF y la IHQ, y la concordancia entre ambas técnicas. La CMF demostró persistencia de CP patológicas en 38 de las 92 muestras analizadas (42%). La IHQ en 9 de las 86 muestras estudiadas (10%). Disponían de los dos estudios simultáneamente 85 muestras. Ambas técnicas coincidían en 47 casos (55%) en la estimación de clonalidad: en 43 casos ninguna técnica detectaba persistencia de enfermedad, y solo en 4 las dos técnicas coincidían en detectar clonalidad. En 33 muestras (38% de las muestras) la CMF detectó clonalidad en muestras en las que la IHQ no detectó enfermedad residual. Observamos una concordancia pobre ( $Kappa=0,07$ ;  $p=0,8$ ) entre la IHQ y la CMF en la detección de clonalidad.

La definición de remisión estricta exige un ratio  $k:l$  de cadenas ligeras libres en suero normal, ausencia de componente monoclonal en  $s/o$  medido por IF, y la presencia de  $<5\%$  CP clonales en M.O. Analizamos la concordancia entre CMF e IHQ en detectar  $<5\%$  de células plasmáticas clonales en MO. La CMF demostró  $<5\%$  CP clonales en 49 muestras (56%). La IHQ en 59 casos (68%). Ambas técnicas coincidieron en el resultado en 40 casos (45% de las muestras): en 31 casos las dos técnicas detectaban  $>5\%$  CP clonales, y en 9 casos ninguna observó  $>5\%$  CP clonales. En las 45 muestras (55%) restantes, las técnicas no coincidían en el resultado: en 28 casos (32%) la IHQ observó  $<5\%$  CP clonales, en los que la CMF detectó clonalidad; en 18 muestras la IHQ observaba persistencia de enfermedad, en muestras donde la CMF no detectaba CP clonales. En 14 de estas 18 muestras en las que la IHQ demostraba persistencia de enfermedad, esto se debía a un exceso de CP ( $>5\%$ ) policlonales, y por tanto no verdadera enfermedad. La concordancia entre la CMF y la IHQ en detectar  $>5\%$  CP clonales fue muy pobre ( $Kappa =0,125$ ,  $p=0,2$ ).

Analizamos el impacto de obtener RC morfológica (estimada en el aspirado y en la biopsia medular). Observamos que, los pacientes que obtuvieron RC estimada en el aspirado medular tenían una supervivencia libre de progresión mayor que los pacientes que no obtenían RC (124 vs 101 meses,  $p=0,2$ ). Se estudiaron 57 pacientes. El 85% (49 casos) estaba en RC y 8 pacientes no estaban en RC. El 32% (15 casos) de los pacientes que estaban en RC recayeron. Este porcentaje asciende al 38% (3 pacientes) en los pacientes que no estaban en RC.

Estudiamos 58 pacientes con biopsia de MO válida para estudio IHQ. Obtuvieron RC 44 pacientes (75%) y 14 no alcanzaron RC. El 36% de los pacientes que alcanzaron RC, recayeron (14 casos). De los pacientes que no estaban en RC, 4 pacientes (29%) progresaron. La supervivencia libre de progresión y supervivencia global fue mayor en los pacientes en RC que los que no estaban en RC (114 vs. 89 meses  $p=0,6$  para SLP; 102 vs 164 meses para SG,  $p=0,8$ ).

Analizamos el impacto de obtener ausencia de clonalidad en MO demostrada por IHQ y por CMF. En el análisis por IHQ, los pacientes en los que no se detectó clonalidad en MO obtuvieron una mayor SLP que aquellos en los que la IHQ demostró persistencia de enfermedad, con medias de 121 vs 78 meses ( $p=0,6$ ). La supervivencia global fue similar en ambos grupos (158 vs 160 meses,  $p=0,8$ ). Se estudiaron 58 pacientes con estudio IHQ. Únicamente se demostró clonalidad en 6 pacientes (10%), de los cuales 3 pacientes (50%) recayeron. En los 52 pacientes restantes la IHQ no demostró CP clonales. Entre estos, 17 pacientes (23%) recayeron.

Los pacientes con ausencia de clonalidad estimada por CMF en el aspirado medular presentaron una mayor SLP y SG que los pacientes en los que la CMF demostró persistencia de enfermedad con medias de 131 vs 92 meses para SLP ( $p=0,04$ ) y 197 vs 136 para SG. Se estudiaron 61 pacientes por CMF: en 22 casos (36%) la CMF detectó persistencia de enfermedad, de estos, 12 (55%) recayeron; en 39 pacientes (65%) la CMF no detectó clonalidad, de ellos tan solo 9 pacientes (25%) recayeron.

Analizamos la SLP de los pacientes en función de la magnitud de la Enfermedad Mínima Residual (EMR) detectada por CMF:  $EMR>0,01\%$  (EMR alta) frente  $EMR \leq 0,01\%$  o negativa.

Observamos que los pacientes con EMR alta tuvieron una SLP menor que los pacientes con EMR baja o negativa ( $EMR \leq 0,01\%$ ), con medias de 78 vs. 127 meses ( $p=0,01$ ). El 26% de los pacientes (13 casos de 49) con EMR baja o negativa progresaron, mientras que el 58% de los pacientes (7 pacientes de 12) con EMR alta progresaron.

Hicimos un subanálisis de los 27 pacientes en los que la CMF detectó clonalidad, diferenciando casos con EMR alta ( $>0,01\%$  CP clonales) frente a los que presentaban una EMR baja ( $\leq 0,01\%$  CP clonales). La SLP fue mayor en pacientes con menor carga tumoral (106 vs 80 meses,  $p=0,02$ ). Entre los 13 casos en los que la CMF detectó EMR alta, 7 pacientes recayeron (54%). La CMF detectó EMR baja en 14 pacientes, de los cuales 6 recayeron (43%).

Estudiamos el impacto de la obtención de RC estricta, estimada por las diferentes técnicas. En primer lugar, analizamos el valor pronóstico de las cadenas libres en suero (CLS) de manera aislada. Disponían de resultados 50 pacientes, de los cuales 39 tenían un ratio de CLS normal y 11 pacientes alterado. La SLP fue similar en ambos grupos con medias de 118 meses vs 124 meses ( $p=0,5$ ). El 26% de los pacientes con ratio normal progresan (10 de 39 casos); entre los 11 pacientes con ratio alterado, 3 progresaron (28%).

Analizamos el impacto de obtener RC estricta estimada en el AMO (CMF) y en la BMO (IHQ). Entre los 47 pacientes que disponían de resultados con IHQ, 21 casos (45%) estaban en RC estricta y 26 (55%) no cumplían el criterio: 15 casos presentaban  $>5\%$  células plasmáticas clonales, 9 pacientes tenían un ratio k:l de CLS alterado, y 2 no cumplía ninguno de los dos criterios. Observamos que aquellos pacientes que estaban en remisión completa estricta, presentaron menor SLP que aquellos que no lo estaban (90 vs 132 meses,  $p=0,9$ ). De los 21 pacientes en RC estricta 6 (29%) progresaron, y 6 (25%) de los que no estaban en RC estricta progresan. Respecto a la SG, los pacientes que no estaban en RC estricta tuvieron una supervivencia global mayor que los que no lo estaban (173 vs. 115 meses,  $p=0,7$ ). Hicimos un subanálisis analizando el valor de obtener un ratio de CLS normal únicamente en pacientes con  $<5\%$  de células plasmáticas clonales estimadas por IHQ. Observamos que, en aquellos pacientes con  $<5\%$  CP clonales y un ratio CLS normal tuvieron una SLP mayor que aquellos con  $<5\%$  CP clonales pero con un ratio alterado. No se alcanzó mediana de seguimiento ( $p=0,2$ ).

Entre los 26 pacientes que no estaban en RC estricta estimada por IHQ, estudiamos la SLP en función de la magnitud de la EMR: EMR baja ( $EMR \leq 0,01\%$ ) vs. EMR alta ( $>0,1\%$ ) detectada por CMF. Alcanzaron una EMR baja 19 pacientes, de los cuales únicamente 2 pacientes (11%) recayeron. Entre los 7 pacientes con EMF alta, 4 pacientes progresaron (57%). La SLP en los pacientes que no alcanzaron RC estricta fue mayor en los que tenían EMR baja (150 vs 71 meses,  $p=0,02$ ).

Los pacientes que alcanzaron RC estricta estimada por CMF presentaron una SLP y SG mayor que los pacientes que no estaban en RC estricta (108 vs 122 meses para SLP y 156 vs 195 meses para SG). Estos resultados no fueron significativos ( $p=0,6$  y  $0,7$  respectivamente).. Disponían de los dos estudios 49 pacientes: 33 pacientes estaban en RC estricta, de los cuales 8 recayeron (24%). Entre los 16 casos que no alcanzaron RC estricta, 5 recayeron (31%).

Por último, analizamos el impacto de presentar bandas oligoclonales (BO) en el momento de la evaluación de la respuesta. En nuestra serie, el 66% de los pacientes (39 casos de los 59 pacientes estudiados) presentaban BO. Estos pacientes tuvieron una SLP y SG mayor que los pacientes sin BO con medias de 127 vs 114 meses para SLP ( $p=0,4$ ) y 170 vs 141 meses de SG ( $p=0,14$ ). De los 39 pacientes que presentaron BO, 11 progresaron (28%). Este porcentaje ascendió a 40% en los casos sin BO (8 casos de 20 pacientes sin BO).

Clasificamos a los pacientes en función de la presencia o ausencia de bandas oligoclonales, y el impacto de la EMR detectada por CMF en estos pacientes. Entre los 39 pacientes que presentaban BO, 26 casos (67%) no tenían EMR detectable. Dentro de los 20 casos sin BO, en 11 casos (55%) la CMF no detectó EMR. En ambos grupos (pacientes con presencia y ausencia de BO) la SLP fue favorable para los pacientes en los que la CMF no detectó clonalidad, con medias de 84 vs. 138 meses en pacientes sin BO ( $p=0,1$ ) y 84 vs. 92 meses en pacientes con BO ( $p=0,02$ ).

## CONCLUSIONES

- La cuantificación de células plasmáticas en médula ósea analizada por inmunohistoquímica es mayor que la estimada por citología o citometría de flujo.
- En la evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma múltiple la citometría de flujo de baja resolución es más sensible que la inmunohistoquímica para detectar persistencia de enfermedad, y debería ser el método de elección para detectar clonalidad.
- La remisión completa estricta debería ser redefinida en aquellos enfermos con una infiltración mayor del 5% por técnicas citológicas, añadiendo como criterio la ausencia de clonalidad mediante citometría y/o inmunohistoquímica.
- La biopsia de médula ósea no es necesaria de manera rutinaria en la evaluación de la respuesta al tratamiento del mieloma.
- El estudio de cadenas ligeras libres en suero en pacientes con IF negativa no identifica pacientes con mayor riesgo de progresión
- La aparición de bandas oligoclonales tras el tratamiento se asocia a mejor pronóstico en pacientes con IF negativa.

## **ABSTRACT**

---

## INTRODUCTION

Multiple myeloma features a clonal outgrowth of pathological plasma cells that accumulate in bone marrow. This type of cells produces a monoclonal component, which can be detected in serum or urine by Electrophoresis and immunodetection techniques. Myeloma diagnose is based on the detection of this monoclonal component in blood and /or urine, as well as, the detection of these plasma cells in bone marrow. Hence, the study of bone marrow is extremely important for myeloma diagnosis and for the evaluation of its response after treatment. Clonal plasma cells feature specific morphological, cytochemical and immunophenotypical characteristic that distinguish them from normal plasma cells. This fact eases the detection of any residual activity of the disease after treatment. In the beginning, the criteria used to evaluate the response after treatment were based only on the monoclonal component assessment. In 1998 the Complete Remission concept is introduced, which is based on the absence of monoclonal component detection and a presence of less than 5% of plasma cells in bone marrow. Later, in 2006, clonality is introduced into the diagnoses test, and appears a new category of treatment response: the complete strict response. This criterion requires to fulfil the traditional requirements of a complete response, and two new parameters: the free light-chain ratio and the absence of clonality, this last one has to be demonstrated by immunohistochemistry and immunofluorescence assays of the affected bone marrow. In 2011, the EMWG published the current criteria to evaluate the treatment of multiple myeloma. The EMWG proposes two different techniques to discard the presence of clonality: multiparameter flow cytometry (MFC) and the immunohistochemistry (IHC) assays.

Several comparative studies have evaluated the capacity to detect bone marrow plasmacytosis by IHC in bone marrow biopsies (BMB) vs. cytology and MFC in bone marrow aspirates. Most of the studies were performed in bone marrows (BM) at diagnosis, when plasma cell (PC) infiltration is high. These studies support the advantages of IHC technique to BM plasmacytosis detection. However, there are not many studies evaluating the ability of the three techniques (MFC, IHC and cytology) to detect BM plasma cell infiltration in cases with low residual disease infiltration, and no study has been done in patients with negative immunofixation (IF) after therapy. There are also no studies comparing the ability to detect clonality between IHC vs. MFC in patients with negative IF.

## OBJECTIVES/AIMS

1. Analyze the correlation between low-resolution flow cytometry, immunohistochemistry, and cytology in the estimation of bone marrow plasmacytosis in patients with negative immunofixation.
2. To compare the ability to detect clonality between immunohistochemistry and low-resolution flow cytometry techniques in patients with negative IF.
3. Analyze the ability of the Free light chain assay to detect clonality in patients with negative IF.
4. Determine the relationship between prognosis and clonality, depending on the aforementioned technique used to detect clonality.

## MATERIALS AND METHODS

This study includes all patients diagnosed with multiple myeloma between January 2000 and December 2014. Only patients that do not present monoclonal protein in serum/urine, measured by electrophoresis and immunoassay during post-treatment evaluation, and whose bone marrow aspirate and biopsy were available, were selected. All samples that fulfill the required criteria were studied, including more than one sample per patient. In this way, 92 samples derived from 61 patients were selected.

Samples were processed according to standard protocols. To estimate bone marrow plasmacytosis by cytology, 500 cells from bone marrow were analyzed. For immunohistochemistry analysis, cells were immunostained with CD138 and 200 cells were analyzed. The presence of clonality was evaluated by immunohistochemistry and flow cytometry. Clonality was considered positive with altered kappa/lambda ratio (<1:2 or >4). Flow cytometry analysis were performed in cells marked with antibodies against CD19, CD38, CD56 and CD45 membrane markers, and 2 million cells were counted using FACScalibur and FACSCantoll cytometers. Clonality absence were defined as <20 pathological plasma cells (with pathological immunophenotype) with a sensibility of 10<sup>-4</sup>.

Statistical analyses were performed with SPSS. Pearson's coefficient was used to estimate the correlation of bone marrow plasmacytosis between the different techniques

employed. Cohen's kappa coefficient was used to analyze the consistency between the different techniques. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier multivariate method.

## RESULTS

We selected 92 samples from 61 patients: 31 patients presented one bone marrow sample, 23 of them had two samples, and 7 of them presented 3 samples. The 92 samples were analyzed by flow cytometry analysis, 86 by immunohistochemistry and 84 by morphological analysis.

Regarding to bone marrow plasmacytosis analysis, immunohistochemistry showed higher values for bone marrow infiltration, followed by cytology and flow cytometry (average: 3,5%, 2% and 0,295% PC, respectively). Pearson coefficient correlation was used to calculate the correlation between techniques. Low correlation between MFC and IHC was observed (0,568). No correlation between cytology and IHC (0,270) and cytology and MFC (0,412) was observed.

We compared the percentage of patients in complete remission (CR) depending on the technique used (cytology vs IHC) to count PC infiltration. When counting PC in BMB, 77% of the patients presented <5% PC. This value raised up to 85%, if the estimation was done in bone marrow aspirates (BMA). Both techniques matched in 77% of the cases to classify the patients as in CR, although with a very low concordance (Kappa=0,268). From the results obtained in our study, the immunohistochemistry is more accurate than cytology technique for the estimation of medullary plasmacytosis, even in samples with very low percentage of bone marrow infiltration.

We analyze the capacity to detect clonality between MFC and IHC. MFC showed persistence of pathological PC in 38 of 92 analyzed samples (42%). The IHC technique showed persistence in 9 of 86 cases (10%). Both techniques agreed in clonality estimation in 47 of 85 samples (55%): from them, 43 did not showed persistence of the illness; and clonality was only observed in 4 samples by both techniques. MFC detect clonality in 33 samples (38%) that were negative for IHC analysis. Low concordance between techniques was observed for clonality detection (Kappa=0,07)

Stringent complete remission (sCR) requires the presence of <5% clonal PC and normal free light chain (FLC) ratio. The concordance between MFC and IHC to detect levels <5% of clonal PC was analyzed. MFC detected <5% clonal PC in 49 samples (56%). By IHC, 59 samples (68%) presented <5% clonal PC. Both techniques agreed with the same result only in 40 of the cases (45% of the samples): in 31 cases both techniques detected >5% clonal PC, and 9 cases had <5% clonal PC, detected by both techniques. In 28 cases (32%), MFC detected clonality, while IHC did not detect that feature in these samples. In 18 cases IHC detected residual disease in cases where MFC didn't detect clonality. In 14 of these 18 samples with >5% clonal PC by IHC technique, an exceed of PC (>5%) was observed, but these PC were polyclonal, so they did not correspond to the presence of true illness. The concordance between techniques was very poor (Kappa=0,125).

We analyzed if the relationship between achieving CR and survival changes when different test were used to assess CR: morphological measured in BMA by cytology or BMB by IHC. In this way, we observed that patients with morphological CR estimated in BMA had a higher progression free survival (PFS) and overall survival (OS) compared with patients with >5% of plasma cells (p=0,2). We studied 57 patients: 49 cases (85%) were in CR and 8 patients had >5%CP. Of the patients in CR, 15 cases showed progression (32%. This percentage rose to 38% (3 cases) in patients with no CR (estimated by aspirate).

We study 58 samples of BMB: 44 patients were in CR (75%), and 14 patients had >5% PC. From the patients who achieved CR, 36% (14 cases) showed progression. Amongst patients who did not achieved CR, 4 patients (29%) relapsed. PFS and OS was higher In CR patients than in no CR patients (114 vs 89 months, p=0,6 for PFS; 102 vs 164 months for OS, p=0,8)

In relation to clonality test, we analyzed the prognostic value of achieving absence of clonal PC, when clonality was assessed by IHC and MFC. Patients diagnosed negative for bone marrow clonality by IHC had higher PFS and OS than patients with clonality in BMB (121 vs. 78 months, p=0,6). OS was similar in both groups (158 vs 160 months, p=0,8). From the 58 patients studied, only 6 patients had clonal PC in BMB, 3 of them progressed. In 52 patients, IHC didn't show clonality, 17 of them progressed (23%).

Patients without clonality estimated by MFC showed better PFS and OS than patients

with persistent clonal PC (131 vs 92 months for PFS, p=0,04; 197 vs. 136 months for OS, p=0,02). =0,04; 197 vs. 136 months for OS, p=0,02). We analyzed 61 patients: in 22 cases (36%) MFC detected clonality, 12 (55%) out of these patients showed progression; in 39 patients (65%) MFC didn't detect clonality, from them only 9 patients (25%) progressed.

We analyzed PFS and OS based on the minimal residual disease (MRD) magnitude: patients with negative or low MRD (MRD≤0,01%) vs. patients with high MRD (MRD>0,01%). PFS was higher in patients with low MRD (127 vs 78 months, p=0,01). Amongst patients with low MRD, 26% progressed (13 out of 49 patients). This percentage rose up to 58% in patients with high MRD (7 out of 12 patients).

We studied the 27 patients with residual disease measured by MFC. Patients were classified as having low MRD (MRD≤0,01%) and high MRD (MRD>0,01%). PFS was higher in patients with low MRD (106 vs. 80 months, p=0,02). From the 13 patients with high MRD, 7 showed progression (54%). MFC detected low MRD in 14 patients, 6 of them progressed (43%).

Prognostic impact of achieving sCR was studied. First, we analyzed the prognostic value of having a normal FLC ratio. Only 50 patients had FLC results available: 39 patients had a normal FLC ratio and 11 patients had abnormal FLC ratio. PFS was similar in both groups (MRD≤0,01%) 118 vs 124 months, p=0,5). Amongst patients with normal ratio 26% showed progression (10 of 39 patients); 28% of the patients with abnormal FLC ratio progressed (3 of 11 patients).

We studied the impact of achieving sCR when it was estimated by two different techniques: in BMA (by MFC) and BMB (IHC). Amongst the 47 patients analyzed by IHC, 21 cases (45%) were in sCR and 26 (55%) didn't fulfill the criteria: 15 cases had >5% clonal PC in BMB, 9 cases had abnormal FLC ratio, and 3 cases didn't fulfill both criteria. Patients in sCR showed worse prognosis than patients not achieving sCR (PFS =90 vs. 132 months, p=0,9). Amongst the 21 patients in sCR, 6 (29%) relapsed, and 6 patients not in sCR relapsed (25%).

Respect to OS, patients not achieving sCR had better OS than patients in OS (173 vs. 115 months, p=0,7). Amongst the patients with <5% clonal PC, we identified a group with normal FLC ratio, that had better outcome than those patients with <5% clonal PC but

abnormal FLC ratio.

Patients in sCR estimated by MFC showed better PFS and OS than patients not achieving sCR (108 vs 122 months for PFS,  $p=0,6$ ; 156 vs 195 months for OS,  $p=0,7$ ). Amongst the 49 patients studied, 33 cases achieved sCR: 8 of them relapsed (24%). Amongst the 16 patients not achieving sCR, 5 relapsed.

We studied patients not achieving sCR (measured by IHC) and analyzed the impact of having low vs. high MRD detected by MFC. Patients with low MRD had better outcome than patients with high MRD (150 vs 71 months,  $p=0,02$ ). 19 patients had low MRD, 2 of them relapsed (11%); this percentage rose up to 57% (4 out of 7 cases) in patients with high MRD.

Finally, we analyzed the impact of the presence of oligoclonal bands (OB) after treatment. Patients that present oligoclonal band showed higher SPFS and OS compared to patients without bands (127 vs 114 months for PFS,  $p=0,4$ ; 170 vs 171 months for OS,  $p=0,14$ ). In our study, 66% of the patients had oligoclonal bands (39 out of 59 patients, and 28% of them showed progression (11 of 39 cases), whereas 40% patients (8 out of 20 cases) without oligoclonal bands relapsed.

We classified patients with presence or absence of oligoclonal bands, and analyzed the impact of MRD detected by MFC in this two groups of patients. Between the 39 patients with OB, 26 cases (67%) had no MRD. From the 20 cases without OB, 11 patients (55%) had no MRD. In both groups (presence/absence of OB), PFS and OS was higher in patients with negative MRD detected by MFC (84 vs 138 months for PFS,  $p=0,1$ ; 84 vs. 138 for OS,  $p=0,02$ ).

## CONCLUSIONS

- Immunohistochemistry shows greater plasma cell infiltration in bone marrow from samples with low infiltration, than cytology and flow cytometry techniques.
- Flow cytometry is a more sensitive test than immunohistochemistry test to detect the persistence of the illness. For response assessment in multiple myeloma, we propose that flow cytometry should be the selected method for clonality detection.
- The complete remission criteria should be reviewed in patients with >5% plasma cell, including the lack of clonality measured by IHC or MFC.
- Bone marrow biopsy is not routinely necessary for the response assessment of myeloma treatment.
- Between patients with negative IF after treatment, Free light chain assay don't identify patients with better outcome.
- The presence of oligoclonal bands after treatment had relation with better outcome.

## **INTRODUCCION**

---

## 1.1. INTRODUCCIÓN AL MIELOMA MÚLTIPLE

Las neoplasias de células plasmáticas son un grupo de enfermedades que resulta de la proliferación de células plasmáticas clonales, que se acompaña de la síntesis y liberación al plasma de una proteína monoclonal. Esta entidad engloba un amplio abanico de enfermedades de células B clonales que incluye las siguientes enfermedades: Gammapatía monoclonal de significado incierto (monoclonal gammopathy of unknown significance, MGUS), mieloma smoldering, plasmocitoma solitario localizado en el hueso como una única lesión o en partes blandas, macroglobulinemia, amiloidosis AL, y otras enfermedades raras como el síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, componente monoclonal y lesiones dérmicas), enfermedad de Castleman y enfermedad de cadenas ligeras.

El mieloma múltiple es por tanto una enfermedad caracterizada por una expansión clonal de células plasmáticas patológicas que se acumulan en la médula ósea, capaces de producir inmunoglobulinas, que pueden ser detectadas en el suero o en la orina mediante técnicas de Electroforesis e inmunofijación. Como resultado de esta expansión clonal puede producirse anemia y otras citopenias asociadas, hipogammaglobulinemia, lesiones osteolíticas, hipercalcemia e insuficiencia renal. Todos estos síntomas son el resultado del efecto directo de la masa tumoral, de citoquinas secretadas por las células del mieloma o del estroma medular, o el depósito de proteínas del mieloma en los órganos diana.

El mieloma representa la segunda neoplasia hematológica en frecuencia, constituyendo el 1.4% de todos los tumores malignos y el 10% de las hemopatías malignas. Tiene una incidencia de 3-5 casos /100.000 habitantes. La mayoría de los pacientes se diagnostican entre los 65 y 74 años, con una edad media al diagnóstico de 69 años; tan solo el 4% de los casos se diagnostican en pacientes menores de 45 años. Esta enfermedad afecta más a varones que a mujeres, con un ratio 1.6:1, los individuos descendientes de africanos tienen el doble de prevalencia que los europeos. Y a la inversa, los individuos de origen japonés y español tienen una prevalencia menor.<sup>1</sup>

## 1.2. DIAGNÓSTICO DE MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma está generalmente precedido de una condición denominada Gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). Una gammapatía monoclonal se define como aquella situación en la que se detecta una paraproteína monoclonal en sangre u orina y es indicativo de una proliferación clonal linfoide o de células plasmáticas.<sup>2</sup> Las proliferaciones puramente reactivas generalmente producen una respuesta con Inmunoglobulinas policlonales, pero por definición no deberían generar Inmunoglobulinas clonales. Las gammapatías monoclonales en presencia de una proliferación de células plasmáticas, se pueden dividir en varias entidades entre las que destacaremos:

- Gammapatía monoclonal de significado incierto
- Mieloma Múltiple asintomático
- Mieloma sintomático.

La diferencia entre las tres entidades se basa en la cuantía del componente monoclonal, el número de células plasmáticas y la presencia o no de daño tisular. En la siguiente tabla se recogen estas características.<sup>3</sup>

MGUS	MM asintomático	MM sintomático
CM sérico < 30g/L	CM sérico >30g/L	CM sérico < 30g/L
CP en MO < 10%	CP en MO > 10%	CP en MO < 10%
No daño de órganos	No daño de órganos	Daño de órganos o tisular

**Tabla 1.1.** Clasificación de las gammapatías <sup>4</sup>.

La gammapatía monoclonal de significado incierto es la alteración de células plasmáticas más frecuente. Su incidencia aumenta rápidamente con la edad afectando al 3% de la población mayor de 50 años y el 10% de la población por encima de 70 años. MGUS se caracteriza por la presencia un componente monoclonal en suero <30g/l, <10% células plasmáticas en médula ósea y ausencia de daño orgánico. Aproximadamente el 1% de estos pacientes progresara a mieloma cada año.<sup>5</sup>

El mieloma Smoldering o mieloma asintomático (SM) se caracteriza por la presencia de una paraproteína >30g/l con más de un 10% de células plasmáticas en médula ósea, en ausencia de daño de los órganos diana, manifestado por anemia, hipercalcemia, lesiones líticas, insuficiencia renal, hiperviscosidad, amiloidosis o infecciones de repetición. Aproximadamente el 10% de estos pacientes progresara a mieloma múltiple cada año.

Finalmente, para el diagnóstico de mieloma múltiple sintomático (MM) se requiere una paraproteína >30g/L, una infiltración por células plasmáticas en médula ósea >10% y evidencia de daño en los órganos diana, manifestado por síntomas CRAB (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones líticas) o infecciones de repetición. Los actuales criterios de mieloma sintomático están recogidos en la tabla 2.

Por tanto, el diagnóstico de mieloma se basa en la detección de un componente monoclonal en sangre y/o orina y la demostración de células plasmáticas clonales en médula ósea.

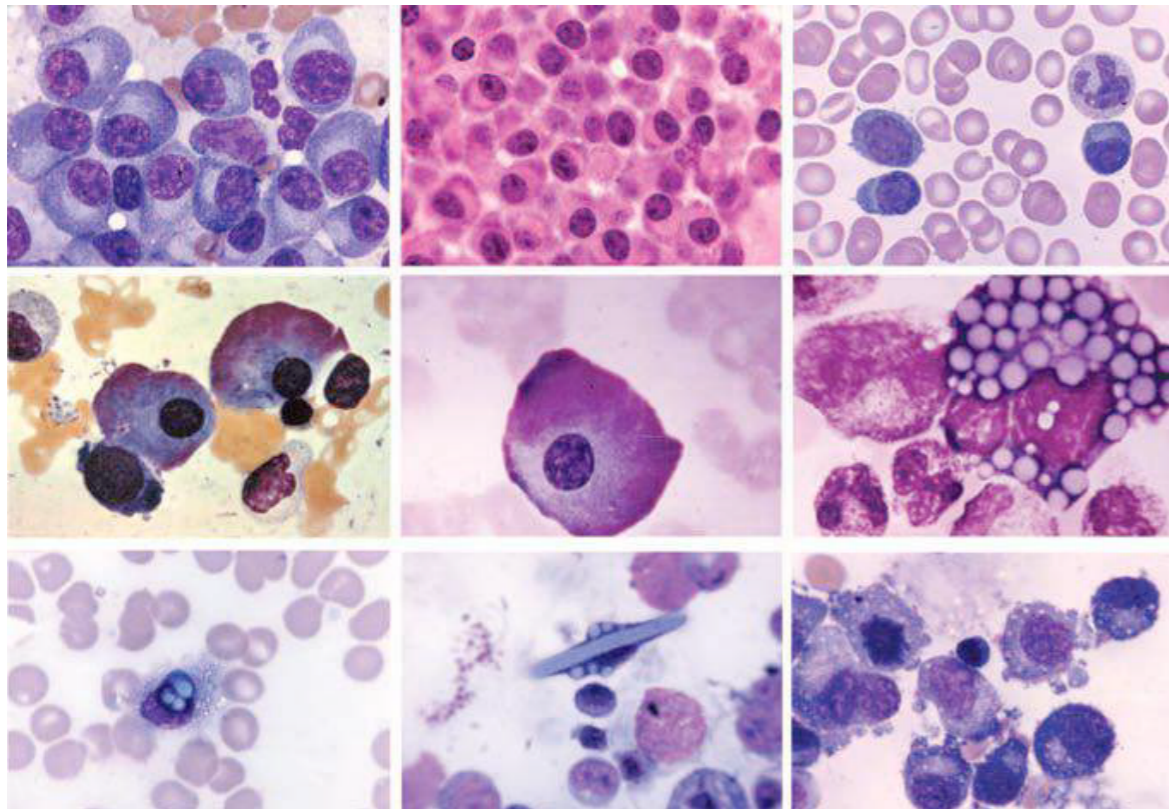
El estudio de las células plasmáticas se realiza mediante un aspirado y/o biopsia de médula ósea. En él se pueden llevar a cabo diferentes técnicas para la caracterización de las células plasmáticas y así poder realizar una aproximación en el porcentaje de infiltración medular, y la demostración de la clonalidad de las células plasmáticas. Estas técnicas se detallan a continuación.

1. Células plasmáticas clonales en M.O. >10% o biopsia compatible con plasmocitoma óseo o extramedular
2. Uno o más de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evidencia de daño de los órganos diana, que puede ser atribuible a la proliferación de células plasmáticas: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Hipercalcemia: Calcio sérico &gt;0.25 mmol/L (&gt;1 mg/dL) por encima de límite superior o &gt;11 mg/dL</li> <li>– Insuficiencia renal: Aclaramiento de creatinina &lt;40 mL /min o creatinina sérica &gt;177 µmol/L (&gt;2 mg/dL)</li> <li>– Anemia: hemoglobina &gt;20 g/L por debajo de la normalidad o hemoglobina &lt;100 g/L)</li> <li>– Lesiones líticas: una o más lesiones osteolíticas presentes en serie ósea, CT o PET- CT</li> </ul> </li> <li>• Al menos uno de los siguientes biomarcadores de malignidad: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Células plasmáticas clonales en M.O.&gt; 60%</li> <li>– Ratio de cadenas ligeras &gt;100</li> <li>– &gt; 1 lesion focal en RM</li> </ul> </li> </ul>

**Tabla 1.2.** Criterios diagnósticos de Mieloma sintomático <sup>6</sup>.

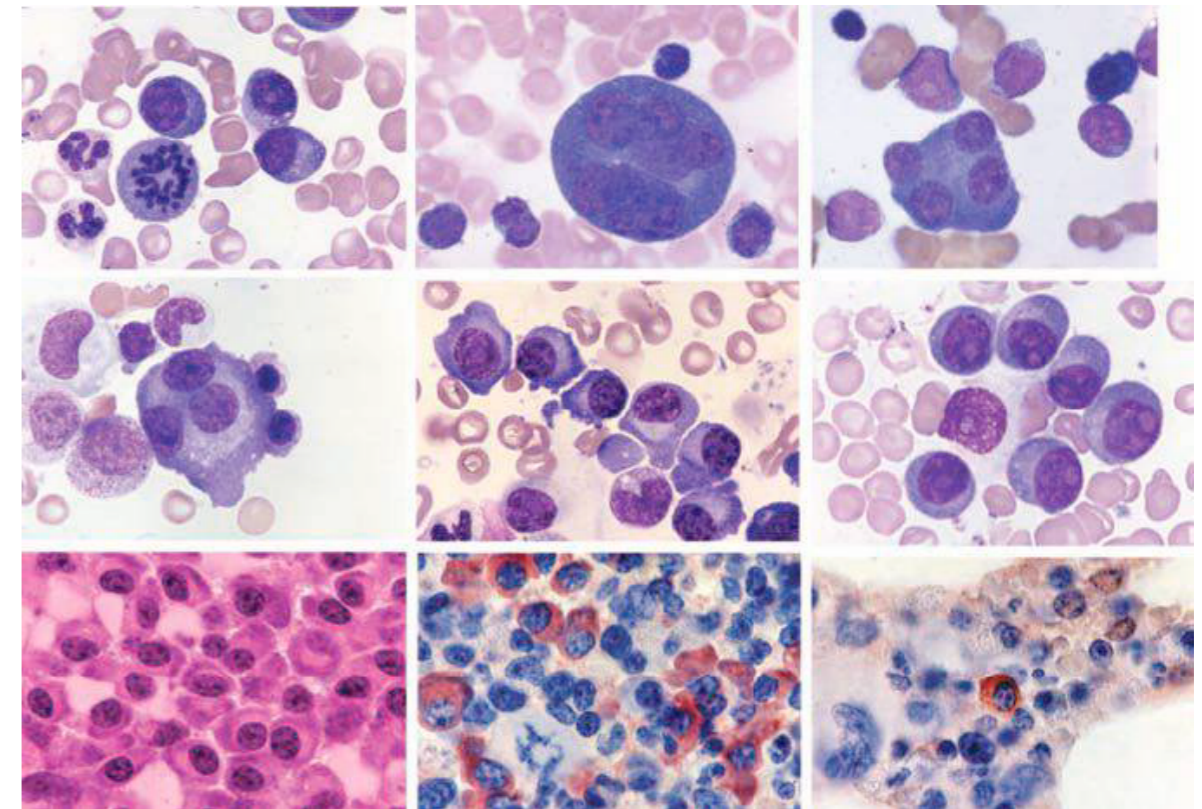
### 1.2.1. CITOMORFOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE MIELOMA

Morfológicamente, el aspirado (estudiado por citología) y la biopsia (histología) puede mostrar una infiltración difusa o más frecuentemente una infiltración focal por células plasmáticas. El porcentaje de células plasmáticas oscila entre un 10% hasta una infiltración masiva con la práctica total sustitución de la médula. Ocasionalmente, la médula puede contener una proporción de células plasmáticas normales residuales, como resultado de una infiltración parcheada de la médula. El diagnóstico de mieloma también se considera en presencia de menos de un 10% de células plasmáticas clonales si el paciente presenta síntomas, o si se demuestra una confirmación histológica de un plasmocitoma extraóseo. Por microscopía óptica, la morfología de las células plasmáticas patológicas puede ser indistinguible de células plasmáticas normales, caracterizadas por un abundante citoplasma basófilo, núcleo excéntrico, de contorno regular con cromatina en rueda de carro sin nucléolo; o presentarse como células plasmáticas aberrantes con células de gran tamaño, cromatina laxa, nucléolo visible (que indica un aumento de la actividad transcripcional), una alta frecuencia de células binucleadas o multinucleadas, y la presencia de cuerpos de inclusión de inmunoglobulina cristalizada que incluye los cuerpos de Russell, la célula de Mott (múltiples inclusiones de color azul pálido y forma de racimo de uvas), células flameadas (ricas en IgA) u otras inclusiones. Estas células patológicas son características del mieloma plasmablástico, un tipo de mieloma con mal pronóstico, donde se observa un gran número de mitosis.<sup>7</sup>



**Figura 1.1.** Características morfológicas del mieloma.

A. Sustitución de la médula por células plasmáticas patológicas que muestran la clásica forma ovalada, núcleo excéntrico, arcoplasma visible, citoplasma basófilo. B. Biopsia de médula con infiltración masiva por mieloma. C. Frotis de sangre periférica de una leucemia de células plasmáticas. D y E. Célula flameada gigante, característica del mieloma IgA. Esta célula se puede ver ocasionalmente en el mieloma IgG y en las plasmocitosis intersticiales. F. Célula de Mott. Las inclusiones, que individualmente se denominan cuerpos de Russel, contienen Inmunoglobulinas. G. Célula plasmática con inclusiones citoplasmáticas y nucleares. H. Inmunoglobulina cristalizada. Se observa una marcada distorsión de la morfología celular para adaptarse a la forma de la inmunoglobulina. I. Células de mieloma que muestran clasmatosis citoplasmática.<sup>8</sup>



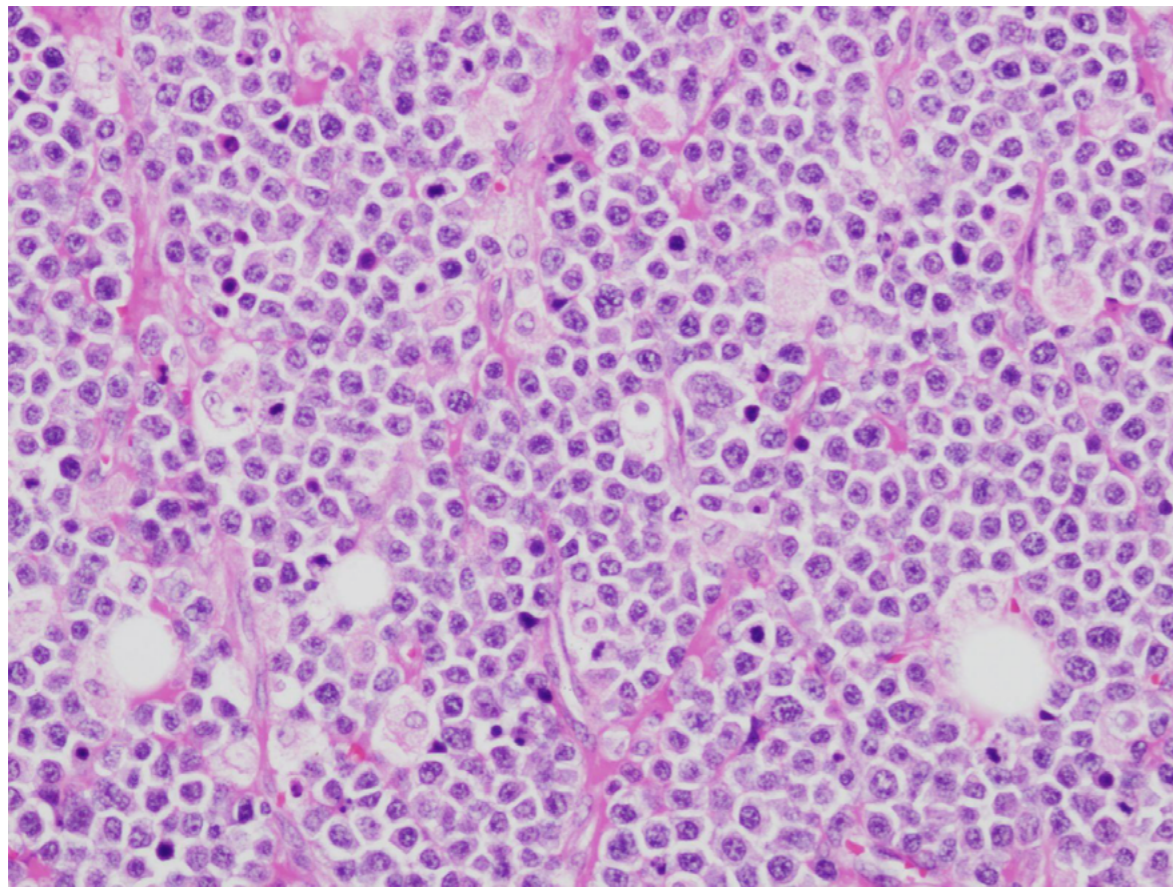
**Figura 1.2.** Características morfológicas del mieloma II.

A. Aspirado medular en el que se observan tres células plasmáticas patológicas y una mitosis. B. Célula gigante multinucleada. C. Extensión medular. Célula plasmática tetranucleada. D. Célula mielomatosa con tres núcleos. E. Biopsia medular infiltrado por las clásicas células de mieloma bien diferenciadas, con núcleo excéntrico, arcoplasma visible, citoplasma basófilo. F. Células plasmáticas de aspecto inmaduro, con núcleo. G. Hematoxilina-eosina. H. Inmunohistoquímica con tinción para cadenas ligeras  $\kappa$  que muestra frecuentes células positivas (coloración teja). I. Inmunohistoquímica con tinción para cadenas ligeras  $\lambda$  donde las células son negativas en su mayoría. Ratio  $\kappa:\lambda$  aproximado 20:1.

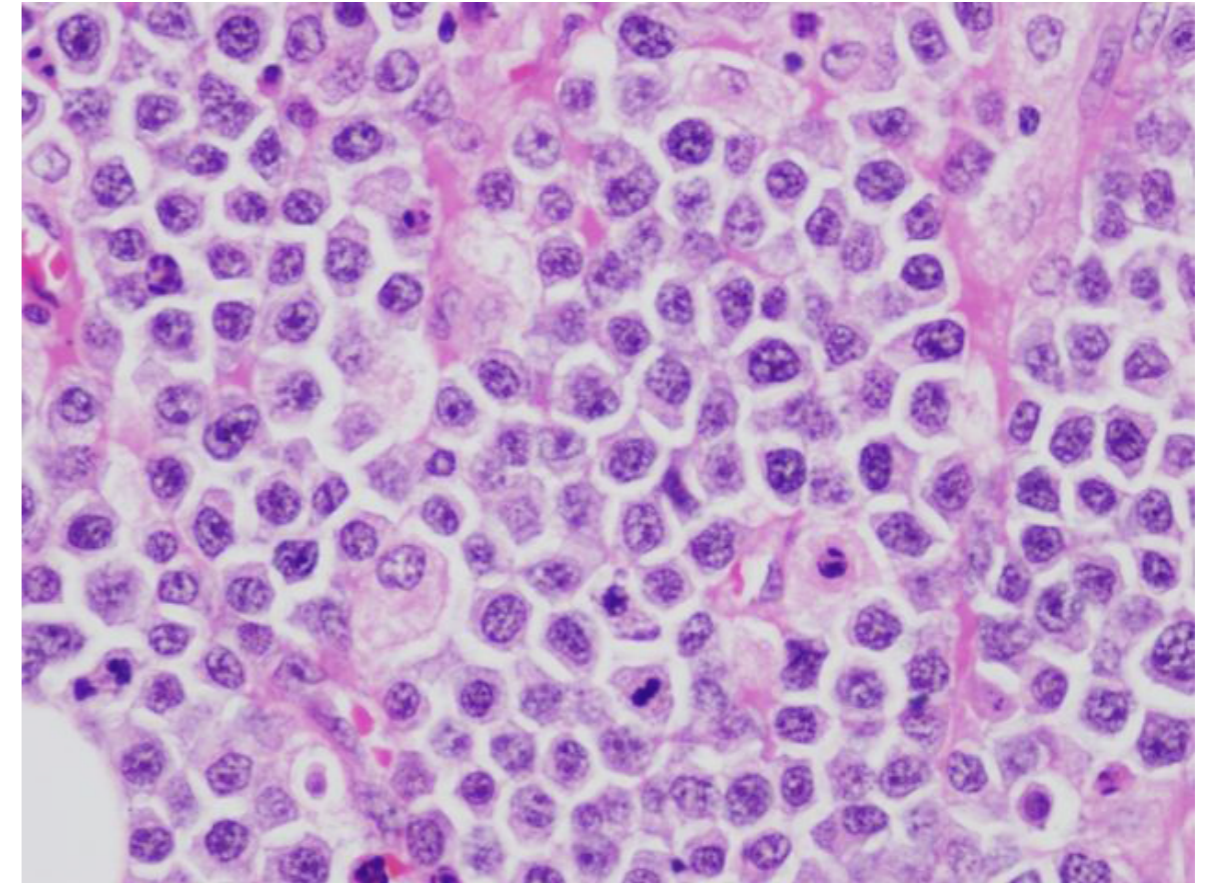
Por lo tanto, las células plasmáticas encontradas en el mieloma muestran una gran heterogeneidad morfológica, y ópticamente pueden confundirse con las células plasmáticas atípicas presentes en las plasmocitosis reactivas a otros procesos. Por eso es importante demostrar la clonalidad, y por tanto malignidad de esta población. El estudio morfológico de las células es importante para hacer una estimación de la infiltración medular, pero no puede demostrar clonalidad. Esto lo podemos realizar por técnicas de inmunohistoquímica, citometría de flujo multiparamétrica (CMF), o por técnicas de biología molecular. Todas ellas con una sensibilidad superior a la morfología convencional.

### 1.2.2. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

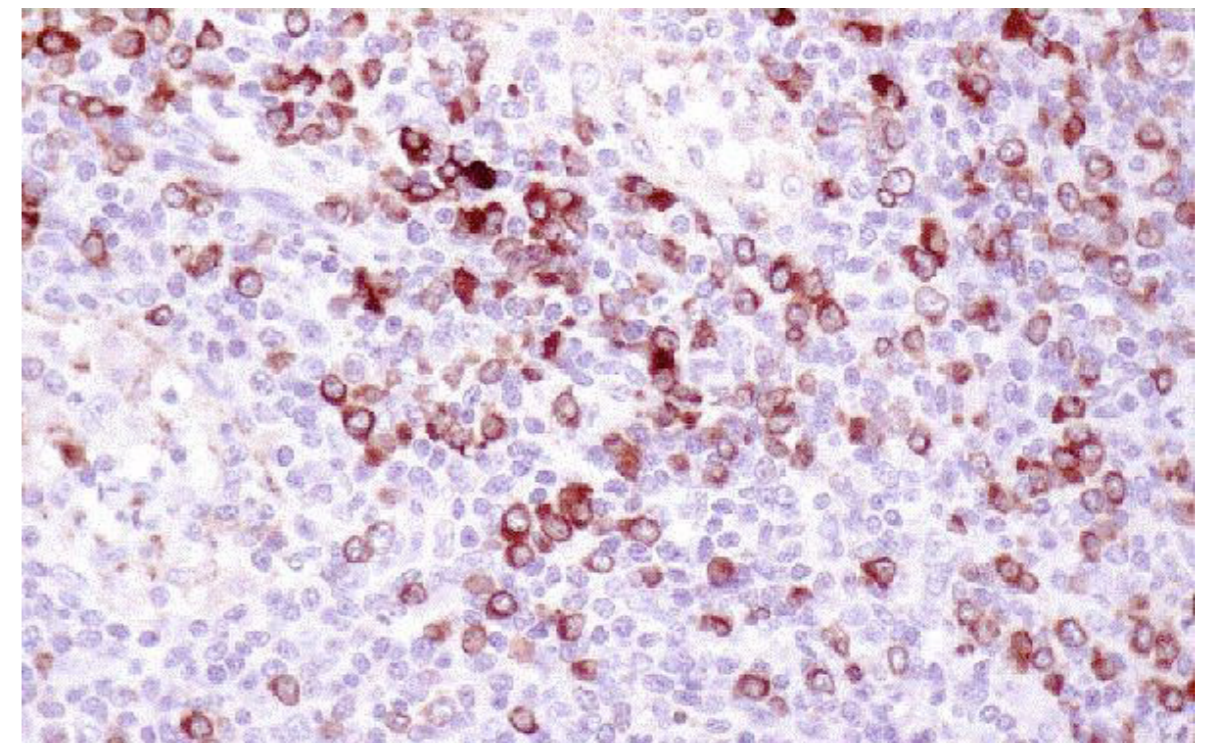
La infiltración medular por células plasmáticas la podemos observar tanto en el coágulo medular como en el cilindro de médula ósea.<sup>9</sup> Con tinción de hematoxilina eosina se observa la hematopoyesis medular.<sup>10</sup> Las células plasmáticas patológicas muestran características morfológicas y de distribución que hacen sospechar el diagnóstico de Mieloma. La medición de células plasmáticas en la biopsia/coágulo de médula ósea se realiza por inmunohistoquímica, marcando las células con CD138.<sup>11</sup> Las células del mieloma son clonales por definición, y producen un tipo de cadena ligera *kappa* o *lambda*, que está presente en el citoplasma de la célula, pero no en la membrana celular.<sup>12</sup> Un ratio *kappa:lambda* mayor de 4:1 (normal 2:1) o menor de 1:2 se considera un índice de monoclonalidad k o l, y permite distinguir una plasmocitosis reactiva (ratio *k:l* normal) de la presencia de un mieloma. Por tanto, para demostrar la clonalidad en una biopsia o aspirado de médula ósea utilizamos la tinción de cadenas ligeras *k/l* por inmunohistoquímica.<sup>13</sup>



**Figura 1.3.** Biopsia de médula ósea con diagnóstico de Mieloma.



**Figura 1.4.** Células de mieloma con pobre diferenciación (plasmablastos).



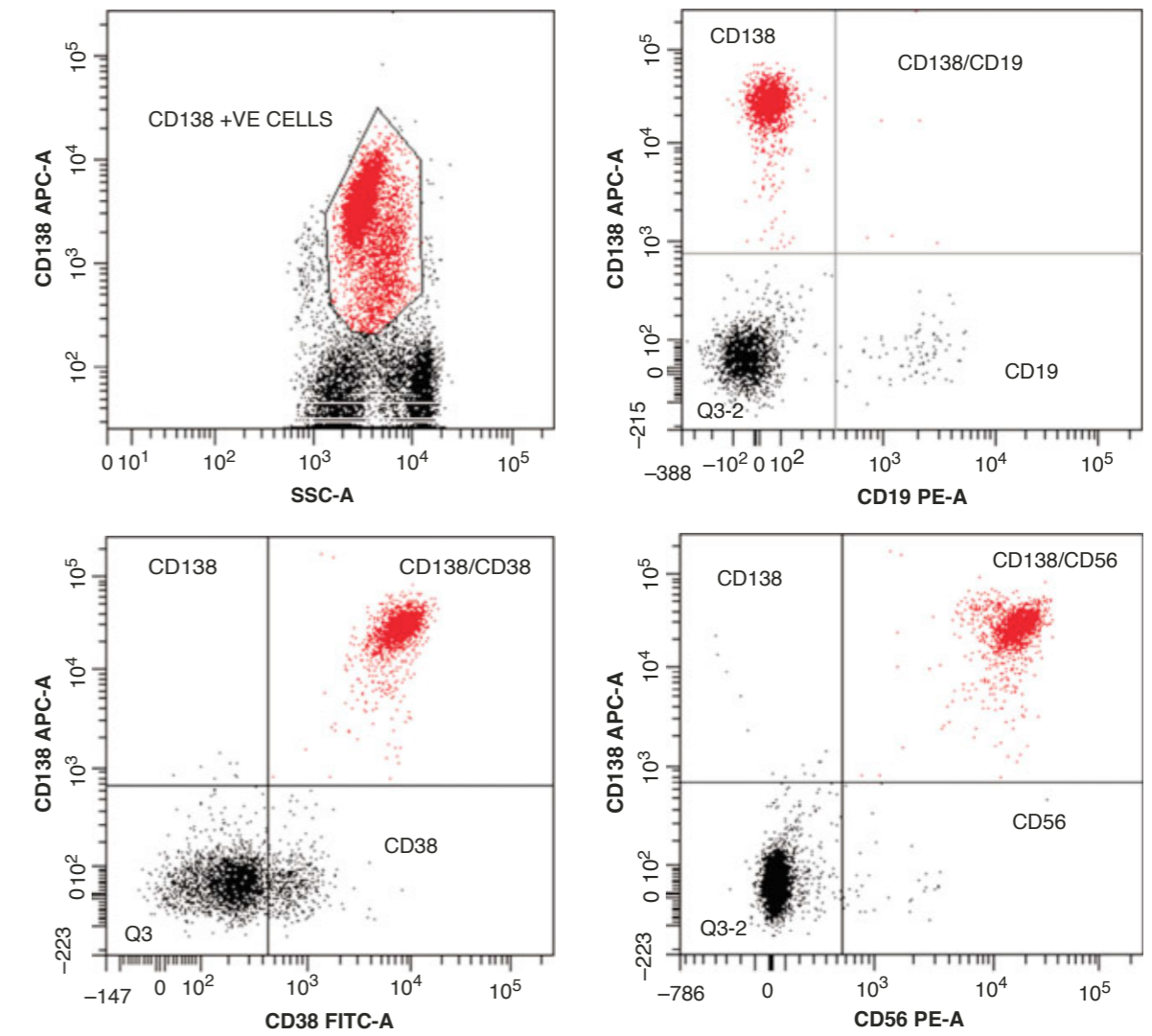
**Figura 1.5.** Tinción CD138 para identificar células de mieloma.

**1.2.3. CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA**

Esta técnica nos ayuda a identificar y cuantificar células plasmáticas patológicas con una sensibilidad muy elevada ( $10^{-4}/10^{-5}$ ). Es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores, y en la ingeniería de proteínas. Las células plasmáticas normales expresan CD45dim, CD19, CD38bright and CD138, junto con la expresión citoplasmática de cadenas ligeras. No expresan Inmunoglobulina de superficie. CD38 es un marcador que se encuentra presente en muchas células hematológicas y no hematológicas. La expresión de CD38 y CD138 no es discriminadora, pero la intensidad de expresión varía. De manera general CD38 se expresa con menor intensidad y CD138 con mayor intensidad en las células plasmáticas patológicas que en las normales. Las células plasmáticas neoplásicas frecuentemente expresan CD38 y CD138 con una población CD45- o CD45dim junto con una expresión ausente o disminuida de CD19. La expresión aberrante de CD56 también está presente en las células plasmáticas patológicas.<sup>14</sup>

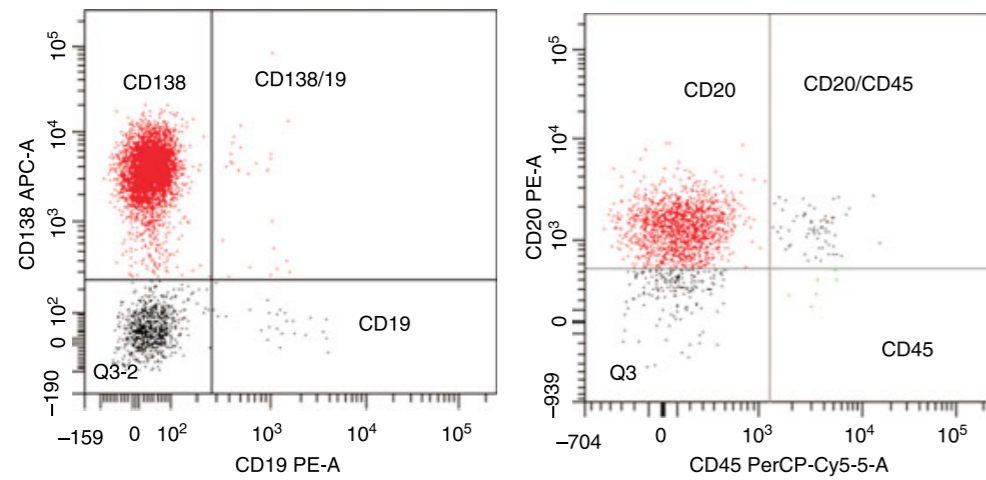
Antígeno	Célula plasmática normal	Célula plasmática patológica
CD45	Dim	Neg
CD38	Bright	Pos
CD138	Pos	Pos
CD19	Pos	Neg
CD56	Neg	Pos/Neg

**Tabla 1.3.** Características inmunofenotípicas de las células plasmáticas



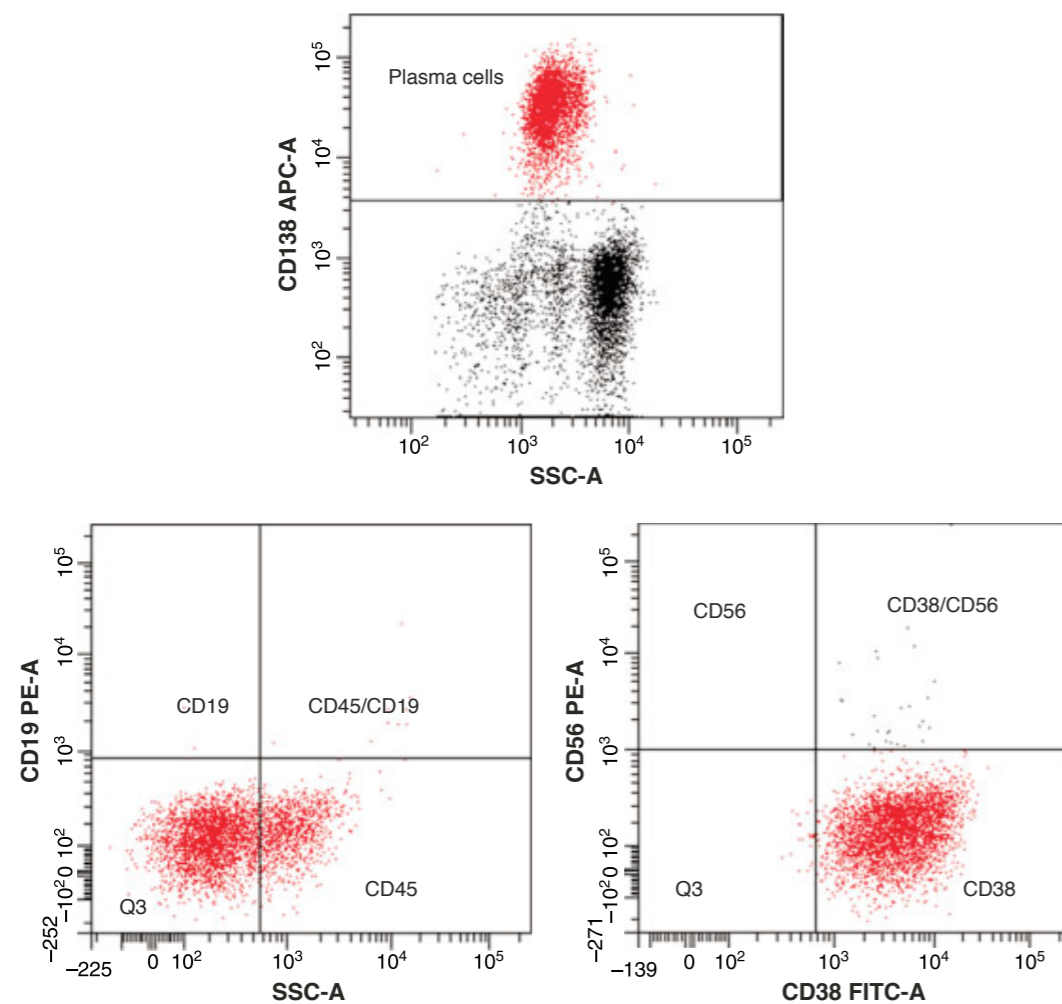
**Figura 1.6.** Detección de células plasmáticas por CMF.

Aspirado de médula ósea que muestra una población pleomórfica de células plasmáticas. Las células plasmáticas muestran positividad para CD138, CD38 y CD56 y ausencia de CD19.<sup>15</sup>



**Figura 1.7.** Células plasmáticas patológicas.

La población de células plasmáticas presenta el siguiente perfil antigénico: CD138+, CD19-, CD45, pero además muestran positividad débil para CD20. Es por tanto un mieloma CD20+.



**Figura 1.8.** Células plasmáticas aberrantes.

El estudio inmunofenotípico confirma la malignidad de las células plasmáticas CD138+, CD45dim, CD19- y CD56-.

La CMF tiene una alta sensibilidad para la detección y caracterización de células plasmáticas y tiene algunas ventajas respecto a la morfología convencional. En general hay una buena correlación entre la morfología y la citometría en la evaluación de células plasmáticas en médula ósea, pero es importante saber que la evaluación morfológica de los porcentajes de infiltración por células plasmáticas en médula ósea (tanto por citología como por histología) es generalmente mayor que la determinada por CMF<sup>16</sup>. Hay múltiples razones que pueden explicar esto:

- Las células plasmáticas patológicas son frágiles, y su superficie de membrana puede alterarse durante el procesamiento de la muestra para análisis por el citómetro.
- Si se realizan varios aspirados medulares, la concentración de células plasmáticas variará en función del aspirado, siendo la primera muestra la que presentará mayor riqueza celular.
- La infiltración por células plasmáticas tiene tendencia a la focalidad, formando *clusters* celulares, que no son liberados por el análisis celular individual por el citómetro<sup>17</sup>.
- Debido a la infiltración por las células plasmáticas patológicas, la médula ósea puede presentar fibrosis en el momento del diagnóstico, obteniendo una muestra poco representativa para el análisis por citometría de flujo (en este caso, el porcentaje de infiltración por citología se realizaría sobre improntas de cilindro de la biopsia<sup>18</sup>).

Existen varios estudios que comparan la infiltración medular al diagnóstico cuantificada en el aspirado versus la biopsia de médula ósea<sup>19,20,21,16</sup>. Comparan el porcentaje de células plasmáticas estimado por citología (sobre un recuento de 500 células) con el porcentaje de infiltración presente en la biopsia de médula ósea, marcando las células plasmáticas por inmunohistoquímica con CD138, y con la infiltración medular detectada por citometría<sup>22,23</sup>. En 2006 Asley P. Ng et al.<sup>24</sup> evalúan la cuantificación de células plasmáticas por los tres diferentes métodos (citología, inmunohistoquímica y citometría de flujo) en 100 muestras de médula ósea de pacientes con diagnóstico de mieloma o gammapatía monoclonal de significado incierto. Observan que la inmunohistoquímica consistentemente demuestra una mayor infiltración medular comparado con los otros métodos.

Los autores concluyen que la inmunohistología es el método más sensible para evaluar la infiltración por células plasmáticas. Unos años más tarde, en 2012, el departamento de histopatología del londinense hospital de Hammersmith<sup>21</sup> evalúa la infiltración medular en pacientes con mieloma múltiple que han recibido tratamiento, comparando los resultados obtenidos en el aspirado por microscopía óptica con los obtenidos con la inmunohistoquímica. Los autores recomiendan la realización de biopsia en la evaluación en la respuesta al tratamiento.

A raíz de la reciente publicación de los nuevos criterios de mieloma sintomático que añade la presencia de más de un 60% de células plasmáticas en médula ósea como criterio de tratamiento,<sup>25</sup> se han publicado dos estudios que defienden la importancia de la cuantificación de células plasmáticas en la biopsia de médula ósea (y no solo en el aspirado) en el momento del diagnóstico. El primero, publicado por Kosei et al.<sup>23</sup> evalúan 150 aspirados y biopsias de médula ósea de 120 pacientes con diagnóstico de mieloma, y compara el porcentaje de infiltración medido por los tres métodos, y observan que tanto la citología como la citometría de flujo sobreestiman el porcentaje de infiltración medular, recalcan la importancia del estudio del coágulo/biopsia en pacientes con MGUS. El segundo, recientemente publicado,<sup>26</sup> selecciona 58 médulas de pacientes con reciente diagnóstico de mieloma con una infiltración medular <10% estimada por citometría en el aspirado medular y lo compara con el porcentaje de infiltración observada en la biopsia de dichos pacientes. Observan que en 55 de los 58 pacientes (94%), la infiltración por inmunohistoquímica era superior al 10%. Todos los estudios publicados concluyen que el método más sensible para la cuantificación de células plasmáticas al diagnóstico en pacientes con sospecha de mieloma es la biopsia de médula ósea, especialmente en pacientes con bajo porcentaje de células plasmáticas en el aspirado de médula ósea.

#### 1.2.4. TÉCNICAS MOLECULARES. PCR FLUORESCENTE

Otro de los métodos utilizados para la demostración de clonalidad en las células plasmáticas son los métodos de biología molecular. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado su utilidad en la demostración de carga tumoral en distintos tumores hematológicos. Tanto la ASO-PCR (allele-specific oligonucleotides) como la PCR fluorescente son útiles para la detección de reordenamientos. Sin embargo, los estudios moleculares basados en la ASO-PCR son muy laboriosos y caros, y por tanto difíciles de aplicar en la rutina.<sup>27,28,29</sup>

La PCR fluorescente consiste en una PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. Es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de DNA o de RNA mensajero (mRNA) de una muestra. Utilizando primers específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de DNA o RNA. F-PCR puede detectar una célula clonal en 100 a 1000 células normales, es por tanto menos sensible que la CFM. Sin embargo, F-PCR es rápida, asequible y fácil de realizar. Se aísla DNA de alto peso molecular de 500mcrI de médula ósea. Se utilizan tres grupos de *primers* diferentes que estudian los reordenamientos de los genes IGH V-D-J y D-J, IGK V-J and KDE. Con esta técnica podemos determinar la población clonal al diagnóstico y durante el seguimiento de los pacientes. Aunque un 10% de los pacientes carece de reordenamiento monoclonal al diagnóstico, generalmente debido a errores de hibridación de los *primers*. En estos pacientes no se puede hacer seguimiento con esta técnica.<sup>29,30</sup>

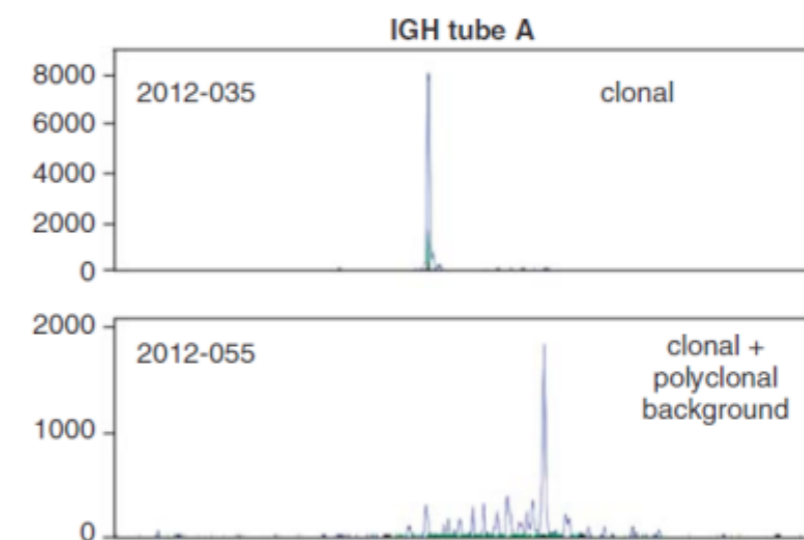
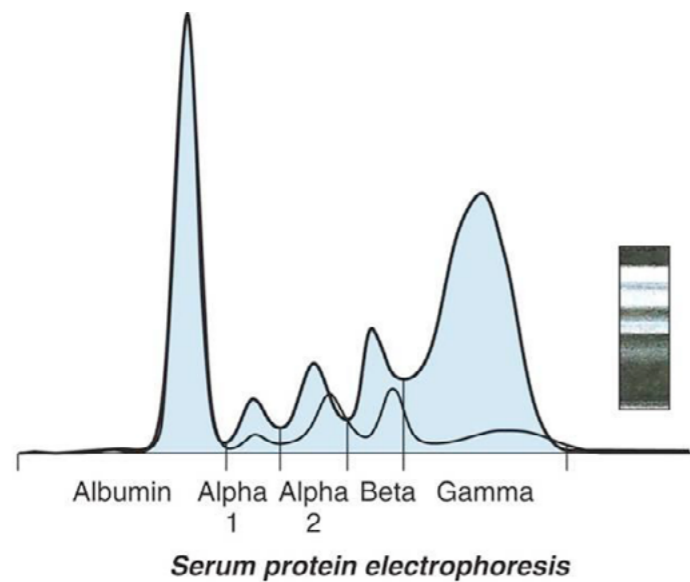


Figura 1.9. Detección de pico clonal por PCR fluorescente.

**1.2.5. MEDICIÓN DEL COMPONENTE MONOCLONAL**

La mayoría de los pacientes con mieloma producen y secretan una Inmunoglobulina monoclonal (lo que denominamos proteína M o pico M) que puede ser detectada por electroforesis en suero y/o orina de 24 horas. Las células neoplásicas pueden secretar cadenas pesadas de inmunoglobulinas junto con cadenas ligeras, únicamente cadenas ligeras, o no secretar ninguna (es el caso del Mieloma no secretor). En este último caso, se puede detectar la inmunoglobulina intracitoplásmica. El análisis de inmunofijación identifica los idiotipos específicos de las inmunoglobulinas. La inmunoglobulina monoclonal IgG está presente en el 60% de los pacientes con mieloma, IgA en aproximadamente el 20% de los pacientes, y el 20% restante lo representa pacientes con cadenas ligeras. Los mielomas IgD, IgM y biconales son raros (5% de los casos). El isotipo *kappa* es más frecuente que el *lambda* con una relación aproximada 2:1.



Fractions	%	Reference normal % range	Concentration	Reference normal concentration range
Albumin	28.3	< 60.0 – 71.0	2.43	43.00 – 51.00
Alpha 1	4.2	> 1.4 – 2.9	0.36	1.00 – 2.00
Alpha 2	8.2	7.0 – 11.0	0.71	5.00 – 8.00
Beta	10.5	8.0 – 13.0	0.90	6.00 – 9.00
Gamma	48.8	> 9.0 – 16.0	4.20	6.00 – 11.00

(d)

**Figura 1.10.** Electroforesis de proteínas normal (línea de abajo) y con bandas monoclonales.

Como hemos explicado anteriormente para el diagnóstico de mieloma se requiere la demostración de células plasmáticas patológicas en médula (o extramedular en el caso de plasmocitomas) y la detección de una proteína monoclonal en sangre y/o orina. La caracterización del tipo de Inmunoglobulina o cadena ligera clonal se realiza a través de la inmunofijación. Esta es de gran importancia durante el seguimiento de los pacientes. Para alcanzar la remisión completa es necesario la ausencia de paraproteína medida por inmunofijación.

Durante el seguimiento de los pacientes con mieloma se ha observado la aparición de bandas oligoclonales o monoclonales no relacionadas con el clon original.<sup>31</sup> Esto se describió inicialmente en pacientes que habían sido sometidos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos,<sup>32,33</sup> y posteriormente también en pacientes tratados con nuevas terapias. Múltiples estudios defienden que la presencia de bandas oligoclonales se asocia a un pronóstico favorable. Jiménez-Zepeda VH et al.<sup>34</sup> estudian en 2012 el valor pronóstico de la presencia de BO a día 100 tras el trasplante de médula en paciente con mieloma múltiple, concluyendo que en pacientes sometidos a trasplante la presencia de bandas oligoclonales es un factor pronóstico importante. Otros grupos de trabajo ponen en duda esta afirmación. Estudian 163 pacientes sometidos a trasplante entre 2006 y 2014, y observan que la presencia de BO se asocia a una mejor supervivencia libre de progresión y mejor supervivencia global, pero que si los pacientes se limitan a aquellos que obtienen mejor respuesta que VGPR, la presencia de BO no afecta ni a la SLP ni a la SG.<sup>35</sup> Concluyen que la aparición de BO se observa exclusivamente en pacientes con respuestas favorables, pero su aparición per se no debe ser traducida en un aumento en la supervivencia.

**Cadenas ligeras libres en suero.** Para la demostración del componente monoclonal en suero también se utiliza el análisis de cadenas libres en suero (FREELITE)<sup>36</sup>. Esta es una técnica utilizada para medir cadenas ligeras libres en suero monoclonales mediante nefelometría y un anticuerpo anticadenas ligeras; nos da información sobre el ratio *k:l* que se considera alterado si es menor de 0.26 (restricción para cadenas lambda) o mayor de 1.65 (restricción para cadenas kappa). Es una prueba relevante para definir mieloma asintomático con alto riesgo de progresión. En estos pacientes que carecen de proteína M medible en suero ni orina, la cuantificación de las cadenas ligeras es el mejor marcador tumoral medible.<sup>37</sup>

Las cadenas libres en suero están presentes en los pacientes en una cuantía mucho menor que las cadenas ligeras unidas a Inmunoglobulinas. La vida media de las cadenas ligeras libres es más corta que la de la inmunoglobulina intacta (4 horas versus 21 días), por ello la evaluación seriada de cadenas ligeras libres en suero permite evaluar la respuesta al tratamiento más temprano que los niveles de pico M.<sup>38</sup> Debido a su corta vida media, hay autores que defienden que una alteración en el ratio *k:l* de cadenas libres en suero es también indicador precoz de recaída.<sup>39</sup> Kröger et al. estudian 52 pacientes con mieloma múltiple en remisión completa con inmunofijación negativa en suero y orina y ratio *k:l* de cadenas libres en suero normal. De estos pacientes, 10 recaen; en 9 de ellos el ratio de cadenas ligeras libres en suero estaba alterado con una media de 90 días antes de que la inmunofijación fuese positiva. Con estos resultados los autores defienden que, debido a su vida media corta, el estudio de cadenas ligeras libres en suero es un marcador útil para la detección rápida de la remisión o la progresión.

Desde el año 2006 se incluye el estudio cadenas ligeras libres en los criterios de respuesta al tratamiento en el mieloma.<sup>40</sup> Sin embargo, hay datos contradictorios que apoyen que un ratio de cadenas libres en suero determine una mayor profundidad de la respuesta.<sup>41-44</sup>

### 1.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Los primeros criterios de respuesta utilizados fueron definidos en los años sesenta por el Committee on the Chronic Leukemia Myeloma Task Force (CLMTF) en 1968 revisados por el mismo grupo en 1973<sup>45</sup> (*tabla 1.3.*) y por el Southwest Oncology Group (SWOG) en 1972 (*tabla 1.4.*) . Ambos se basaban en la tasa de reducción del componente M, ya que a diferencia de lo que ocurría en otras neoplasias hematológicas, el tratamiento del MM con dosis convencionales de QT raramente inducía remisión completa, es decir, desaparición del componente M del suero y reducción a menos del 5% de infiltración por células plasmáticas en MO, por lo que ninguno de los dos grupos contempló la posibilidad de obtener la citada remisión completa. Además, los criterios del CLMTF y los del SWOG no conseguían estratificar a los pacientes en grupos con expectativas de supervivencia diferentes en función de la respuesta. Se observó que más que el grado de reducción de la paraproteína, conseguir una fase de estabilidad duradera del componente M (fase de plateau, definida por el Medical Research Council de Reino Unido en 1992) debía ser el objetivo primordial para mejorar la supervivencia de los pacientes de MM tratados con QT convencional.<sup>46</sup> Con la introducción de nuevos regímenes de tratamiento, se comenzó a observar la desaparición de la paraproteína en una proporción significativa de pacientes, por lo que surgió la necesidad de definir el criterio de remisión completa (Samson et al. 1989). Con el progresivo uso de la quimioterapia intensiva, hubo un aumento del número de pacientes que obtenían remisión completa (RC) por lo que en seguida otros grupos publicaron sus propias definiciones de remisión completa. Todos los grupos coincidían en que debía desaparecer el componente monoclonal de suero y orina junto con un porcentaje normal de células plasmáticas en médula ósea (1-4%) pero diferían en si la ausencia de paraproteína debía ser medida por electroforesis o si la inmunofijación era necesaria. Incluso algunos grupos incluían una morfología normal de las células plasmáticas, mientras que otros no decían nada al respecto.

CRITERIOS DE RESPUESTA EN EL MM (CLMTF 1968/1973)
<p><b>Efecto directo en las manifestaciones del mieloma: 1 o más de los siguientes:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Paraproteína en suero: reducción de al menos el 50% del valor previo.</li> <li>• Componente M en orina: reducción del 50% o menos del valor pretratamiento si el componente era mayor de 1g/24h: una caída de al menos 0.1g/24 si el valor pretratamiento estaba entre 0.5 y 1g/24h: si el valor pretratamiento era menor de 0.5g/24h este parámetro no se considera un indicador fiable de respuesta.</li> <li>• Reducción del 50% o más de plasmocitomas</li> <li>• Evidencia radiográfica de curación esquelética</li> </ul> <p><b>Efecto en las manifestaciones indirectas del mieloma:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento significativo de hemoglobina de al menos 2g/dl.</li> <li>• Aumento de peso (al menos 4KG) sin evidencia de edema.</li> <li>• Corrección de la hipercalcemia</li> <li>• Normalización de la función renal.</li> <li>• Recuperación de niveles normales de Inmunoglobulinas.</li> <li>• Normalización de los valores de albúmina</li> <li>• Reducción en el porcentaje de células plasmáticas a menos del 5%</li> </ul>

**Tabla 1.4.** Criterios de respuesta en MM (CLMTF (1968, 1973))

CRITERIOS DE RESPUESTA EN MM (SWOG, 1972)
<p><b>Respuesta objetiva</b> (todos los siguientes criterios mantenidos al menos 2 meses)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución en la síntesis de paraproteína en suero hasta el 25% o menos del valor pretratamiento y menor de 25g/l</li> <li>• Disminución de las cadenas ligeras en orina a menos del 10% del valor pretratamiento y menos de 0.2g/24h</li> <li>• Mejoría del dolor óseo y del performance status</li> <li>• Número y tamaño de de las lesiones líticas de cráneo no deben aumentar y el calcio sérico debe mantenerse en valores normales.</li> <li>• Corrección de la anemia (Hb&gt;9gr/dl) y de la hipoalbuminemia (&gt;30g/l) si se consideran secundario al mieloma.</li> </ul> <p><b>Mejoría</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de la paraproteína a menos del 50% pero más del 25% del valor pretratamiento.</li> </ul>

**Tabla 1.5.** Criterios de respuesta en MM Southwest Cancer Chemotherapy Study Group (1972)

DEFINICIÓN DE LA FASE DE PLATEAU
<p>Cumplir todos los siguientes criterios por un período de al menos 6 meses:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estabilización del a paraproteína sin mayor regresión tumoral a pesar de continuar con el tratamiento.</li> <li>2. Pocos o ningún síntoma del mieloma</li> <li>3. No requerimiento transfusional.</li> </ol>

**Tabla 1.6.** Definición de la fase de Plateau (Medical Research Council)

Dado que no existía un consenso internacional para evaluar la respuesta al tratamiento, en el año 1998, se desarrollaron nuevos criterios de respuesta y progresión, como resultado de discusiones de los representantes de la European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), representantes del comité de mieloma del Autologous Blood and Marrow Transplant registry (ABMTR) y del International Bone marrow Transplant Registry (IBMTR).<sup>47</sup> Por primera vez se establece un consenso internacional, basado en los diferentes criterios que existían hasta el momento, con algunas modificaciones. Se establece el criterio de respuesta completa basado en la negatividad tanto por electroforesis como por inmunofijación en suero y orina, mantenida durante al menos 6 semanas. Por lo tanto, los pacientes con EEF negativa, pero IF positiva ya no se consideran en RC. Asimismo, se requiere un aspirado de médula ósea para confirmar la remisión completa. En estos nuevos criterios el estudio de médula ósea únicamente se considera necesario para confirmar la respuesta completa o para evaluar la respuesta en mielomas no secretor. El requisito fundamental en la nueva definición es la ausencia de componente M detectable por inmunofijación. Dado que ya se consideraba que obtener RC era un potencial prerrequisito para la curación del mieloma, parecía lógico que la RC necesitara de la ausencia de paraproteína por el método más sensible. Se comenzaban a pensar que estudios de enfermedad mínima residual (EMR) evaluada por métodos moleculares o CMF podrían dar información adicional en enfermos en RC, pero los resultados de aquellos estudios no eran claros y no estaban disponibles de rutina. Por consiguiente, la EMR no se incluyó en el criterio para la RC.

#### CRITERIOS DE RESPUESTA, RECAÍDA Y PROGRESIÓN (EBMT,1998)

##### Respuesta completa

- Desaparición de la paraproteína en suero y orina medida por Inmunofijación
- Desaparición de cualquier plasmocitoma en tejidos blandos y
- Número de células plasmáticas en médula ósea  $\leq 5\%$
- No aumento de lesiones líticas en número ni tamaño

##### Respuesta Parcial

- Reducción  $\geq 50\%$  del componente monoclonal en suero y reducción del componente monoclonal en orina de 24 horas  $\geq 90\%$  o  $< 200$  mg/24 horas. Si el componente monoclonal en suero y orina no es medible, se requiere una disminución  $\geq 50\%$  en la diferencia entre los niveles de FLC (antes y después) en sustitución del criterio de componente monoclonal.
- Si el componente monoclonal en suero y orina no es medible, y FLC tampoco es medible, se requiere una disminución  $\geq 50\%$  de células plasmáticas, si el valor basal fue  $\geq 30\%$  en médula ósea, en sustitución del criterio de componente monoclonal.
- Si existían plasmocitomas, se requiere una reducción  $\geq 50\%$  de su tamaño.
- No aumento en número de ni tamaño de las lesiones líticas

Tabla 1.7. Continúa en la siguiente Pag

**CRITERIOS DE RESPUESTA, RECAÍDA Y PROGRESIÓN (EBMT,1998)****Respuesta completa**

- 25-49% de reducción de la paraproteína en suero mantenido al menos 6 semanas
- 50-89% reducción en la excreción urinaria de cadenas ligeras, que es todavía <200mg/24h, mantenido al menos 6 semanas.
- En pacientes con mieloma no secretor, 25-49% de reducción en el porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea y en la biopsia de médula ósea, si la biopsia se realiza, mantenido al menos 6 semanas.
- No aumento en tamaño ni número de lesiones líticas
- Enfermedad sin cambios
- No cumple criterios de respuesta mínima ni de enfermedad progresiva
- Plateau
- Valores estables (25% por encima o por debajo del valor en el momento de la evaluación de la respuesta) mantenidos al menos 3 meses.

**Tabla 1.7.** Continúa en la siguiente Pag

**CRITERIOS DE RESPUESTA, RECAÍDA Y PROGRESIÓN (EBMT,1998)****Recaída desde Remisión completa**, requiere al menos uno de los siguientes criterios:

- Reparición de la paraproteína en suero y/o orina detectada por inmunofijación o electroforesis, confirmada al menos en dos determinaciones, excluyendo reconstitución inmune.
- $\geq 5\%$  células plasmáticas en el aspirado de médula ósea o en la biopsia.
- Desarrollo de nuevas lesiones líticas o plasmocitomas.
- Hipercalcemia no atribuida a otra causa

**Enfermedad Progresiva** (para pacientes que no estén en RC). Requiere al menos uno de los siguientes:

- $>25\%$  aumento de la paraproteína, q debe ser al menos de 500mg/dl y repetido al menos dos veces
- $>25\%$  aumento de la excreción urinaria de cadenas ligeras, que debe ser al menos de 200mg/24h, confirmado dos veces.
- $>25\%$  aumento de las células plasmáticas en el aspirado o la biopsia de médula ósea, que debe ser un aumento de la menos el 10%
- Aumento en tamaño de lesiones líticas previas o plasmocitomas
- Aparición de nuevos plasmocitomas.
- Hipercalcemia, no atribuible a otra causa.

**Tabla 1.7.** Criterios de respuesta, recaída y progresión (EBMT, 1998)

Estos criterios, conocidos como los criterios de EBMT, fueron ampliamente utilizados. Pero diferentes factores desencadenaron la necesidad de definir unos nuevos criterios unificados de respuesta. Entre otros, la necesidad de clarificar la definición de Respuesta Completa. A medida que se utilizaban agentes más activos y eficaces para el tratamiento del mieloma, surgió la necesidad de evaluar no solo si se obtenía Remisión Completa, sino la magnitud exacta de esta respuesta. En los criterios del EBMT la RC no requería ausencia de células plasmáticas clonales, únicamente la reducción a menos de un 5% de células plasmáticas en médula ósea. Esto hacía que se englobasen en el mismo grupo de respondedores aquellos que presentaban células plasmáticas policlonales en la médula con aquellos que todavía tenían células clonales. Por todo el grupo internacional del mieloma (International Myeloma Working Group, IMWG) publicó en 2006 unos nuevos criterios de respuesta al tratamiento.<sup>40</sup> La tabla 1.8 muestra los criterios del IMWG.

#### CRITERIOS DE RESPUESTA EN MIELOMA MULTIPLE ( IMWG, 2006)

##### Respuesta completa estricta (stringent complete response, sCR)

- Cumple criterios de Respuesta Completa (RC) más:
- Ratio de cadenas ligeras libres (FLC) normal
- Ausencia de células clonales en médula ósea por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia

##### Respuesta completa (complete response, CR)

- Inmunofijación negativa en suero y orina y
- Desaparición de cualquier plasmocitoma en tejidos blandos y
- Número de células plasmáticas en médula ósea  $\leq 5\%$
- Muy buena respuesta parcial (very good partial response, VGPR)
- Componente M detectable en suero y orina por inmunofijación pero no en electroforesis o
- Reducción del 90% o mayor del componente monoclonal sérico más un nivel de componente monoclonal en orina  $< 100 \text{ mg}/24 \text{ horas}$ .

##### Respuesta parcial (partial response, PR)

- Reducción  $\geq 50\%$  del componente monoclonal en suero y reducción del componente monoclonal en orina de de 24 horas  $\geq 90\%$  o  $< 200 \text{ mg}/24 \text{ horas}$ .
- Si el componente monoclonal en suero y orina no es medible, se requiere una disminución  $\geq 50\%$  en la diferencia entre los niveles de FLC (antes y después) en sustitución del criterio de componente monoclonal. - Si el componente monoclonal en suero y orina no es medible, y FLC tampoco es medible, se requiere una disminución  $\geq 50\%$  de células plasmáticas, si el valor basal fue  $\geq 30\%$  en médula ósea, en sustitución del criterio de componente monoclonal.
- Si existían plasmocitomas, se requiere una reducción  $\geq 50\%$  de su tamaño.



Tabla 1.8. Continúa en la siguiente Pag

**CRITERIOS DE RESPUESTA EN MIELOMA MULTIPLE ( IMWG, 2006)****Enfermedad estable (stable disease, SD)**

- No cumple criterios de respuesta completa, muy buena respuesta parcial, respuesta parcial o enfermedad progresiva

**Enfermedad progresiva (progressive disease, PD) Requiere uno o más de los siguientes::**

- Incremento de  $\geq 25\%$  del valor basal en
- Componente monoclonal en suero y/o (el incremento absoluto debería ser  $\geq 0.5$  g/dl)
- Componente monoclonal en orina y/o (el incremento absoluto debería ser  $\geq 200$  mg/24h)
- Sólo en pacientes sin niveles de proteína monoclonal en suero y orina: la diferencia entre el nivel de FLC. El valor absoluto debería ser  $> 10$  mg/dl
- Porcentaje de células plasmáticas de médula ósea: el valor absoluto deberá ser  $\geq 10\%$
- Claro desarrollo de nuevas lesiones óseas o plasmocitomas de tejidos blandos o claro incremento en el tamaño de las lesiones óseas existentes o de los plasmocitomas.
- Desarrollo de hipercalcemia (calcio corregido  $> 11.5$  mg/del ó  $2.65$  mmol/l) que pueda ser atribuido únicamente a la enfermedad



**Tabla 1.8:** Continúa en la siguiente Pag

**CRITERIOS DE RESPUESTA EN MIELOMA MULTIPLE ( IMWG, 2006)****Recaída clínica (clinical relapse)**

Requiere uno o más de los siguientes:

- Los indicadores directos de incremento de la enfermedad y/o disfunción de órganos
- (CRAB)
- Desarrollo de nuevos plasmocitomas de tejidos blandos o lesiones óseas.
- Incremento en el tamaño de plasmocitomas o lesiones óseas, definido como un aumento del 50% (y al menos 1 cm.) medido seriadamente por la suma de productos de los diámetros de la lesión medida.
- Hipercalcemia ( $>11.5$  mg/dl)( $2.65$  mmol/l)
- Descenso de la cifra de hemoglobina de  $\geq 2$ g/dl ( $1.25$  mmol/l)
- Creatinina sérica de 2 mg/dl o más ( $177\mu$ mol/l o más)

**Recaída desde remisión completa**

Uno o más de los siguientes:

- Reparación de la proteína monoclonal en orina o suero por inmunofijación o electroforesis.
- Desarrollo de  $\geq 5\%$  de células plasmáticas en médula ósea
  - Aparición de cualquier otro signo de progresión

**Tabla 1.8.** Criterios de respuesta en el mieloma múltiple (IMWG, 2006)

Respecto a los antiguos criterios, los cambios más importantes realizados fueron:

- La inclusión de una nueva categoría de Remisión Completa estricta, en la que se incluye la ausencia de células clonales en médula ósea medida por Inmunohistoquímica o por fluorescencia medida por citometría de flujo
- inclusión del estudio de cadenas ligeras libres (Free Light Chain, FLC) para la evaluación de la respuesta en pacientes con mieloma no secretor, y como requisito para obtener una remisión completa estricta. Este estudio mide las cadenas ligeras libres en suero que no están unidas a inmunoglobulinas, y su ratio (FLC ratio) es un buen indicador para detectar clonalidad. Por ello la normalización del ratio de FLC lo consideraron un indicador estricto de RC.
- La inclusión formal de una nueva categoría, la Muy buena respuesta parcial (very good partial response VGPR) que permite distinguir a pacientes con respuestas excelentes que podrían tener resultados similares a los de los obtenidos por pacientes que alcanzan Remisión Completa.

Estos nuevos criterios buscaban diferenciar bien aquellos pacientes que obtenían buenas respuestas al tratamiento. De ahí la inclusión de las dos nuevas categorías (sCR y VGPR) para clasificar aquellos pacientes que “casi” obtienen respuesta completa de aquellos pacientes que obtienen RC, y aquellos en los que no se demuestra enfermedad clonal en médula ósea tras el tratamiento.<sup>48</sup> Según estos nuevos criterios, la presencia/ausencia de células clonales se basaba en la evaluación por inmunohistoquímica o fluorescencia de al menos 100 células, y el cálculo del ratio k:l. Un ratio anormal refleja la presencia de un clon anormal, y esto viene definido cuando el ratio k/l es >4:1 o <1:2.

Desde su publicación en 2006 hasta la actualidad, los criterios del IMWG han sido utilizados a nivel internacional para evaluar la respuesta al tratamiento en el mieloma múltiple. Con el desarrollo de nuevas terapias cada vez más efectivas, se observó una gran mejoría en la respuesta al tratamiento, observando respuestas en prácticamente todos los pacientes, y obteniendo respuestas completas hasta en un 50% de los pacientes. Sin embargo, muchos de estos pacientes recaían a pesar de todo, reflejando la persistencia de una enfermedad residual que no era capaz de detectar las técnicas utilizadas hasta el momento. Cada vez fue adquiriendo más peso una evaluación precisa y rigurosa de las células plasmáticas en la evaluación de la respuesta al tratamiento. Es por ello que el mismo grupo de trabajo (IMWG) publica en 2011<sup>49</sup> una actualización de los criterios de respuesta donde modifica la definición de Remisión Completa estricta y añade las nuevas definiciones:

- **Remisión completa inmunofenotípica**

- RC estricta
- Ausencia de células plasmáticas aberrantes en médula ósea, en un mínimo de 1 millón de células analizada por citometría de flujo multiparamétrica (con al menos cuatro colores)

- **Remisión completa molecular**

- RC estricta
- Negatividad de ASO-PCR

- **Remisión completa estricta:**

- Remisión completa
- Ausencia de células plasmáticas clonales medidas por inmunohistoquímica o por citometría de 2-4 colores.
- Ratio de cadenas ligeras libres en suero normal.

Como novedad se incluye la citometría de flujo de 2-4 colores para la evaluación de la clonalidad en médula ósea.

A pesar de pequeñas actualizaciones con el objetivo de buscar nuevas definiciones de respuesta al tratamiento, que discrimine bien las diferentes categorías de respuesta, los criterios de IMWG del 2011, continúan estando vigentes.

En ellos la remisión completa estricta viene definida como la obtención de la tradicional remisión completa (inmunofijación en suero y orina negativa y <5% células plasmáticas en médula ósea) a la que se añade la obtención de un ratio de cadenas libres en suero normal y la ausencia de células plasmáticas clonales. Según estos criterios, la clonalidad de las células plasmáticas puede demostrarse por dos métodos:

- Inmunohistoquímica: la demostración de clonalidad se basa en el ratio k/l. Un ratio anormal refleja la presencia de un clon anormal, y esto es cuando el ratio k/l es >4:1 o <1:2 y su demostración requiere la evaluación de al menos 100 células plasmáticas.
- Citometría de flujo de baja resolución: realizada con 2-4 colores con una sensibilidad de 10-4.

Según los actuales criterios, para demostrar la ausencia de clonalidad de las células plasmáticas, se permite utilizar cualquiera de los dos métodos. De esta manera podemos clasificar a un paciente en respuesta completa estricta, si tras un conteo de 100 células plasmáticas en una biopsia de médula ósea no se demostrase clonalidad, y a otro de RC si tras analizar un millón de células por citometría de flujo no demostramos clonalidad.

Existen varios estudios que analizan las discrepancias en el porcentaje de células plasmáticas en el aspirado de médula ósea versus la biopsia de médula ósea. Todos estos estudios demuestran la superioridad de la inmunohistoquímica respecto a la citología y la citometría de flujo en el porcentaje de las células plasmáticas en médula ósea. Sin embargo, todos están realizados en el momento del diagnóstico de mieloma, donde la infiltración medular alcanza altos porcentajes, pero no hay ningún estudio que compare la concordancia entre la inmunohistoquímica y la citometría de flujo de baja resolución en la detección de clonalidad de células plasmáticas.

## 1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Como hemos repasado en los apartados previos, una rigurosa evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma múltiple es crucial para poder identificar aquellos pacientes que recaerán. La evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con mieloma múltiple actualmente se basa en los criterios del grupo internacional del mieloma publicados en 2011 (IMWG, 2011). En ellos la Respuesta Completa estricta requiere la ausencia de células plasmáticas clonales, demostradas por IHQ o por CMF.

La correlación en la detección de la plasmocitosis medular entre estas dos técnicas ha sido ampliamente estudiada por varios grupos, demostrando superioridad de la Inmunohistoquímica sobre la citometría de flujo en la cuantificación de células plasmáticas en el momento del diagnóstico de mieloma múltiple. Pero hasta la fecha no hay estudios que analicen la correlación entre las dos técnicas en la estimación de la plasmocitosis medular ni en la demostración de la clonalidad en la evaluación de la respuesta al tratamiento, en pacientes con inmunofijación negativa.

La citometría de flujo tiene una alta sensibilidad (10<sup>-4</sup>) con capacidad para identificar una célula patológica entre 10.000 células, no así la inmunohistoquímica tradicional.

## **OBJETIVOS**

---

## 2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El estudio de médula ósea es crucial para el diagnóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma. La biopsia de médula ósea, y en ella el estudio inmunohistoquímico ha constituido el estándar para demostrar clonalidad en médula.

Para obtener la remisión completa estricta es necesario ausencia de clonalidad demostrada por inmunohistoquímica o por citometría de flujo de 2-4 colores.

Nuestra hipótesis es que la citometría de flujo de baja resolución tiene mayor sensibilidad para detectar células plasmáticas clonales que la inmunohistoquímica, y por consiguiente la biopsia de médula ósea no es necesaria en la evaluación de la respuesta al tratamiento. En consecuencia, la ausencia de clonalidad detectada por IHQ no se relaciona con una mejor supervivencia global ni supervivencia libre de progresión, sí así cuando la clonalidad es demostrada por CMF de baja resolución.

## 2.2. OBJETIVOS

1. Analizar la correlación entre la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y la citología en la estimación de la plasmocitosis medular en pacientes con inmunofijación negativa en suero y orina.
2. Comparar la capacidad para detectar clonalidad entre la inmunohistoquímica y la citometría de flujo de baja resolución en pacientes con inmunofijación negativa en s/o.
3. Comparar la capacidad para detectar clonalidad de cadenas ligeras libres en suero en pacientes con inmunofijación negativa en s/o y mínima infiltración medular
4. Establecer un valor pronóstico relacionado con la capacidad de detectar clonalidad con cada una de las técnicas.

## **MATERIAL Y METODOS**

---

Se estudiaron todos aquellos pacientes con mieloma múltiple sintomático diagnosticados entre enero de 2000 y diciembre del 2014 en el Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid, España. Este hospital es un hospital terciario y de referencia para mieloma múltiple. De todos los pacientes diagnosticados en ese periodo de tiempo, se seleccionaron aquellos pacientes en los que, en la evaluación tras el tratamiento, se observó una ausencia de la proteína monoclonal en plasma/orina medida por electroforesis e inmunofijación, que tuviesen disponible aspirado y biopsia de médula ósea en la misma evaluación. Además de los pacientes diagnosticados en el propio hospital, se añadieron 10 pacientes diagnosticados en otros hospitales de los que se disponía de muestras que cumplían los requisitos (ausencia de proteína monoclonal y estudio de médula ósea con aspirado y biopsia de médula ósea simultánea):

- Cinco casos del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.
- Un caso del Hospital Infanta Cristina de Madrid.
- Un caso del hospital Clínico de Madrid.
- Un caso de la clínica Quirón de Madrid.
- Un caso de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.
- Un caso del Hospital Infanta Leonor.

Los cinco últimos pacientes habían sido remitidos a nuestro hospital para realizar un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. Se utilizaron las muestras de la evaluación de la respuesta transcurridos tres meses del trasplante.

Se estudiaron todas las muestras que cumplían el criterio de selección, admitiendo varias muestras de un mismo paciente. Se estudiaron un total de 91 muestras de 61 pacientes. Las muestras previas a 2011 se encontraban en el biobanco del hospital Doce de Octubre, las muestras posteriores se obtuvieron y procesaron según se indica en el punto 2 de este capítulo (2.1 Obtención y procesamiento de muestras). Los pacientes habían firmado un consentimiento cediendo el uso de las muestras y los datos clínicos para investigación. Los datos clínicos se encontraban en las historias clínicas de cada Hospital y fueron recopilados con motivo de este estudio.

### 3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES

De todos los pacientes analizados, se seleccionaron los 61 pacientes que cumplían el criterio de selección: pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple que obtuvieron inmunofijación negativa en sangre y orina tras el tratamiento que tenían disponible un estudio de médula ósea con aspirado y biopsia simultáneo en ese momento. Se estudiaron 36 mujeres y 25 hombres con edades comprendidas entre 37 y 79 años (mediana 63 años).

Se recogieron los siguientes datos al diagnóstico:

- International Staging System (ISS): 19 pacientes presentaron un ISS de 1, 19 pacientes un ISS de 2 y 18 un ISS de 3. En cinco pacientes no se disponía de estos datos al diagnóstico.
- Estadio Durie Salmon: 8 pacientes presentaban un estadio I (6 estadio A y 2 estadio B), 23 presentaron estadio II (20A y 3B) y 26 tenían estadio 3 (20A,6B).
- Tipo de Mieloma según la paraproteína: Tal y como está descrito en el mieloma, la paraproteína más frecuente fue la Inmunoglobulina IgG con 30 pacientes, 16 presentaban el isotipo IgA, y los 14 restantes correspondían a mieloma de cadenas ligeras: 6 cadenas ligeras kappa y 8 cadenas ligeras lambda. No se recogió ningún paciente con mieloma IgD ni IgM.
- Quimioterapia recibida. Debido a la heterogeneidad de la muestra, con pacientes diagnosticados entre 2000 y 2014, los tratamientos de inducción recibidos fueron bastante variados: 17 pacientes recibieron quimioterapia alternante (VBMCP/VBAP), 17 recibieron Velcade-Talidomida-dexametasona, 9 pacientes velcade-Dexametasona, 7 pacientes Velcade-Melfalan-Prednisona, y los 11 pacientes restantes recibieron otros esquemas de tratamiento diferentes a los expuestos, entre los que cabe destacar 8 pacientes que recibieron tratamiento con esquemas basados en Lenalidomida (4 lenalidomida-Dexametasona y 4 Lenalidomida en combinación con otros fármacos).

- Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos: 17 pacientes no recibieron trasplante tras la inducción, 44 recibieron un primer trasplante, 9 recibieron un segundo trasplante y una paciente recibió trasplante alogénico.
- Terapia de mantenimiento: 43 pacientes recibieron terapia de mantenimiento. La mayoría recibió Lenalidomida sola, o en combinación con Dexametasona (29 pacientes), 2 pacientes recibieron interferón-Prednisona, 6 recibieron terapias de mantenimiento basadas en esquemas con velcade y 2 pacientes recibieron mantenimiento con Talidomida.
- Progresión: 22 pacientes (36%) progresaron tras el tratamiento, con una mediana de seguimiento de 56 meses (rango 11-207 meses) y 10 pacientes fallecieron (17%).

Características de los pacientes	
	Valor
<b>Mediana de Edad en años (rango)</b>	63 años (37-79)
<b>Sexo (hombre/mujer)</b>	36/35
<b>Tipo de paraproteína (%)</b>	
IgG	50%
IgA	27%
Cadenas Ligeras	23%
<b>Tipo de cadena ligera (%)</b>	
Kappa	42%
Lambda	57%
<b>Estadio ISS al diagnóstico (%)</b>	
I	34%
II	34%
III	32%
<b>Estadio Durie Salmon (%)</b>	
I	14%
II	40%
III	46%

**Tabla 3.1.** Características clínicas de los pacientes al diagnóstico

Datos de laboratorio	
	Valor (%)
<b>Quimioterapia de inducción</b>	
VBMCP/VBAP	28
VTD	28
VD	25
VMP	11
Otros	18
<b>TASPE</b>	
No	28
1	56
2	15
<b>Mantenimiento</b>	
No	30
Lenalidomina	47
Interferon + Prednisona	10
Velcade	10
Talidomida	3

**Tabla 3.2.** Tratamiento recibido

Datos de laboratorio	
	Valor (%)
Hemoglobina (g/dl)	10,75(5,4-14,9)
Creatinina (mg/dl)	1,05(0,20-7,73)
Albúmina (g/dl)	3,7(1,85-5,1)
Calcio (mg/dl)	9,7(8-14,2)
Beta2microglobulina (mg/dl)	3,6(0,35-32,9)

**Tabla 3.3.** Datos de laboratorio al diagnóstico

### 3.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

Se obtuvieron un total de 92 muestras de médula ósea de los 61 pacientes estudiados:

- 31 pacientes se les realizó un único estudio
- 23 pacientes tenían 2 estudios de médula ósea
- 7 pacientes tenían 3 estudios de médula en diferentes momentos de su evolución.

De las 92 médulas, 8 no disponían de estudio citológico (en cinco casos los aspirados se realizaron en otro centro donde no se obtuvo muestra para citología, y 3 casos el material no fue óptimo para su valoración morfológica). No disponían de material suficiente para realizar estudio histológico con inmunohistoquímica 6 biopsias. Únicamente 31 muestras tenían disponibles estudios moleculares: en 15 muestras no se detectó pico monoclonal al diagnóstico por lo que no se pudo analizar en el seguimiento, y las 45 restantes no disponían del resultado.

Todas las médulas estudiadas tenían disponible estudio de CMF. Se analizó el número de células plasmáticas normales, el número de células plasmáticas patológicas sobre el total de células nucleadas, y el cociente célula plasmática normal/célula plasmática patológica (CPN/PPP). El número total de eventos adquiridos fue de 1 a 2 millones de células. La enfermedad mínima residual se expresó como porcentaje de células plasmáticas patológicas sobre las células totales adquiridas. Se definió enfermedad mínima residual negativa cuando se detectaron menos de 20 células plasmáticas clonales con una sensibilidad de  $10^{-4}$ .

### Momento de la médula ósea

Nuestro criterio de selección de las muestras fue analizar aquellos pacientes con diagnóstico de mieloma que tras el tratamiento obtuvieran ausencia de componente monoclonal medido por electroforesis e inmunofijación, que dispusiesen de estudio de médula. Es decir, se seleccionaron a los pacientes en función de la respuesta al tratamiento y la disponibilidad de las muestras. Por este motivo, observamos una amplia heterogeneidad en nuestra serie respecto al momento en que se realizó el estudio de MO:

- 23 muestras (25%) eran evaluaciones tras el tratamiento de inducción: 11 en pacientes candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos y 12 en pacientes no candidatos.
- 20 (22%) se realizaron tras el TASPE
- 43 (47%) se realizaron como evaluación tras finalizar el mantenimiento.
- 5 (6%) eran médulas de pacientes en segunda remisión.

## 3.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

### 3.3.1. ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA

La punción medular se realizó aprovechando estudios de evaluación de la respuesta que el paciente tenía planificados de rutina. Es decir, no se realizaron punciones con el único objetivo de este estudio. La punción-aspiración se efectuó con un trocar de 11G de diámetro o una aguja de punción lumbar pediátrica de 20G. Las médulas realizadas antes de enero 2011 y las realizadas en otros centros se obtuvieron con trocar, y las posteriores a enero de 2011 realizadas en nuestro centro se realizaron con aguja de 20G. Se anestesió la piel, el tejido celular subcutáneo y el periostio 10 ml de mepivacaína al 2%. Tras penetrar la tabla externa ósea con el trocar/aguja introduciéndolo unos milímetros en la zona medular, se separó el fiador y, tras adaptar correctamente la jeringa aspiradora, se extrajeron 3ml de sangre medular. Estos fueron repartidos para los diferentes estudios

- 1ml en tubo de heparina de litio para su estudio por CMF
- 1ml en tubo de EDTA para su estudio por PCR fluorescente
- 1ml para estudio por citología y formación de coágulo para histología.

### 3.3.2. BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA

Inmediatamente después de la obtención del aspirado de médula ósea se realizó la biopsia. Las biopsias de médula ósea se obtuvieron por punción en cresta iliaca posterosuperior derecha o izquierda. Tras adoptar las oportunas medidas de esterilidad se atravesó con un trocar de 11G la piel y el tejido celular subcutáneo, apoyándolo sobre la cortical. Tras atravesar el periostio se retiró el mandril de punta punzante y se continuó la penetración unos 4 cm. En este momento se introdujo el fiador que capturó la muestra y se retiró el trocar.<sup>50</sup>

### 3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

#### 3.4.1. MUESTRA PARA ESTUDIO CITOLÓGICO

##### Extensión de la Médula

La cantidad de médula destinada para estudio morfológico se depositó sobre cristales para facilitar la obtención de los grumos medulares. Los frotis medulares se realizaron extendiendo los grumos y evitando la recogida de sangre medular, cuya presencia podía interferir en el recuento celular. Los frotis medulares se confeccionaron sin adición de anticoagulante para evitar la distorsión celular. Tras el secado rápido de las muestras, tres frotis se tiñeron con tinción panóptica: tinción de Wright para muestras anteriores al año 2011, y tinción de May-Grünwald Giemsa para muestras posteriores.

Los grumos medulares que no se utilizaron para la confección de los frotis, se agruparon formando un grumo de gran tamaño o coágulo para su posterior inclusión en bloques de parafina y procesamiento como pieza histológica.

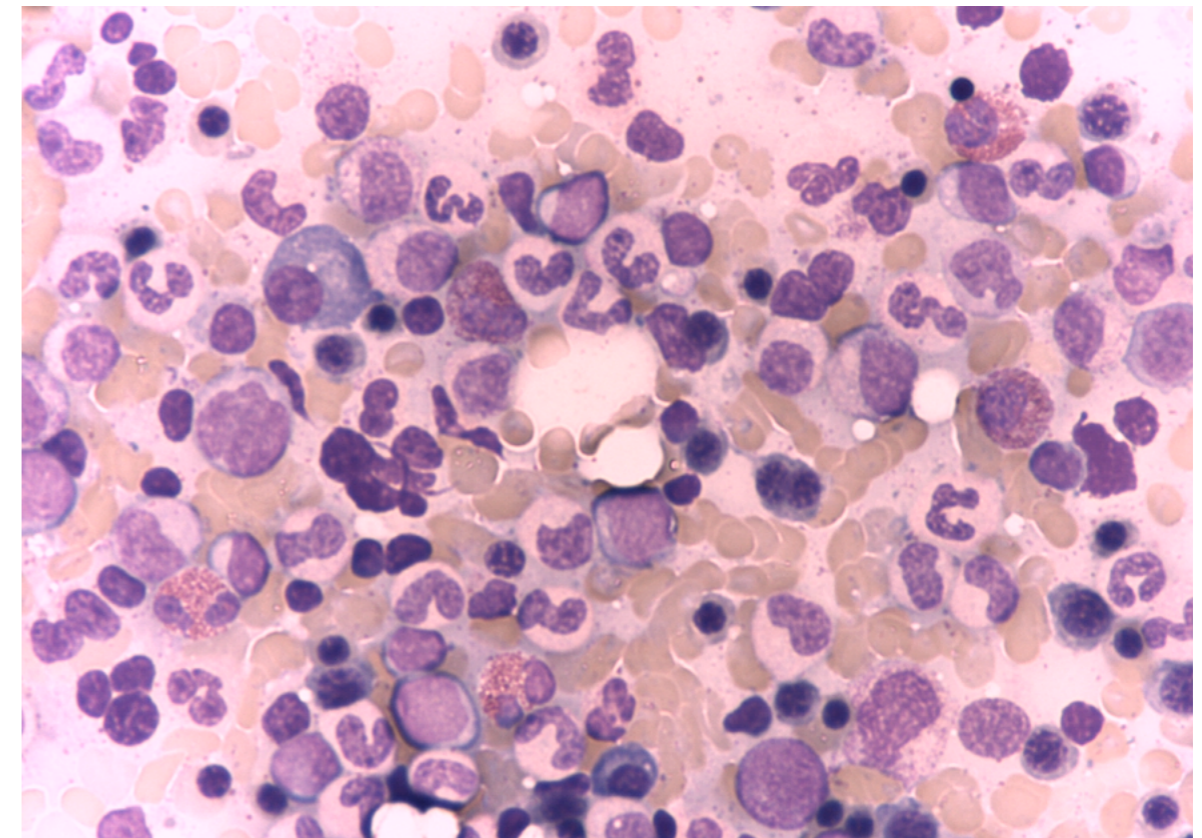
##### Tinciones medulares

##### Tinción de Wright

Se colocaron los frotis secados al aire sobre una rejilla o cubeta de tinción con la sangre medular hacia arriba. Se cubrió completamente el portaobjetos o cubreobjetos con el colorante de Wright gota a gota. Se dejó que permaneciese en el frotis aproximadamente 5 minutos para fijar las células de la médula. El colorante cubría completamente el portaobjetos. Pasados los 4 minutos se agregó directamente al colorante un volumen igual de amortiguador de Wright o agua destilada para evitar la coloración débil. Se esperó la formación de brillo metálico. Se dejó actuar 10 minutos. Posteriormente se lavó con agua en el grifo cuidadosamente hasta que la extensión presentó un aspecto rosado al examinarlo a simple vista. Se limpió el dorso del portaobjetos con una gasa o algodón humedecido en alcohol para eliminar cualquier resto de colorante. Las muestras se dejaron secar al aire.

##### Tinción de May-Grünwald Giemsa

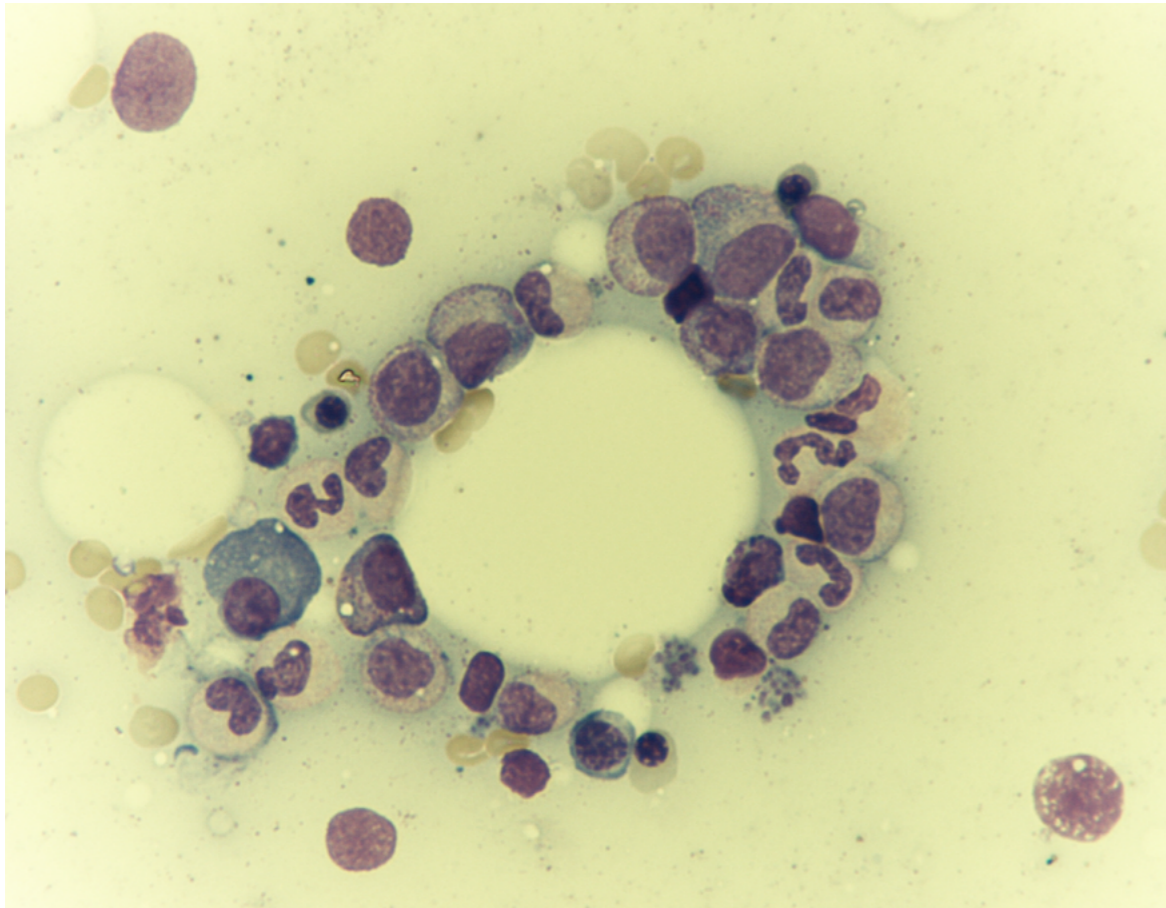
Se fijaron los frotis en el porta sumergiéndolos en solución metanólica de May-Grünwald o metanol durante 5 o 6 minutos. Una vez fijadas las extensiones se transfirieron a la primera cubeta con una dilución de May-Grünwald en proporción 1:1 en agua destilada o solución tampón Giemsa que previamente habremos preparado. Se dejaron en esta solución durante 5-6 minutos. Pasado este tiempo, sin lavar, se sumergieron los frotis una segunda cubeta donde se encontraba la solución de Giemsa igualmente diluido con tampón Giemsa 9:1. Se dejó actuar durante 20 minutos. Finalizado el tiempo se lavaron los frotis con abundante agua destilada y se dejaron secar al aire libre.



**Figura 3.1.** Aspirado de médula ósea con escasa infiltración por células plasmáticas.

### Análisis de la muestra

Los frotis medulares se examinaron inicialmente con el objetivo de pocos aumentos (x20) para estudiar la celularidad medular global. Seguidamente se utilizó el objetivo de inmersión (x1000) con el que, en una zona correctamente extendida, se efectuó el recuento porcentual de los elementos de las diferentes líneas hematopoyéticas. Se valoró cuidadosamente la morfología de las células plasmáticas. El recuento diferencial celular se realizó sobre un total de 500 células.<sup>51</sup>



**Figura 3.2.** Aspirado de médula ósea en el que se observa una célula plasmática.

### 3.4.2. MUESTRA PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

#### Procesamiento de las muestras

Para la detección de antígenos de membrana se utilizaron muestras de médula ósea anticoagulada con EDTA o heparina de Litio, procesada tan pronto como fuese posible dentro de las primeras 24 horas de la extracción. La muestra se diluyó con PBS y se pasó a través de aguja fina varias veces para deshacer los grumos. Se realizó un recuento celular y se diluyó con PBS (mezclando por inversión varias veces) para obtener una concentración final de  $10^6$  células nucleadas/ ml (10.000/  $\mu$ l).

#### Marcación de antígenos de superficie

Se dispensaron en cada tubo los anticuerpos monoclonales en cantidad apropiada a su titulación:

FITC	PE	PerCP o PeCyC	APC
10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Se dispensaron 100  $\mu$ l de aspirado medular en cada tubo. Se Incubó 15 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura y se añadieron 2 ml de solución lisante (Lysing BD). Se incubaron las muestras 10 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura y posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 2.500 r.p.m. El sobrenadante (las células están fijadas en el fondo del tubo) se decantó y se resuspendió el poso celular con ayuda del Vortex. Se añadieron 2 ml de PBS, y se agitó nuevamente en Vortex. Nuevamente se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 2.500 r.p.m y se decantó el sobrenadante y resuspendió el poso celular con 250  $\mu$ l de PBS. Por último, se adquirió por el citómetro.

### Marcación de antígenos de membrana y citoplasmáticos

En un tubo de ensayo se añadió la cantidad apropiada de cada anticuerpo monoclonal de superficie junto con 100 µl de la muestra y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. Pasado este tiempo se añadieron 2 ml de PBS, y se agitó con Vortex. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 2.500 r.p.m, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el poso celular con ayuda del Vortex. Posteriormente se añadió 100 µl de Solución A de Fix & Perm y se mezcló en Vortex. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, en cámara oscura. Se añadió 2 ml de PBS, se homogeneizó y se centrifugó de nuevo a 2.500 r.p.m durante 5 minutos. Una vez más se decantó el sobrenadante y resuspendió el poso celular. Se añadió 100 µl de solución B de Fix & Perm y el anticuerpo monoclonal seleccionado para marcar el antígeno citoplásmico. Se incubó 15 minutos en cámara oscura a temperatura ambiente y se añadió 2 ml de PBS, se homogeneizó en Vortex y centrifugó durante 5 minutos a 2.500 r.p.m. Se decantó el sobrenadante y resuspendió el poso celular en Vortex. Por último, se añadió 250 µl de PBS y se adquirió en el citómetro.

### Análisis de la muestra

Se siguieron las recomendaciones del European Myeloma Net (EMN) y Euroflow.<sup>52,53</sup> La adquisición de datos se realizó con dos citómetros de flujo: FACScalibur y FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, BDB, San Jose, CA, USA). Se utilizó el software FACSDiva 6.1 (BDB). Para el análisis de datos se utilizaron los programas Paint-a-Gate (BDB) e Infinicyt (Cytognos SL, Salamanca, Spain). Se realizó un “gating” inicial para identificar las células plasmáticas y discriminarlas de otras células hematopoyéticas con la intención de incluir el mayor número de eventos de células plasmáticas posible, para permitir incluir variantes con expresión baja de CD38, CD45 y/o CD138.<sup>54</sup> La EMN establece utilizar un mínimo de cinco parámetros (CD38, CD138, CD45, y características de FSC y SSC) en el mismo tubo para la identificación de la población total de células plasmáticas, ya que maximiza la inclusión de células plasmáticas normales y patológicas mientras que permite eliminar eventos contaminantes.<sup>55</sup> En nuestro caso se utilizó una combinación de 4 antígenos en la mayoría de las muestras (CD38, CD56, CD45, CD19), y en 6 pacientes (incluidos en ensayo clínico del Grupo español del mieloma) se utilizaron 8 antígenos de membrana (CD38, CD56, CD45, CD19, CD117, CD81, CD138, CD27) y dos antígenos intracitoplasmáticos (Cylgk y Cylgl) combinados en dos tubos. Esto permitió la correcta identificación de células plasmáticas normales y patológicas.<sup>56</sup> Las combinaciones de antígenos se muestran a continuación:

#### • Combinación en 1 tubo

FITC	PE	Percp-Cy5.5	APC
CD38	CD56	CD45	CD19

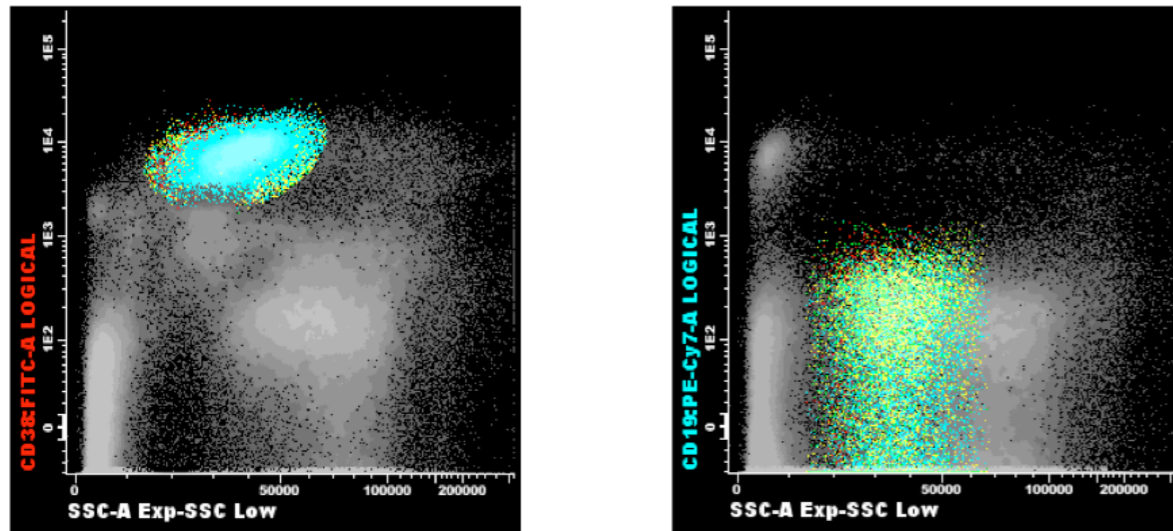
#### • Combinación en 2 tubos

FITC	PE	Percp-Cy5.5	Per-Cy7	APC	APC-H7	PacBlue	Pac Orange
CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CD138	CD27

FITC	PE	Percp-Cy5.5	Per-Cy7	APC	APC-H7	PacBlue	Pac Orange
CD38	CD56	CD45	CD19	Kappa	Lambda	CD138	CD27

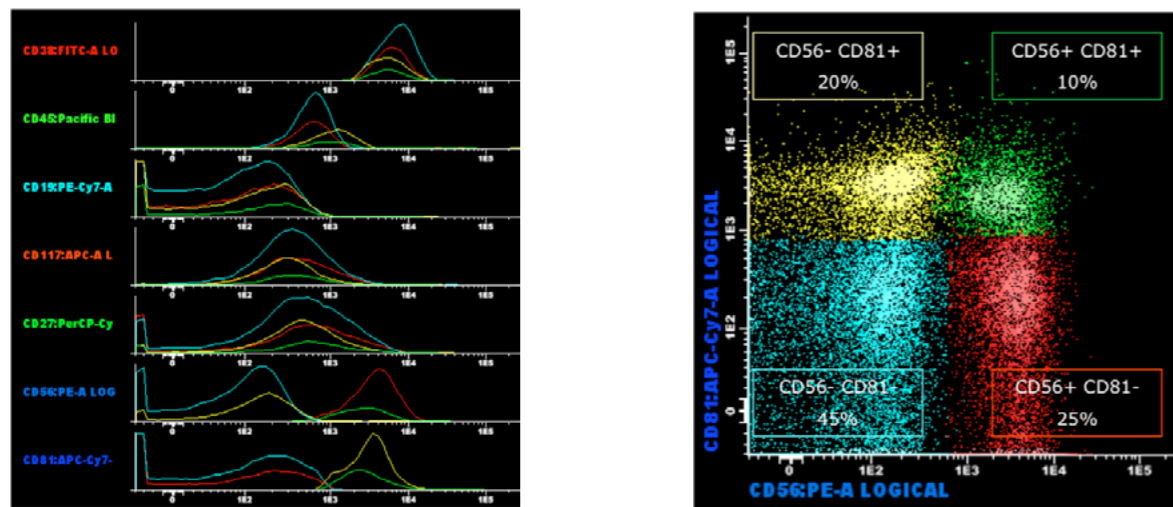
Al analizar la muestra se buscaron las dos poblaciones diferenciadas según la presencia o ausencia de los antígenos marcados, así como la intensidad de expresión de los mismos. Se identificó como células plasmáticas normales aquellas cuyo inmunofenotipo era CD38 +bright, CD138+bright, CD19+, CD45+, CD27+, CD56-, CD81+, CD117-, con un ratio Kappa:lambda policlonal<sup>57</sup>. Dado que un pequeño subgrupo de células plasmáticas normales (<30% del total de las CP normales) presentan un patrón de expresión antigénica menos típico que el anterior (CD19-, CD45-/low, CD20+, CD56+), también se consideraron células plasmáticas normales a esta población. Aquellas células plasmáticas que expresaron CD38 low, CD19+, CD45-, CD56+/bright, CD81-/low, CD117+, junto con monoclonalidad en kappa y lambda citoplasmático se consideraron células plasmáticas patológicas.

Se adquirieron 2 millones de eventos. Los informes se realizaron según las recomendaciones internacionales del Euroflow<sup>58,59</sup>. Se informó el número total de eventos, el número total de células plasmáticas normales y patológicas, y se calculó el ratio célula plasmática normal/célula plasmática patológica (CPN/PPP). La enfermedad mínima residual se expresó como porcentaje de células plasmáticas patológicas sobre las células totales adquiridas. Se definió enfermedad mínima residual negativa cuando se detectaron menos de 20 células plasmáticas clonales con una sensibilidad de 10<sup>-4</sup>/0.01% (sensibilidad de la citometría de baja resolución).<sup>60</sup>



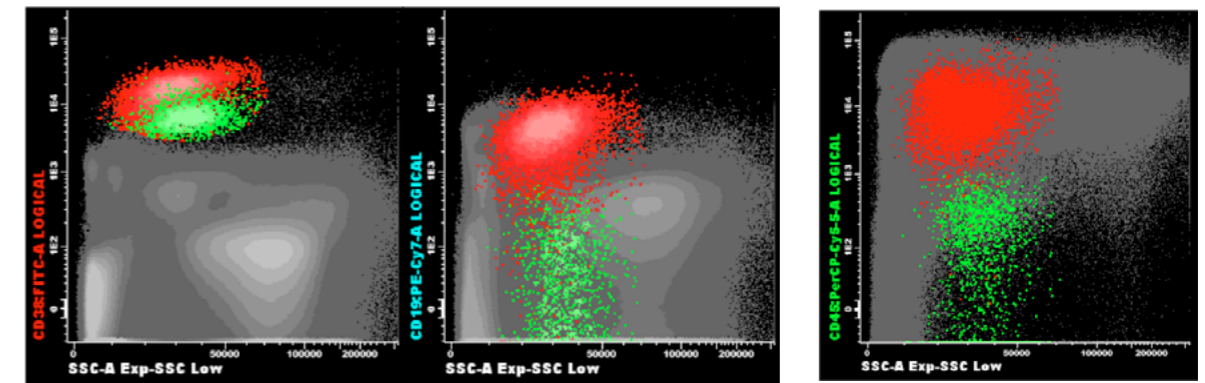
**Figura 3.3.** Citometría de médula ósea al diagnóstico de Mieloma.

A. SSC/CD38 ventana donde se adquieren las células hematopoyéticas y se detectan las células plasmáticas según la positividad y alta intensidad para CD38. B. SSC/CD19. Se observa una relación de CPN/ CPP 0/100: todas las células plasmáticas presentan pérdida de CD19, característico de las células plasmáticas patológicas. No se observan células CD19+.



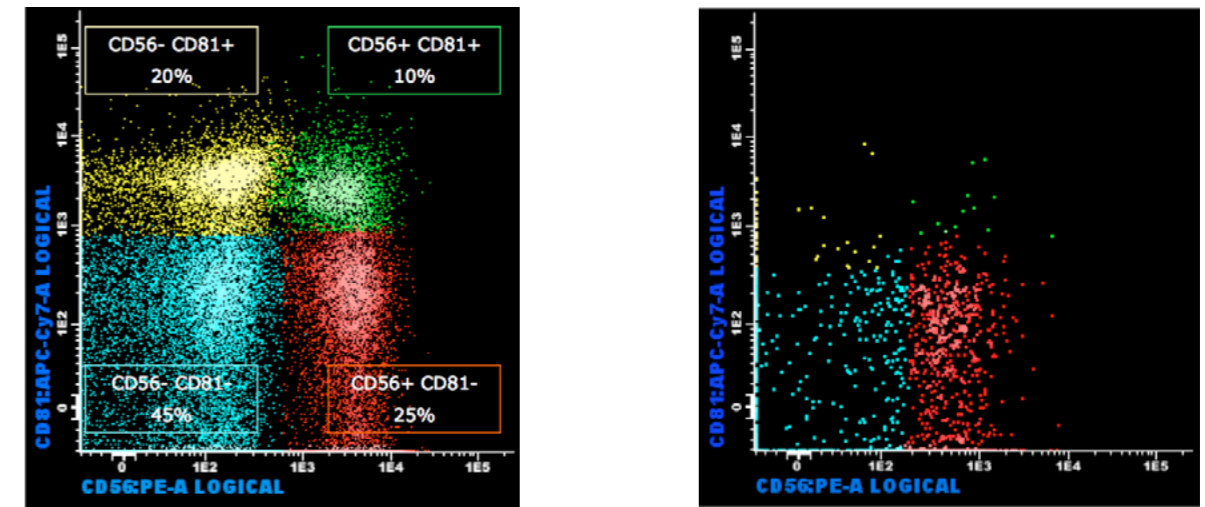
**Figura 3.4.** Diagnóstico de mieloma por CMF.

Según la expresión de los antígenos, se observan 4 poblaciones diferentes de células plasmáticas con fenotipos aberrantes. Estas poblaciones son las que buscaremos en la médula ósea tras el tratamiento.



**Figura 3.5.** Poblaciones de células plasmáticas normales y patológicas.

A. En la ventana SSC/CD38 se identifican las células plasmáticas, en rojo CPN, en verde CPP. B. SSC/CD19 detectamos las células plasmáticas patológicas que se caracterizan por pérdida de CD19 (células verdes). Podemos calcular la relación CPN/ CPP=84/16. C. Cálculo del número de células plasmáticas patológicas sobre el número de células nucleadas totales. EMR=0.047%



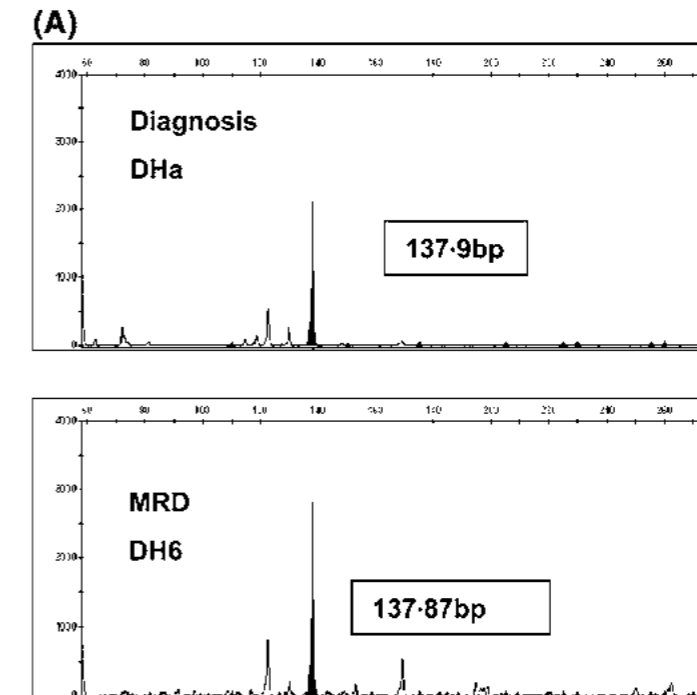
**Figura 3.6.** Detección de células plasmáticas clonales residuales (EMR) por CMF.

A. Médula ósea al diagnóstico donde se identifican cuatro poblaciones diferentes de células plasmáticas. B. Médula ósea tras el tratamiento. Se observa la persistencia de células plasmáticas con fenotipo aberrante.

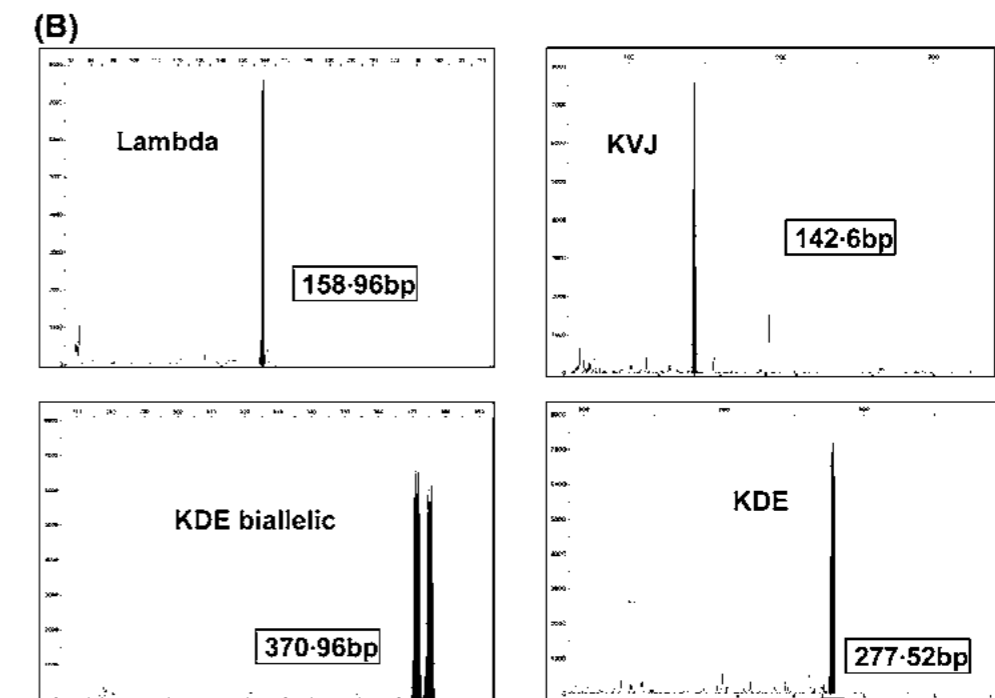
### 3.4.3. MUESTRAS PARA ESTUDIOS MOLECULARES

Se extrajeron 500 microlitros de DNA de alto peso molecular de 1-2 ml del aspirado de médula ósea mediante extracción automática utilizando la tecnología de bolas magnéticas (hemos tenido diferentes métodos a lo largo del tiempo, no solo magnapure). Las muestras de los pacientes se tomaron al diagnóstico y en el momento de la evaluación de la respuesta. La identificación de la población clonal se realizó según las recomendaciones del grupo BIOMED II<sup>61</sup> con pequeñas modificaciones.<sup>28</sup> Se utilizaron tres PCRs multiplex diferentes: reordenamientos de IGH D-J, KV-J (reordenamiento de la cadena ligera kappa), KDE (kappa deleting element). Para la reacción de la PCR se utilizaron las siguientes condiciones: 50-100 ng de DNA genómico, 10 pmol de cada primer, 0.8 mmol/l de MgCl<sub>2</sub> y 1mmol/l de la mezcla que contiene la Taq polimerasa (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). El primer fue marcado con el fluorescente 6-Carboxyfluorescein(6-FAM). La identificación de la población clonal se realizó por análisis de fragmentos (genescan) en un secuenciador ABI PRISM 3100 Avant, aplicando el Software GENEMAPPER 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Una población clonal se definió por la presencia de un único pico o una población predominante. Una señal se consideró positiva si el fluorescente tenía una absorbancia de al menos 250 unidades o era 2.5 veces mayor que el fondo policlonal. Respecto a los reordenamientos de DHJ, la familia DH se identificó por el tamaño de pico al diagnóstico. Para la evaluación de la enfermedad mínima residual se utilizó solo el primer específico de la familia DH reordenada. Para los reordenamientos de las cadenas ligeras, los primers y las condiciones de la PCR eran exactas que al diagnóstico.

Aquellos pacientes que presentaban un pico monoclonal al diagnóstico, que obtuvieron respuesta molecular durante el seguimiento fueron considerados F-PCR negativos, mientras que aquellos que no alcanzaron repuesta molecular se consideraron F-PCR positivos. La sensibilidad de la técnica se calculó que era de 10<sup>-3</sup>.



**Figura 3.7.** PCR fluorescente en la evaluación de la respuesta al tratamiento. Ejemplo de un reordenamiento incompleto de IgH. La magnitud del pico al diagnóstico en la PCR (Primer DHa) indica que la familia reordenada es DH6. Este primer es el que se utiliza en la evaluación de la respuesta.<sup>62</sup>



**Figura 3.8.** Ejemplos de reordenamientos de cadenas ligeras: lambda, kappa V-J y KDE.

### 3.4.4. HISTOLOGÍA

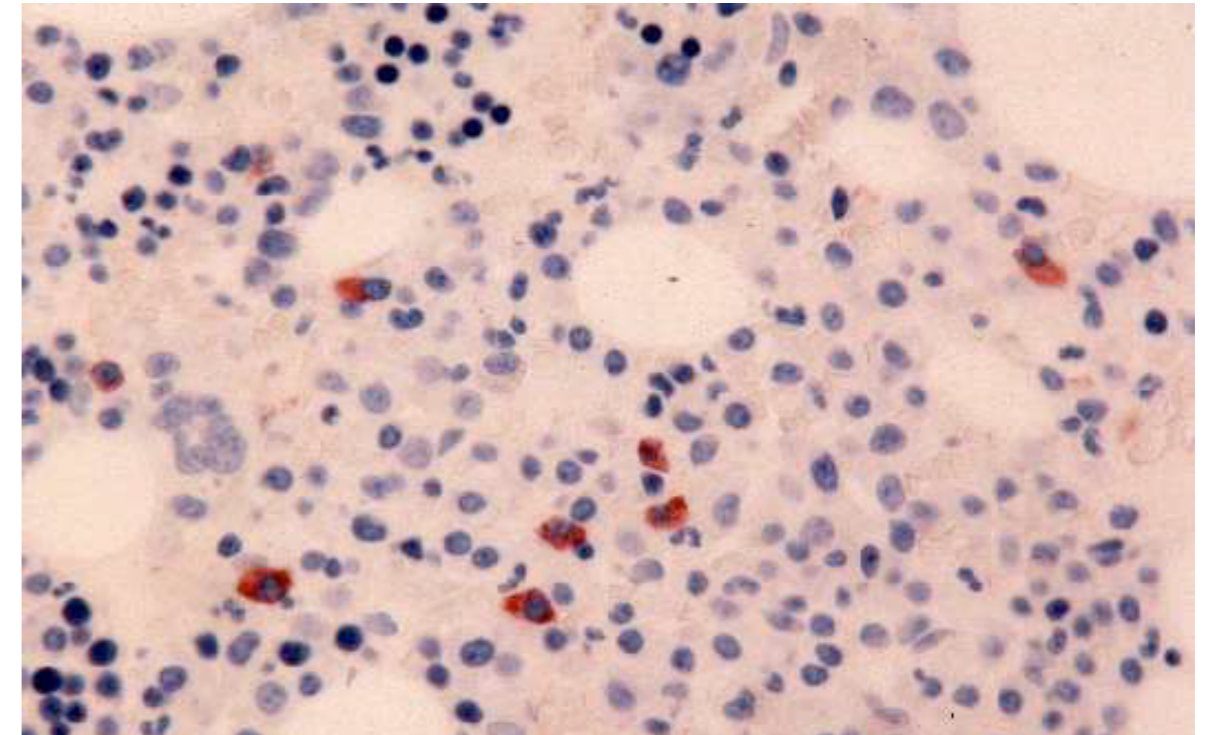
Se enviaron dos muestras diferentes para la realización de estudios histológicos: el coágulo del aspirado medular y un cilindro de al menos 2cms obtenido con un trocar de 11G. El cilindro se envió en metanol, y el coágulo en una solución de metanol y formaldehído.

#### Procesamiento de muestras

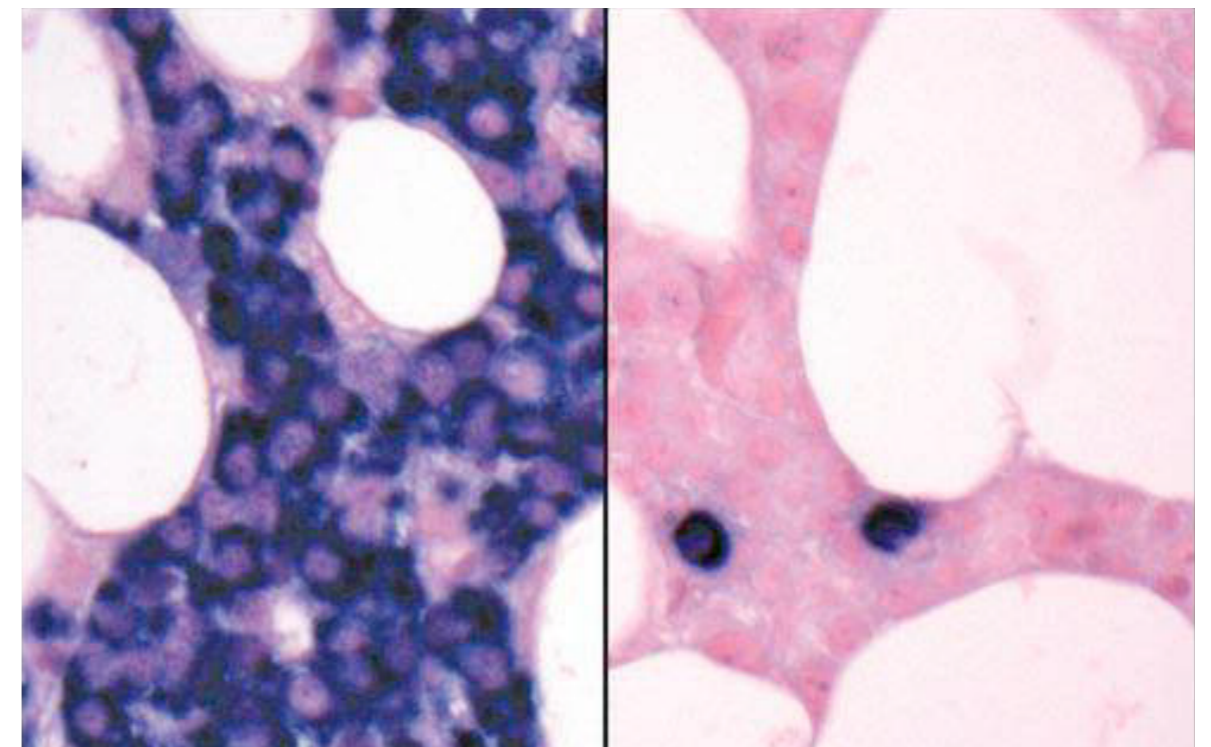
El coágulo se fijó durante 2 horas en fijador B563 y se postfijó en formaldehído tamponado al 4% durante 20-24 horas. El cilindro óseo se fijó durante 4 horas en formaldehído tamponado, se descalcificó (Histofix.Decalcifier 1. Panreac AppliedChem Darmstad, Germany) durante 4 horas y se continuó la fijación, de nuevo en formaldehído, durante 12-18 horas. Una vez fijadas, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en xilol y se incluyeron en parafina según técnica estándar.<sup>64</sup>

Una vez terminado el procesamiento de muestras, se realizaron cortes seriados de 3-6 micras de espesor que se tiñeron con hematoxilina-eosina; en los coágulos se practicaron rutinariamente técnicas de Perls. Cuando se consideró necesario se practicaron técnicas de Masson, PAS y reticulina.<sup>65</sup>

Para la identificación de las células plasmáticas se practicaron técnicas de inmunohistoquímica con sueros anti CD138<sup>66,67</sup> (clon MI15, 1/50), (Dako Diagnostics Glostrup Denmark), cadenas ligeras kappa (policlonal, prediluido) (Dako Diagnostics Glostrup Denmark) y lambda (policlonal, prediluido) (Dako Diagnostics Glostrup Denmark). Las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron en un Leica Bond-III Stainer (Leica Biosystems, Newcastle, UK) y con el Leica Bond Polymer Refine Kit.



**Figura 3.9.** Tinción CD138 para identificar células plasmáticas.<sup>68</sup>



**Figura 3.10.** Tinción para cadenas ligeras kappa-lambda<sup>2</sup>.

### 3.5. PARÁMETROS ANALIZADOS

#### Estimación de la plasmocitosis medular

Se realizó una aproximación de la plasmocitosis medular total por tres técnicas diferentes: citología, CMF e IHQ.

- El estudio citológico con microscopía óptica cuantificó el porcentaje de CP tras analizar un mínimo de 500 células hematopoyéticas. El resultado se expresó como porcentaje de células plasmáticas sobre células nucleadas. La morfología no diferenció entre células plasmáticas normales y patológicas.
- Para estudio histológico se marcaron las células con CD138 para la cuantificación de las CP. Se calculó la media entre dos contajes de 100 células medulares realizados por dos observadores diferentes. La plasmocitosis medular se expresó como porcentaje de células plasmáticas sobre células medulares totales.
- Para la CMF, tras marcar las células con los antígenos correspondientes, se obtuvo el número total de células plasmáticas (normales y patológicas) en la ventana SSC/CD38.

#### Estudio de clonalidad

La presencia o ausencia de clonalidad fue valorada por técnicas moleculares, por citometría de flujo de baja resolución, y por inmunohistoquímica.

- La PCR fluorescente se consideró positiva si mostraba el mismo pico clonal que ese paciente presentaba al diagnóstico, y negativo si había ausencia de pico clonal. Se descartaron todos aquellos pacientes donde no se demostró pico al diagnóstico, o de los que no se disponía de dicho estudio.
- Por citometría de flujo se definió ausencia de clonalidad como <20 células plasmáticas patológicas (con inmunofenotipo aberrante) con una sensibilidad de  $10^{-4}$ .
- En el estudio inmunohistoquímico se analizaron 200 células plasmáticas discriminando aquellas que marcaban cadena kappa o lambda, y esto se expresó como ratio *kappa/lambda*. Un ratio *kappa/lambda* <1:2 o >4:1 se consideró patológico (presencia de clonalidad).

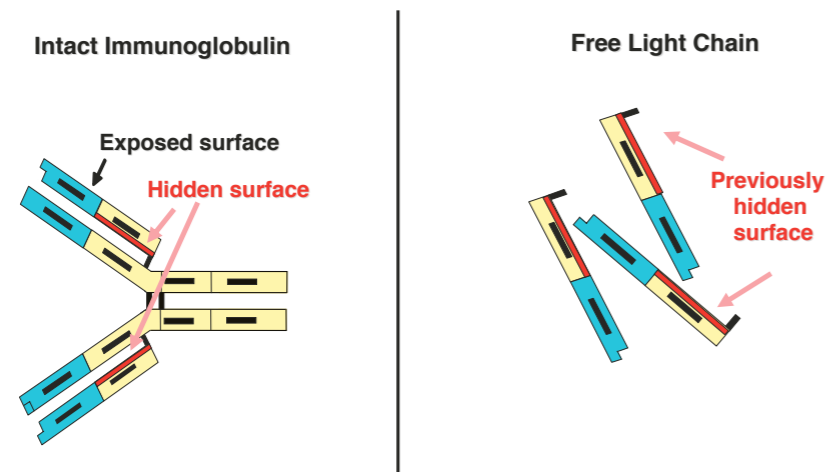
#### Presencia de bandas oligoclonales

Aunque no era objeto directo del presente estudio, recogimos la presencia o ausencia de bandas oligoclonales en el momento de realización de la médula. Se disponía de resultados de 87 muestras; en 4 muestras no se realizó dicho estudio. En el momento de evaluación de la respuesta, 57 pacientes presentaban bandas oligoclonales, en 29 no se observaban las BO.

#### Cadenas ligeras libres en suero

El análisis de las cadenas libres en suero se realizó mediante el test FREELITE (the Binding Site Ltd., Birmingham, UK), que consiste en un reactivo comercial compuesto por un set de anticuerpos policlonales y se realiza mediante inmunonefelometría.<sup>69</sup> Los anticuerpos policlonales reaccionan solo con los aquellos epitopos que están ocultos cuando las cadenas ligeras están unidas a cadenas pesadas, y únicamente disponibles cuando las cadenas ligeras están libres en suero (figura 3.11).

El análisis consiste en dos medidas separadas: una medición cuantitativa de las cadenas libres  $\kappa$  y otra de las cadenas  $\lambda$ . Consideramos valores normales de cadenas libres  $\kappa$  los comprendidos entre 3.3-19,4 mg/dl, y para cadenas libres  $\lambda$  5,7-26,3mg/dl. Se calculó el ratio k/l. Valores comprendidos entre 0,26 y 1,65 fueron considerados como normales. Aquellos pacientes con ratios mayores de 1,65 presentaban exceso de cadena libre  $\kappa$ ; valores menores de 0,26 tenían exceso de cadena libre  $\lambda$ .<sup>70</sup>



**Figura 3.11.** Análisis de cadenas ligeras libres en suero.

A Muestra la localización del epítipo de la cadena ligera oculto en la Inmunoglobulina intacta.

B Muestra la localización del mismo epítipo cuando la cadena ligera está libre en suero.

### Supervivencia y progresión

Tiempo hasta la progresión y supervivencia global. Se definió tiempo hasta la progresión el tiempo desde el momento del estudio de la médula ósea hasta la documentación de la progresión o último seguimiento. La supervivencia global se definió como tiempo desde inicio de tratamiento hasta el fallecimiento del paciente.

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se incluyeron en una base de datos de Excell (Microsoft Corporation). El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA) SPSS para windows versión v.23.0.

#### Variables

Los objetivos primarios del estudio fueron analizar la correlación entre la citología, la IHQ y la CMF en la estimación de la plasmocitosis medular y comparar la capacidad de la IHQ y la CMF para detectar clonalidad en la evaluación de la respuesta al tratamiento del mieloma. Las variables utilizadas fueron:

- Porcentaje de células plasmáticas totales o plasmocitosis medular.
- Presencia o ausencia de clonalidad estimada por las diferentes técnicas.
- Remisión completa definida como <5% de células plasmáticas en médula ósea.

El objetivo secundario era establecer el valor pronóstico de cada técnica. El tiempo hasta la progresión se midió desde el momento de evaluar la enfermedad residual en la médula ósea hasta la fecha de progresión o última visita. Y la supervivencia global desde el inicio de tratamiento hasta el fallecimiento del paciente.

#### Comparación entre pruebas

Se realizó un análisis descriptivo utilizando tablas cruzadas para el análisis de los datos. La correlación entre los resultados de la plasmocitosis medular entre la CMF, la IHQ y la citología se estableció mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

El grado de concordancia entre las diferentes técnicas en la estimación de la clonalidad se estableció mediante la índice kappa de Cohen.

#### Análisis de supervivencia

El cálculo de las curvas de supervivencia en los análisis univariantes se realizó con las curvas de Kaplan Meier. El test log-rango fue usado para establecer la significación estadística de la diferencia de probabilidades entre los grupos.

## **RESULTADOS**

---

#### 4.1. EVALUACIÓN DE LA PLASMOCITOSIS MEDULAR

Analizamos 92 muestras de médula ósea. El porcentaje de infiltración medular estimado por IHQ estaba disponible en 86 muestras, para estudio morfológico por citología óptica en 84 muestras, y 92 muestras disponían de estudio inmunofenotípico. La plasmocitosis medular se definió como número de células plasmáticas sobre el total de células hematopoyéticas. Por lo tanto, se contabilizaron células plasmáticas normales y CP patológicas. El resultado se expresó en porcentaje sobre células nucleadas totales. Para el estudio inmunohistoquímico se marcaron las células plasmáticas con CD138. La tabla 4.1 muestra la media de infiltración medular obtenida por las diferentes técnicas estudiadas. La citometría de flujo detectó los menores valores de infiltración con valores medios de 0,448 (rango 0- 2,94); la citología cuantificó valores intermedios entre la CMF y la IHQ, con una media de 2,76% (rango de 0 a 14%); los mayores porcentajes de infiltración medular fueron los obtenidos por técnicas inmunohistoquímicas con una media de 3,97% (rango de 1 a 11%).

Plasmocitosis medular (%)			
	Media	Mediana	Rango
Citometria de Flujo	0,448	0,295	0-2,94
Citología	2,76	2	0,14
Inmunoestoquímica	3,97	3,5	0,11

**Tabla 4.1.** Porcentajes de infiltración medular.

Mediante un análisis de regresión de Pearson se estudió el grado de correlación entre las diferentes técnicas. No se observó correlación entre los porcentajes establecidos por citología e histología (0,270), ni entre citometría de flujo e histología (0,412). Únicamente se observó una baja correlación entre la citología y citometría (0,568). Todo ello con una significación estadística ( $p= 0,05$  y  $0,01$  respectivamente). La tabla 4.2 muestra las correlaciones obtenidas por las diferentes técnicas. La figura 4.1 muestra los histogramas de frecuencias. Las figura 4.2 muestran los diagramas de dispersión de los valores analizados por CMF-citología y CMF-IHQ.

Correlaciones entre IHQ , Citología y CMF				
		Hislogía	Citología	Citometría
Histología	Coefficiente de correlación	1	0,270*	0,412**
	N	86	79	86
Citología	Coefficiente de correlación	0,270*	1	0,568**
	N	79	84	84
Citometría	Coefficiente de correlación	0,412**	0,568**	1
	N	86	84	92

\* La correlación es significativa en el nivel 0,05

\*\* La correlación es significativa en el nivel 0,01

Tabla 4.2: Coeficiente de correlación de Pearson

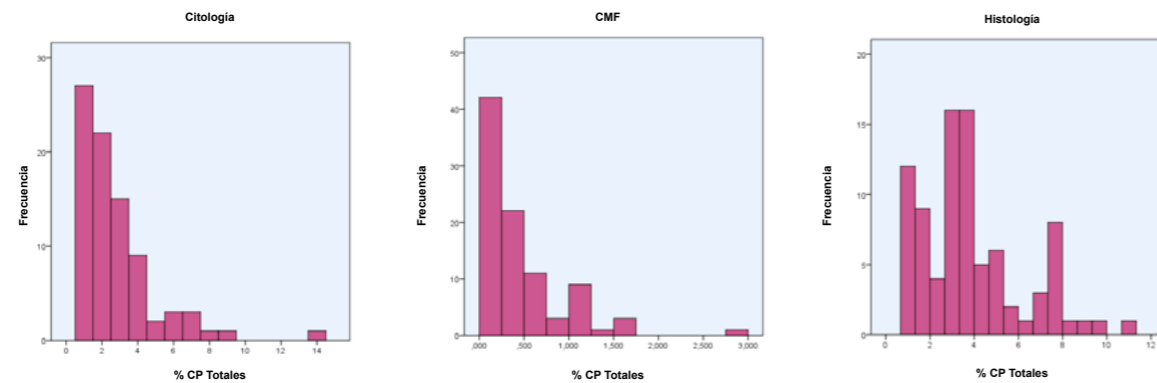


Figura 4.1 Histograma de frecuencias.

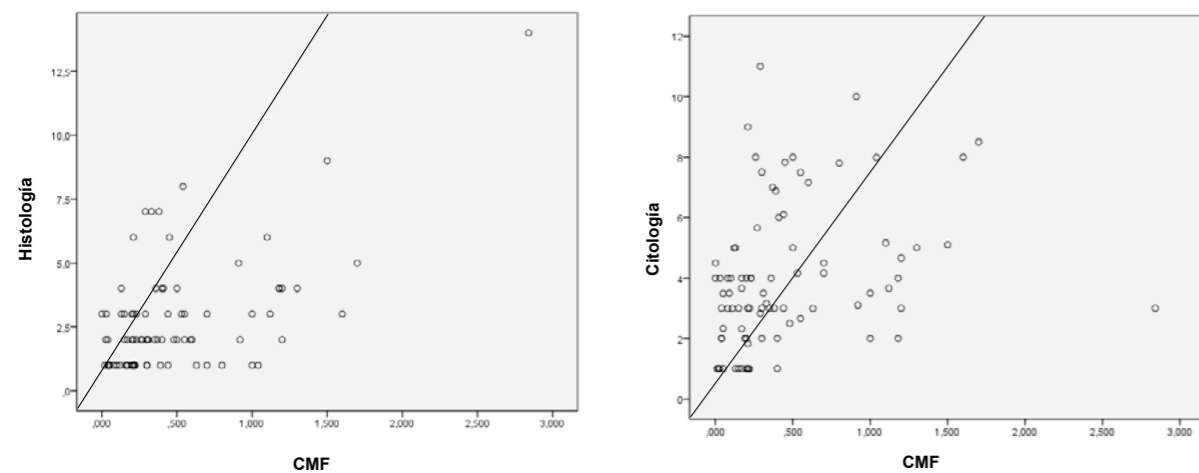


Figura 4.2 Diagramas de dispersión.

Se analizaron cuantos pacientes cumplían el criterio de remisión completa (<5% de células plasmáticas en M.O.) según el porcentaje de células plasmáticas cuantificadas por las diferentes técnicas. La concordancia entre las técnicas se calculó con el coeficiente Kappa.

- CMF: No observó ninguna muestra con más de 5% de células plasmáticas.
- Inmunohistoquímica: 21 muestras tenían más de 5% de células plasmáticas y las 64 restantes cumplían criterio de Remisión Completa.
- Citología: en 11 muestras se observó más de un 5% de células plasmáticas y las 72 muestras restantes cumplían criterio de remisión completa citológica.

Utilizando el coeficiente Kappa de Cohen se analizó la concordancia entre la citología y la histología en determinar si un paciente se encontraba o no en remisión completa, obteniéndose una baja concordancia entre ambas pruebas con un coeficiente Kappa=0.268 (p=0.07).

RC		Citología		TOTAL
		NO	SI	
IHQ	NO	6	15	21
	SI	4	58	62
Total		10	73	83

Tabla 4.3. Concordancia en la valoración de la Remisión Completa

La tabla 4.3. muestra la concordancia entre citología e inmunohistoquímica en detectar <5% células plasmáticas en médula ósea. De las 92 muestras analizadas, 83 disponían de estudio por ambas metodologías. En 64 muestras (77%) la citología y la inmunohistoquímica coincidieron en clasificar a los pacientes en RC: 58 muestras cumplían criterio de RC por los 2 métodos; en 6 muestras las dos técnicas detectaron más de un 5% de células plasmáticas. Los porcentajes medidos por ambas técnicas no coincidían en 19 casos (23%): en 15 muestras la estimación de la plasmocitosis medular fue >5% en la IHQ y <5% en el estudio citológico. La citología observó mayor porcentaje de células plasmáticas que la IHQ en 4 muestras.

## 4.2. DETECCIÓN DE CLONALIDAD

### 4.2.1. RESULTADOS

#### Citometría de flujo

Se realizó estudio CMF a las 92 muestras estudiadas. La presencia de clonalidad se definió como la detección de más de 20 células plasmáticas clonales con una sensibilidad de  $10^{-4}$ .

- En 54 muestras no se detectaron células plasmáticas patológicas.
- 38 muestras mostraban persistencia de la enfermedad.

#### Inmunohistoquímica

Se definió clonalidad la presencia de un ratio  $<1:2$  o  $>4:1$ , y ausencia de clonalidad un ratio k/l comprendido entre 1:2 y 4:1,

- En 76 muestras no se demostraba clonalidad.
- En 9 muestras se detectó clonalidad.

#### PCR fluorescente

Se consideraron las muestras positivas para clonalidad aquellas muestras que presentaban el mismo pico clonal que al diagnóstico, y negativas si éste había desaparecido. Únicamente 33 muestras disponían de estudio molecular válido.

- 9 casos presentaban clonalidad
- 24 casos no presentaban clonalidad

### 4.2.2. CONCORDANCIA ENTRE TÉCNICAS

La concordancia entre las diferentes pruebas para detectar clonalidad se analizó con el coeficiente Kappa de Cohen. La concordancia entre las muestras fue muy baja:

- Concordancia entre la clonalidad detectada por CMF e IHQ: Kappa de =0,07 ( $p=0,9$ ).
- Concordancia entre las técnicas moleculares y la CMF: Kappa = -0.107 ( $p=0.5$ ).
- Concordancia entre la IHQ y las técnicas moleculares: Kappa =0.048 ( $p=0.7$ ).

#### Concordancia entre CMF e IHQ

Coincidieron en la estimación de la clonalidad en 47 de las 85 muestras (55%): ninguna técnica demostró clonalidad en 43 muestras; ambas detectaban clonalidad en 4 muestras. La citometría de flujo fue capaz de detectar células plasmáticas clonales en 33 muestras, en las que la IHQ no lo detectó. En 5 casos la IHQ detectaba clonalidad mientras que el análisis inmunofenotípico no lo detectó.

Clonalidad		IHQ		TOTAL
		SI	NO	
CMF	SI	4	33	37
	NO	5	43	48
Total		9	76	85

**Tabla 4.4.** Concordancia clonalidad CMF - IHQ

### Concordancia entre CMF y PCR fluorescente.

Disponíamos de pocas muestras válidas para estudios moleculares, por lo que únicamente 33 muestras se pudieron estudiar. La CMF y la biología molecular (BM) coincidían en 16 muestras (48%): 13 muestras con clonalidad detectada por ambas técnicas y 3 en los que ninguna técnica detectaba clonalidad. En 6 casos la PCR no detectó clonalidad y la CMF sí, y en 11 casos la CMF observó células clonales y la PCR no detectó clonalidad..

Clonalidad		PCR		TOTAL
		SI	NO	
CMF	SI	3	11	14
	NO	6	13	19
Total		9	24	33

**Tabla 4.5.** Concordancia clonalidad CMF - PCR fluorescente

### Concordancia entre IHQ y PCR fluorescente

Coincidieron en la detección de clonalidad en 22 casos (70%): 21 en los que ninguna técnica detectó clonalidad y 1 caso en que ambas técnicas detectaban clonalidad. En 7 casos la inmunohistoquímica no detectó clonalidad y la PCR sí. La PCR no detectó clonalidad en 2 casos en los que la IHQ sí.

Clonalidad		PCR		TOTAL
		SI	NO	
IHQ	SI	1	2	3
	NO	7	21	28
Total		8	23	31

**Tabla 4.6.** Concordancia clonalidad IHQ - PCR fluorescente

### 4.3. PLASMOCITOSIS Y CLONALIDAD

El criterio de Remisión completa estricta viene definido por la obtención RC (ausencia de proteína monoclonal en la IF en sangre y orina, <5% células plasmáticas en MO) al que se añade la ausencia de clonalidad de las CP y un ratio kappa/lamda de cadenas libres en suero normal.

En primer lugar, analizamos cuántos pacientes presentaban <5% CP clonales en M.O. si se analizaba por inmunohistoquímica y cuántos si la clonalidad se estimaba por CMF. En el análisis por técnicas inmunohistoquímicas, los pacientes debían cumplir los dos criterios: menos de un 5% CP y ausencia de clonalidad; mientras que por CMF, puesto que todas las muestras presentaban <5% de células plasmáticas, únicamente se estudió la ausencia de clonalidad. Se analizó la concordancia en detectar <5% CP clonales estos dos métodos. Se observó una concordancia muy baja entre las técnicas, con un coeficiente Kappa de 0.128 (p=0.2.)

Disponían de ambos estudios 86 muestras. Los dos métodos coincidían en el resultado en 40 casos (45% de las muestras): en 31 muestras las dos técnicas detectaban <5%CP clonales; en 9 muestras ambas técnicas detectaban >5% CP clonales. En 18 casos la inmunohistoquímica o bien detectaba >5% de células plasmáticas (14 muestras) o detectaba clonalidad (2 muestras) o ambas (2 muestras), en las que la CMF no detectaba clonalidad. La IHQ no detectaba exceso de células plasmáticas clonales en 28 muestras en las que la CMF detectaba células patológicas.

< 5% CP clonales		IHQ		TOTAL
		NO	SI	
CMF	NO	9	28	37
	SI	18	31	49
Total		27	59	86

**Tabla 4.7.** Concordancia clonalidad <5% CP clonales

#### 4.4. IMPACTO PRONÓSTICO

En nuestra serie de 62 pacientes, con la intención de analizar el impacto pronóstico de cada prueba diagnóstica, realizamos un análisis univariante de la supervivencia libre de progresión y supervivencia global y los siguientes parámetros:

- Plasmocitosis medular estimada por citología.
- Plasmocitosis estimada por IHQ.
- Clonalidad estimada por IHQ.
- Clonalidad estimada por CMF.
- Presencia de <5% CP clonales.
- Cadenas libres en suero.
- Remisión completa estricta por IHQ y CMF.
- Presencia de bandas oligoclonales en el momento de la prueba.

##### 4.4.1. PLASMOCITOSIS MEDULAR

###### Citología

Analizamos la plasmocitosis medular estimada por estudios morfológicos. En nuestra serie, los pacientes con <5% de células plasmáticas en el aspirado medular presentaron una mayor supervivencia libre de progresión que los pacientes que tenían >5% de células plasmáticas en M.O. con una SLP de 124 meses (IC 95% 99-149) vs. 101 meses (IC 95% 52-101). No se encontraron diferencias significativas (p=0,2). De los 57 pacientes que disponían de estudio morfológico, únicamente 8 tenían >5% de células plasmáticas en M.O, 3 de ellos (37%) recayeron. Entre los 49 restantes que presentaban remisión completa citológica, 15 (32%) progresan. En el análisis de supervivencia global en los dos grupos, llamó la atención que ninguno de los pacientes con un porcentaje de células plasmáticas mayor de 5% (los que no adquieren RC) fallece, con una supervivencia del 100% a los 15 años. Analizamos exhaustivamente estos casos y detectamos que de los 57 pacientes analizados, únicamente 8 casos tenían >5% de CP. La clonalidad de estas 8 muestras estimada por CMF demostró que, en 5 de los 8 pacientes, ese exceso de células plasmáticas era policlonal.

RC	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
No	8	5	3	37,5%
Si	49	34	15	30,6%
Gobal	57	39	18	31,6%

Tabla 4.8. Progresión en función de la RC morfológica

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresion			
> 5% CP	101	52-149	0,2
< 5% CP	124	99-149	

Tabla 4.9. Supervivencia en función de la RC por citología

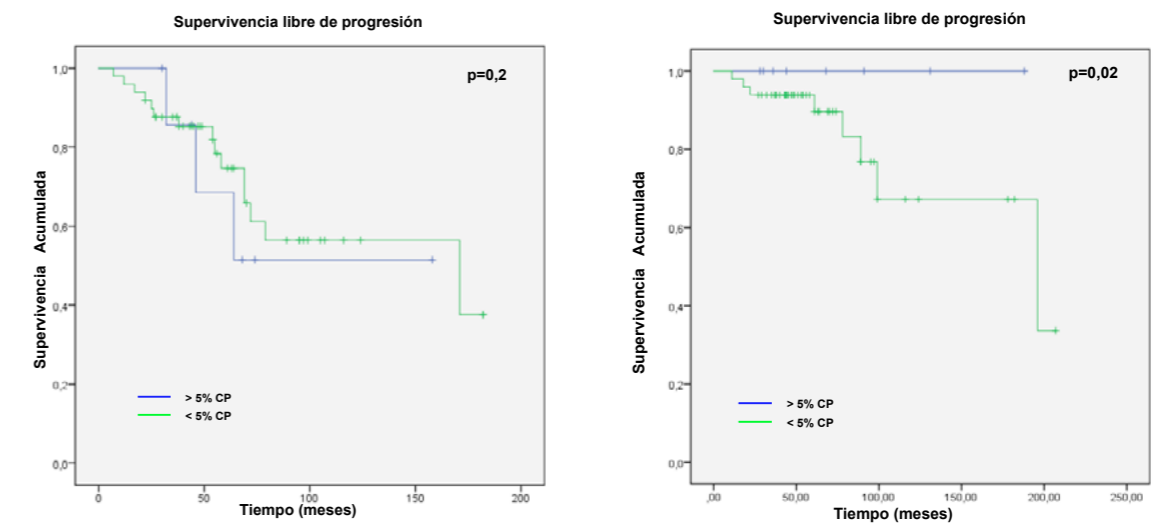


Figura 4.3. Supervivencia RC por citología.

**Inmunohistoquímica**

Aquellos pacientes que obtuvieron remisión completa demostrada por técnicas inmunohistoquímicas (<5% CP analizadas con CD138) tuvieron mayor supervivencia libre de progresión que los pacientes que no obtuvieron RC (89 meses versus 114 meses). Estos resultados no fueron significativos (p=0,6). De los 58 pacientes analizados, 44 casos (75%) estaban en RC. Entre estos casos en RC, 16 pacientes (36%) recayeron y 28 permanecieron en RC. Entre los 14 pacientes que presentaban >5% de CP, únicamente 4 (28%) recaen, y 10 se mantienen libres de enfermedad.

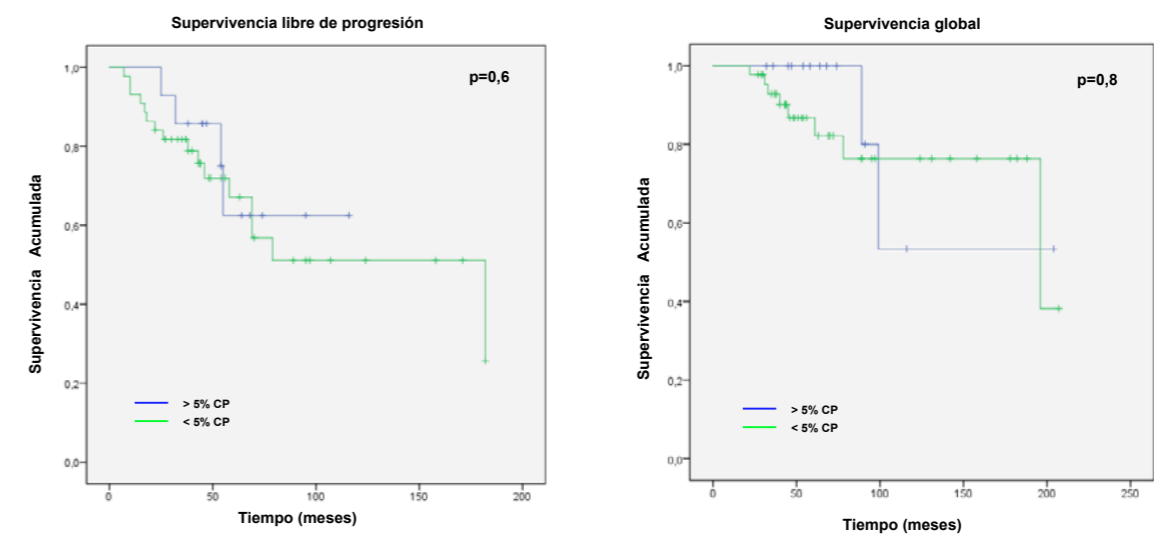
En cuanto a la supervivencia global, los pacientes con <5% de células plasmáticas presentan una mayor supervivencia global que aquellos pacientes que mostraron una plasmocitosis medular mayor de 5% (102 vs. 164 meses). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,8).

RC	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
No	14	10	4	28,6%
Si	44	28	16	26,4%
Gobal	58	38	20	34,5%

**Tabla 4.10.** Progresión en función de la RC por IHQ

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresion			
> 5% CP	89	11-68	0,6
< 5% CP	114	87-142	
Supervivencia global			
> 5% CP	102	91-114	0,8
< 5% CP	164	138-191	

**Tabla 4.11.** Supervivencia en función de la RC por IHQ



**Figura 4.4.** Supervivencia según la plasmocitosis estudiada por Inmunohistoquímica.

4.4.2. CLONALIDAD

Inmunohistoquímica

Los pacientes en los que por técnicas de inmunohistoquímica se demostró clonalidad (cociente kappa/lambda alterado) tuvieron una supervivencia libre de progresión menor que los pacientes en los que no se detectó clonalidad (78 vs 121 meses). Estos resultados no alcanzaron diferencias significativas ( $p=0,4$ ). Disponían de este estudio 57 pacientes. La inmunohistoquímica encontró clonalidad únicamente en 6 pacientes, de los cuales 3 progresaron y 3 permanecen libres de enfermedad (50%). La IHQ no detectó clonalidad en 52 pacientes: 17 pacientes (32%) progresaron y 35 pacientes continúan libres de enfermedad.

Respecto a la supervivencia global, los pacientes con un cociente k/l alterado presentaban una supervivencia global similar a los que presentaban un ratio k/l normal con medias de 160 vs 156.

RC	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
Si	6	3	3	50%
No	52	35	17	32,7%
Gobal	58	38	20	34,5%

Tabla 4.12. Progresión en función de la clonalidad por IHQ

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresion			
k:l alterado	78	30-126	0,44
k:l normal	121	90-140	
Supervivencia global			
k:l alterado	160	110-209	0,9
k:l normal	156	128-185	

Tabla 4.13. Supervivencia en función de la clonalidad por IHQ

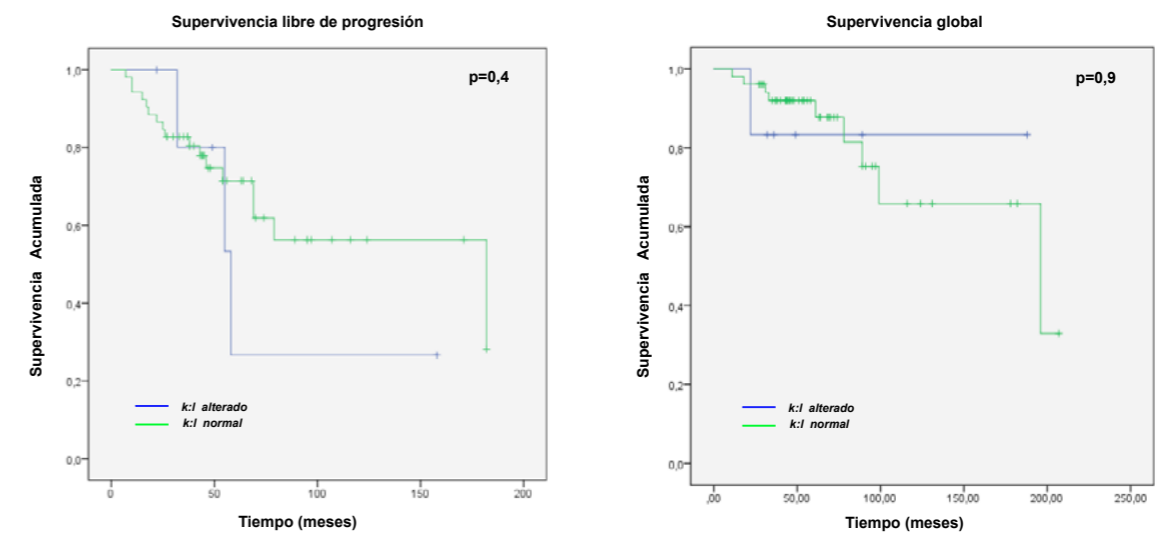


Figura 4.5. Supervivencia según la clonalidad medida por IHQ.

**Citometría de flujo**

Aquellos pacientes en los que la CMF no detectó células plasmáticas patológicas tuvieron una mayor supervivencia libre de progresión que los que la CMF detectó clonalidad (131 meses vs. 92 meses). Estos resultados alcanzaron significación estadística ( $p=0,042$ ). Disponían de este estudio 61 pacientes. Se detectó clonalidad en 22 pacientes (36%), entre ellos 12 pacientes progresaron (55%) y 10 se mantuvieron libre de enfermedad. No se demostró en 39 pacientes: 9 progresaron (25%), 30 se mantienen libres de enfermedad.

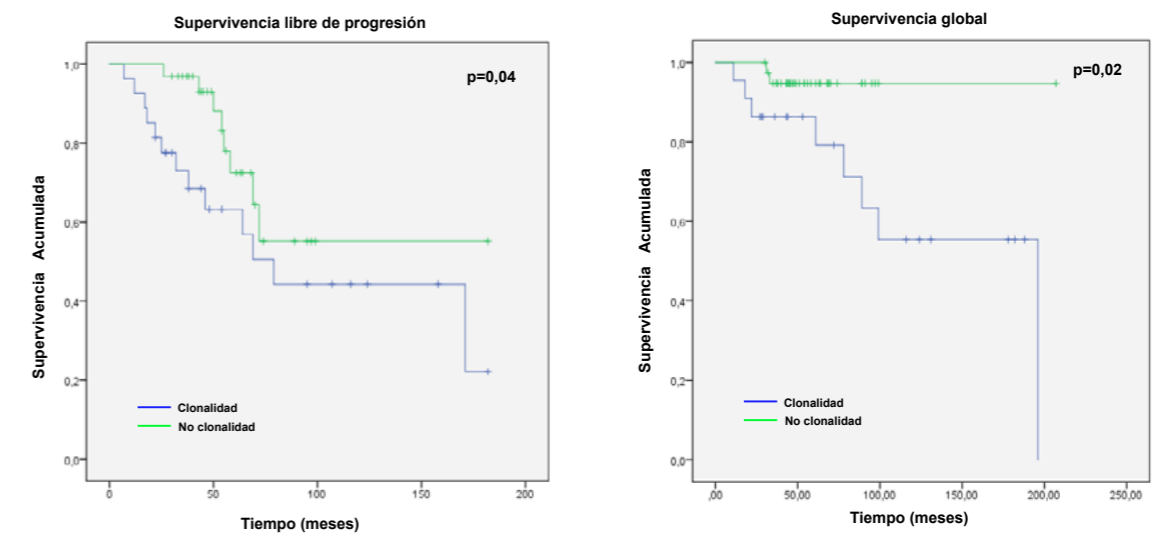
La ausencia de células plasmáticas clonales detectada por CMF también tuvo impacto en la supervivencia global, con una supervivencia de 136 meses para los pacientes en los que se detectaba clonalidad versus 197 meses en aquellos pacientes en los que no se detectaba enfermedad residual. Estos resultados fueron estadísticamente significativos (0.02).

RC	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
Si	22	10	12	54,5%
No	39	30	9	23,1%
Gobal	61	40	21	34,4%

**Tabla 4.14.** Progresión en función de la clonalidad por CMF

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresion			
Clonalidad	92	59-126	0,04
No clonalidad	131	101-165	
Supervivencia global			
Clonalidad	136	90-173	0,02
No clonalidad	197	185-210	

**Tabla 4.15.** Supervivencia en función de la clonalidad por CMF



**Figura 4.6.** Gráficas de supervivencia según CMF.

**Magnitud de la EMR**

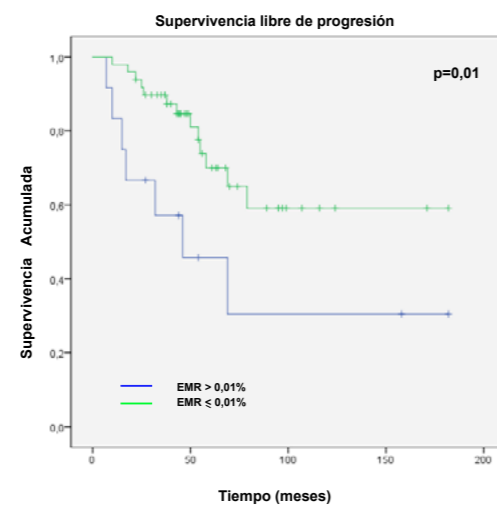
Analizamos la SLP de los pacientes en función de la magnitud de la EMR detectada por CMF. Dividimos a los pacientes en dos grupos: pacientes con EMR>0,01% (EMR alta) y pacientes con EMR ≤0,01% o negativa. Observamos que los pacientes con EMR alta tuvieron una SLP menor que los pacientes en los que la CMF no detectó CP clonales o la EMR detectada era muy baja (EMR ≤0,01%), con medias de 78 vs. 127 meses. Estos resultados fueron estadísticamente significativos (p=0,01). El 26% de los pacientes (13 casos de 49) con EMR baja o negativa progresaron, mientras que el 58% de los pacientes (7 pacientes de 12) con EMR alta progresaron.

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
EMR >0,01%	12	5	7	58%
EMR ≤0,01%	49	36	13	26%
Global	61	41	20	33%

**Tabla 4.16.** Progresion según la magnitud de la EMR

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia Libre de progresión			
EMR >0,01%	78	32-124	0,01
EMR ≤0,01%	127	103-152	

**Tabla 4.17.** Supervivencia según la magnitud de la EMR



**Figura 4.7.** SLP en función de la EMR (≤0,01 o EMR negativa vs >0,01).

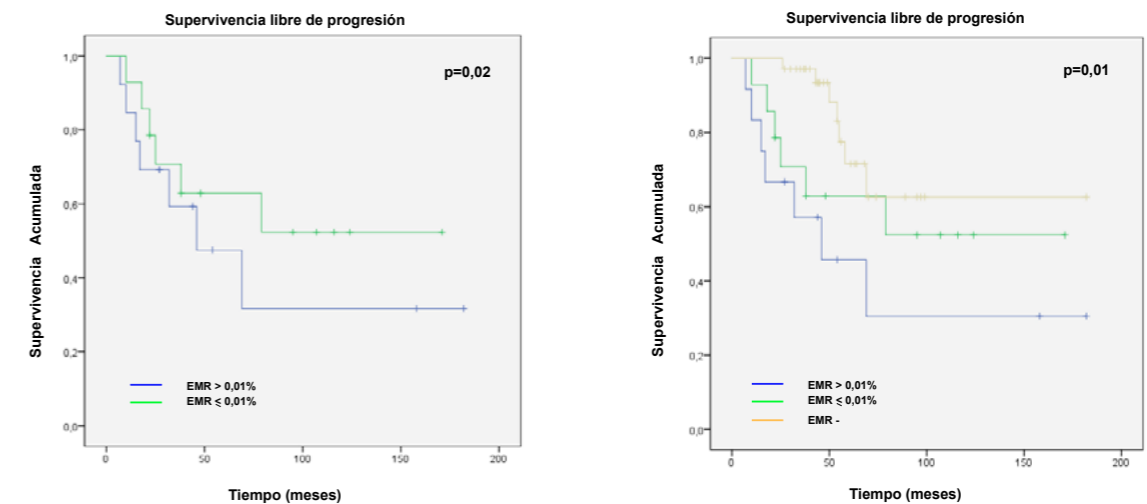
Hicimos un subanálisis de los 27 pacientes en los que la CMF detectó clonalidad. diferenciando aquellos casos que presentaron una EMR alta (>0,01% CP clonales) frente a los que presentaban una EMR baja (≤0,01% CP clonales). Entre los 13 casos en los que la CMF detectó EMR alta, 7 pacientes recayeron (54%). La CMF detectó EMR baja en 14 pacientes, de los cuales 6 recayeron (43%). La SLP fue mayor en aquellos pacientes con menor carga tumoral (106 vs 80 meses). Estos resultados fueron estadísticamente significativos (p=0,02).

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
EMR>0,01%	13	6	7	54%
EMR ≤0,01%	14	8	6	43%
EMR-	35	27	8	23%
Global	61	40	21	35%

**Tabla 4.18.** Progresion según la magnitud de EMR

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia Libre de progresión			
EMR >0,01%	78	32-124	0,02
EMR ≤0,01%	106	67-144	
EMR negativa	134	104-139	

**Tabla 4.19.** Supervivencia libre de progresión según EMR



**Figura 4.8.** Supervivencia según la magnitud de la EMR.

**4.4.3. OBTENCIÓN DE <5% CÉLULAS PLASMÁTICAS CLONALES**

La remisión completa estricta está definida como remisión completa (<5% células plasmáticas clonales en médula ósea) y además es necesaria la ausencia de células plasmáticas clonales en médula ósea (junto con un ratio k/l de cadenas libres en suero normal) ya sea medida por inmunohistoquímica o por CMF. Por lo tanto, se deben cumplir simultáneamente los dos criterios hasta ahora analizados. Inicialmente estudiamos el impacto de obtener <5% CP clonales.

**Inmunohistoquímica**

En nuestra serie los pacientes que presentaban <5% de células plasmáticas clonales (cociente kappa/lambda alterado) estimado por IHQ presentaron una supervivencia libre de progresión menor que los pacientes con >5%CP clonales, con medias de 146 vs 106 meses. Estos resultados no alcanzaron significación estadística (p=0,16). Los resultados de SG fueron similares con medias de 151 meses en pacientes con <5% CP clonales vs 171 en aquellos con >5%CP clonales. Estos resultados no alcanzaron significación estadística (p=0,2).

Estudiamos 57 pacientes, de los cuales 18 pacientes (31%) presentaban o >5% CP o un cociente k/l alterado o ambos simultáneamente. Entre estos pacientes únicamente 4 progresan (23%). De los 39 pacientes restantes que tenían <5% células plasmáticas clonales en médula ósea 15 progresan (39%). Por lo tanto, según nuestros datos progresaron más los pacientes con <5% células plasmáticas clonales. Se analizó exhaustivamente los 18 pacientes que tenían >5%CP clonales. Observamos que entre los 14 pacientes que no progresaron, 11 presentaba >5% células plasmáticas estimadas por IHQ, pero estas CP eran policlonales en el estudio por CMF. De igual manera observamos que, de los 15 pacientes que progresaron dentro del grupo de <5% CP clonales, en 11 de ellos la CMF demostraba clonalidad en esas células plasmáticas.

< 5% CP clonales	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
No	18	14	4	22,2%
Si	39	24	15	38,5%
Gobal	57	38	19	33,3%

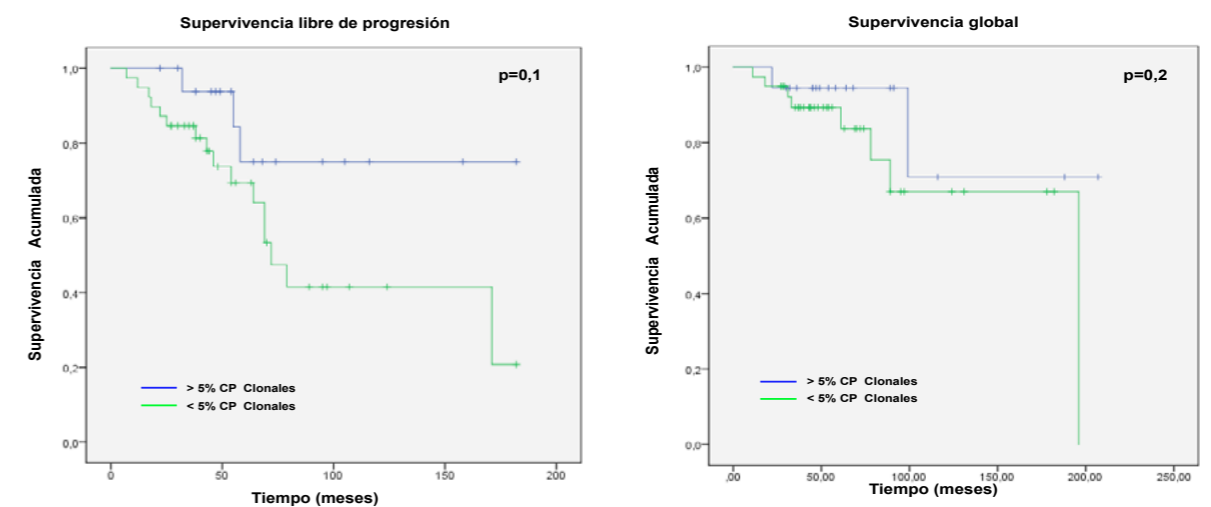
**Tabla 4.20.** Progresión en función de % CP clonales por IHQ

Histología (< 5% CP clonales)			CMF		Total
			SI	NO	
NO	Progresión	NO	4	10	14
		SI	1	3	4
	Total		5	13	18
SI	Progresión	NO	6	18	24
		SI	11	4	15
	Total		17	22	39
Total	Progresión	NO	10	28	38
		SI	12	7	19
	Total		22	35	57

**Tabla 4.21.** Tabla cruzada progresión CMF - Histología

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresion			
> 5% CP clonales	146	105-186	0,16
< 5% CP clonales	106	78-134	
Supervivencia global			
> 5% CP clonales	171	124-217	0,2
< 5% CP clonales	151	119-183	

**Tabla 4.22.** Supervivencia en función de la % CP clonales por IHQ



**Figura 4.9.** Supervivencia según </>5% células plasmáticas clonales.

**Citología y Citometría de flujo**

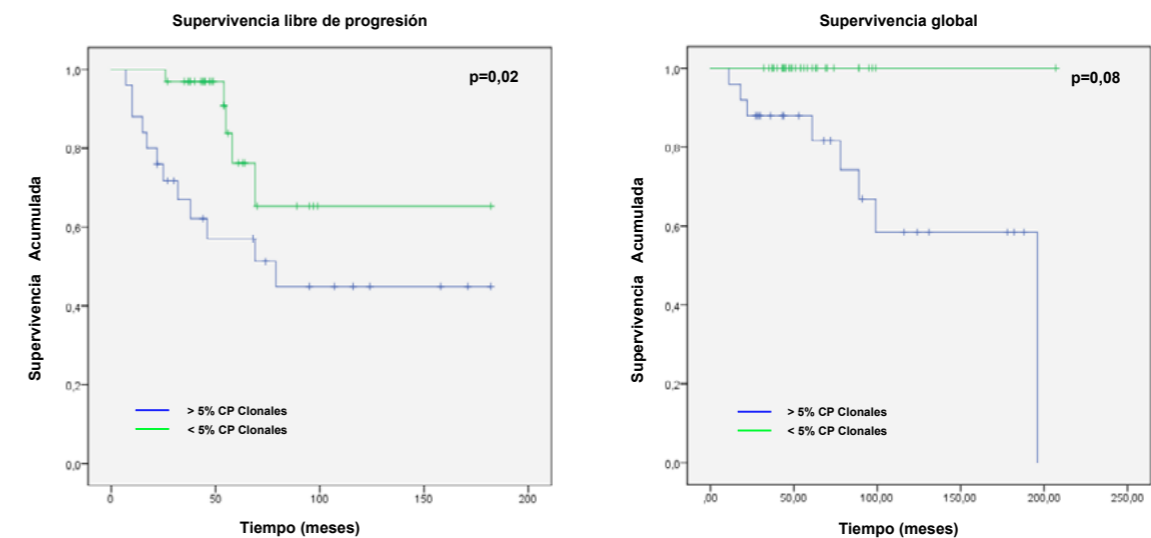
Analizamos los pacientes que estaban en RC morfológica (<5% de células plasmáticas estimadas en el aspirado medular) y ausencia de clonalidad detectada por CMF. Disponían de ambos estudios 57 pacientes de los cuales 32 casos (56%) presentaban <5% CP clonales y los otros 25 no cumplía alguno de los dos criterios: en 17 casos la CMF detectó clonalidad, en 3 muestras la citología observó >5% CP, y 5 pacientes no cumplían ninguno de los dos criterios. Los pacientes que obtuvieron <5%CP clonales tras el tratamiento, tuvieron una SLP mayor que aquellos pacientes con >5%CP clonales con unas medias de 100 vs 139 meses. Estos resultados alcanzaron significación estadística (p=0,02). En cuanto a la SG también se observó mayor supervivencia en aquellos pacientes que presentaban <5% CP con una mediana no alcanza. Estos resultados no alcanzaron significación estadística (p=0,08).

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
>5%CPclonales	25	12	13	52,0%
<5%CPclonales	32	5	27	84,4%
Global	57	17	40	70,2%

**Tabla 4.23.** Progresión según </> 5% CP clonales por Citología y CMF

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia Libre de progresión			
> 5% CPclonales	100	68-133	0,02
< 5% CPclonales	139	105-171	

**Tabla 4.24.** Supervivencia según </> 5% CP Clonales por Citología y CMF



**Figura 4.10.** Supervivencia según </> 5% CP clonales por Citología y CMF.

4.4.4. ANALISIS DE LA REMISIÓN COMPLETA ESTRICTA

Cadenas ligeras libres en suero

En primer lugar, analizamos el valor pronóstico de las cadenas libres en suero de manera aislada. Disponían de resultados de este parámetro 50 pacientes, de los cuales 39 presentaban un ratio de cadenas libres normal y 11 pacientes lo tenían alterado. Observamos pocas diferencias en la SLP entre los dos grupos de pacientes con una media de 118 meses para los pacientes con ratio alterado vs 124 meses los pacientes con ratio normal. Sin encontrar diferencias significativas en este resultado ( $p=0,5$ ). De los 39 pacientes que tenían el ratio normal, 10 progresaron (26%). Entre los 11 pacientes con ratio alterado, 3 progresaron (28%). En nuestra serie, presentar un ratio de cadenas libres en suero normal no tuvo impacto en la SG. Ninguno de los pacientes con FLC alterado fallece, y 4 de los que presentaron un ratio normal fallece. No se alcanzó la mediana de SG. Este resultado no fue estadísticamente significativo ( $p=0,2$ ).

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
Alterado	11	8	3	28%
Normal	39	29	10	26%
Global	50	37	13	26%

Tabla 4.25. Progresión según ratio de cadenas ligeras libres en suero

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia Libre de progresión			
Cadenas ligeras en suero alterado	118	80-156	0,5
Cadenas ligeras en suero normal	124	96-153	

Tabla 4.26. Supervivencia según ratio de cadenas ligeras libres en suero

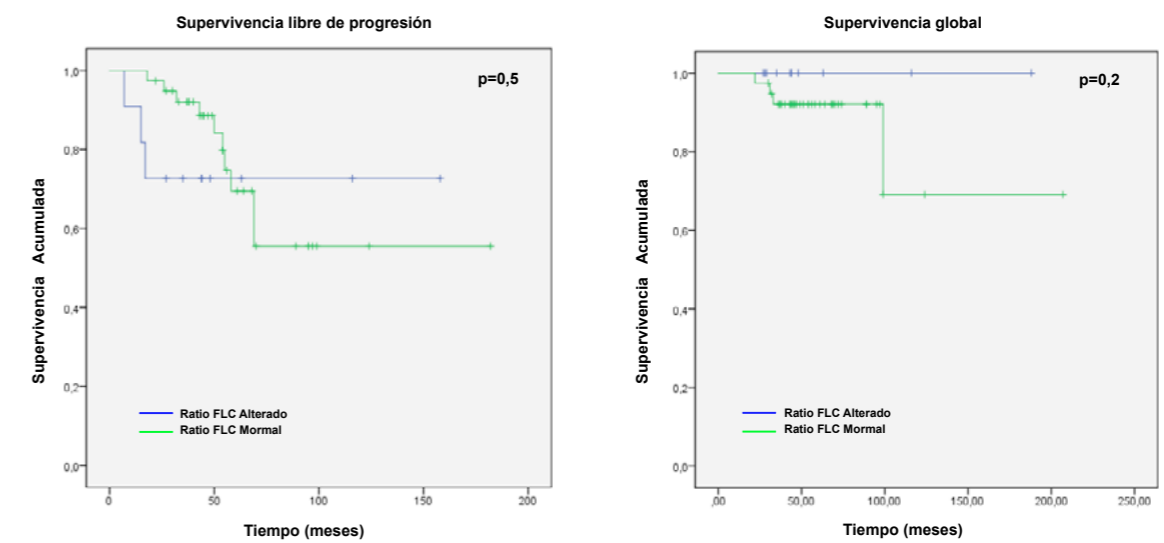


Figura 4.11. Supervivencia según ratio de cadenas ligeras libres en suero.

**RC estricta por IHQ**

Utilizando el ratio k:l de cadenas libres en suero y analizando la clonalidad por técnicas inmunohistoquímicas, estudiamos los pacientes que cumplían criterio de remisión completa estricta. De los 62 pacientes analizados, 47 disponían de resultados de ambas técnicas: 21 casos (45%) estaban en RC estricta y 26 (55%) no cumplían el criterio: 15 casos no estaban en RC estricta porque presentaban >5% células plasmáticas clonales, 9 pacientes porque tenían un ratio k:l de cadenas libres en suero alterado, y 2 por no cumplir ninguno de los dos criterios.

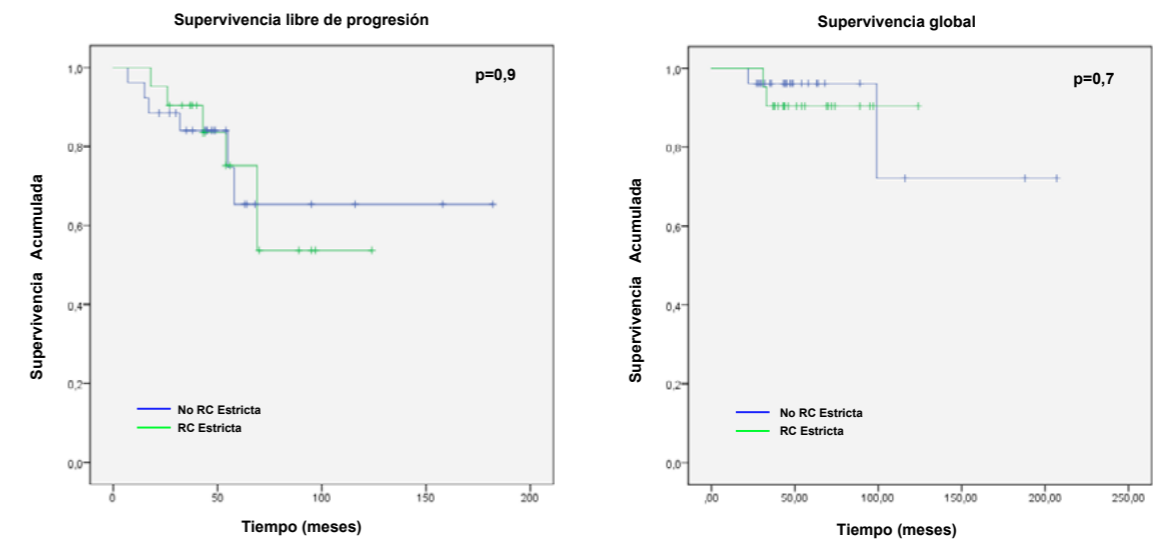
Analizamos el impacto pronóstico de la obtención de remisión completa estricta. Observamos que aquellos pacientes que estaban en remisión completa estricta, tenían menor SLP que aquellos que no lo estaban (90 meses vs 132 meses). Estos resultados no fueron estadísticamente significativos (p=0,9). De los 21 pacientes en RC estricta 6 (29%) progresan, y 6 (25%) de los que no estaban en RC estricta progresan. De igual manera, los pacientes que no estaban en RC estricta tuvieron una supervivencia global mayor que los que no lo estaban (173 vs. 115 meses). No encontramos diferencias estadísticamente significativas (p=0,7).

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
NO	26	6	20	76,9%
SI	21	6	15	71,4%
Total	47	12	35	74,5%

**Tabla 4.27.** Progresión según la RC estricta por IHQ

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresion			
No RC estricta	132	98-167	0,9
RC estricta	90	70-111	
Supervivencia global			
No RC estricta	173	128-219	0,7
RC estricta	115	103-126	

**Tabla 4.28.** Supervivencia según la RC estricta por IHQ



**Figura 4.12.** Supervivencia según la RC estricta por IHQ.

Hicimos un subanálisis analizando el valor de obtener un ratio de cadenas ligeras libres en suero normal únicamente en aquellos pacientes que tenían <5% de células plasmáticas clonales estimadas por IHQ. Observamos que, en aquellos pacientes con <5% CP clonales y un ratio FLC normal tuvieron una SLP mayor que aquellos con <5% células plasmáticas clonales pero con un ratio alterado. No se alcanzó mediana de seguimiento. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos. (p=0,2). De los 30 pacientes que tenían <5%CP clonales, 21 presentaban ratio k:l de cadenas ligeras normal, de ellos 6 recayeron (29%). De los 9 casos que tenían un ratio alterado, 3 recaen (36%).

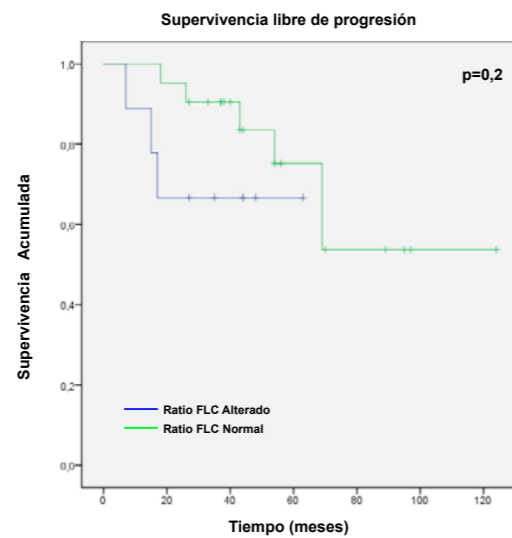


Figura 4.13. Impacto de cadenas libres en suero en pacientes con <5%CP.

**Valor de la EMR en pacientes en RC estricta**

Analizamos los 26 pacientes que no estaban en RC estricta estimada por IHQ. En estos pacientes estudiamos la supervivencia de aquellos pacientes con una EMR baja (EMR ≤0,01%) frente a los pacientes con EMR alta (>0,1%) detectada por CMF. Alcanzaron una EMR baja 19 pacientes, de los cuales únicamente 2 pacientes (11%) recayeron. Dentro de los 7 pacientes con EMF alta, 4 pacientes progresaron (57%). La SLP en los pacientes que no estaban en RC estricta fue mayor en los que tenían EMR baja (150 vs 71 meses). Estos resultados fueron estadísticamente significativos (p=0,02).

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
EMR >0,01%	7	4	3	57%
EMR ≤0,01%	19	2	17	11%
Global	26	6	20	23%

Tabla 4.29. SLP en pacientes no RC estricta según la magnitud de la EMR

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia Libre de progresión			
Cadenas libres en suero alterado	71	17-125	0,02
Cadenas libres en suero normal	150	112-188	

Tabla 4.30. SLP en pacientes no RC estricta según la magnitud de la EMR

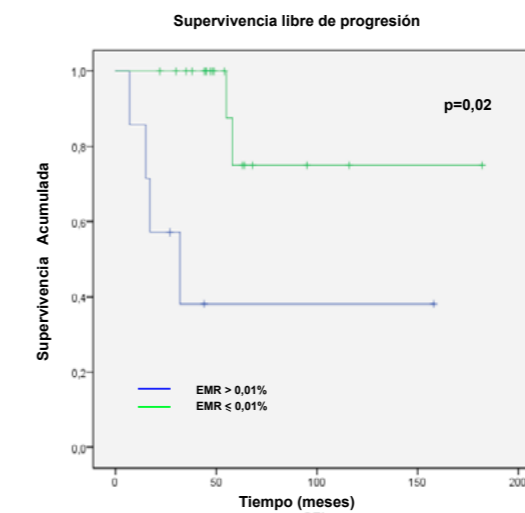


Figura 4.14 . SLP en pacientes no RC estricta según la magnitud de la EMR.

**CMF y cadenas libres**

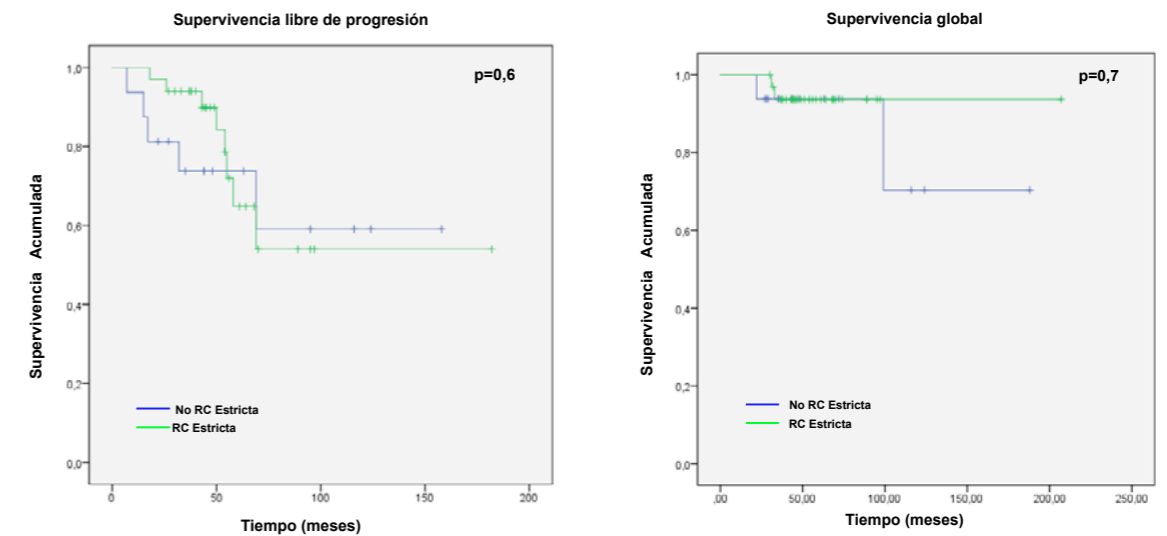
Analizamos el impacto de la RC estricta estimada por CMF, es decir presentar <5% CP clonales y un ratio FLC normal. Disponían de los dos estudios 49 pacientes: 33 pacientes estaban en RC estricta; 16 casos no alcanzó RC estricta: 4 casos presentaban un ratio FLC alterado, en 5 la CMF detectó clonalidad y 7 pacientes no cumplió ninguno de los dos criterios. Los pacientes que alcanzaron RC estricta presentaron una SLP y SG mayor que los pacientes que no estaban en RC estricta (108 vs 122 meses para SLP y 156 vs 195 meses para SG). Estos resultados no fueron significativos (p=0,6 y 0,7 respectivamente).

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
No RC estricta	16	11	5	31%
RC estricta	33	25	8	24%
Global	49	36	13	27%

**Tabla 4.31.** Progresión según la RC estricta por CMF

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresión			
No RC estricta	108	72-143	0,6
RC estricta	122	88-156	
Supervivencia global			
No RC estricta	156	117-196	0,7
RC estricta	195	180-210	

**Tabla 4.32.** Supervivencia según la RC estricta por CMF



**Figura 4.15.** Supervivencia según la RC estricta por CMF.

**Citología, CMF y cadenas libres en suero**

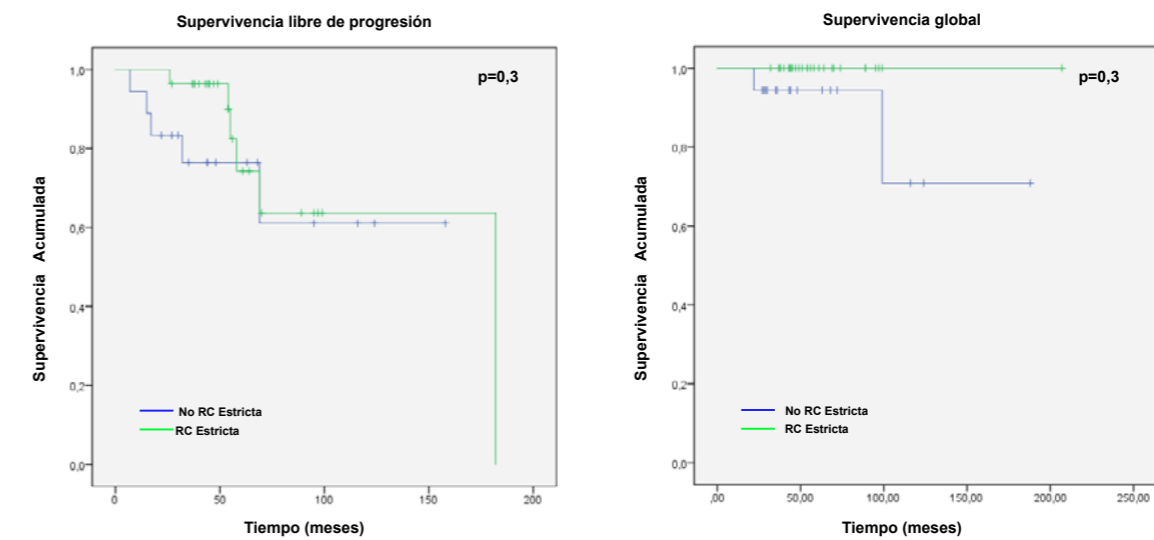
Estudiamos el de obtener <5% de células plasmáticas en el AMO (estimada por citología), ausencia de clonalidad demostrada por CMF, y un ratio de cadenas libres en suero normal. Analizamos los 46 pacientes que disponían de los tres estudios: 28 pacientes estaban en RC estricta, de los cuales 6(23%) pacientes recayeron; 18 pacientes no cumplían criterio de RC estricta, de los cuales 5 (28%) recayeron. Los pacientes que alcanzaron RC estricta tuvieron una SLP y SG mayor que los que no estaban en RC estricta con medias de 111 vs 136 meses para SLP. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos (p=0,3).

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia Libre de progresión			
No RC estricta	111	77-145	0,3
RC estricta	136	99-173	

**Tabla 4.33.** SLP según obtención de RC estricta por Citología y CMF

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
0	18	13	5	28%
1	28	22	6	23%
Global	46	11	35	24%

**Tabla 4.34.** Progresión según la obtención de RC estricta por Citología y CMF



**Figura.4.16.** Supervivencia según la obtención de RC estricta por Citología y CMF.

**4.4.5. PRESENCIA DE BANDAS OLIGOCLONALES**

En nuestra serie 39 de los 59 pacientes estudiados (66%) presentaban bandas oligoclonales. De éstos 11 progresaron (28%) mientras que 8 de los 20 pacientes que no que no tenían bandas oligoclonales progresaron (40%).

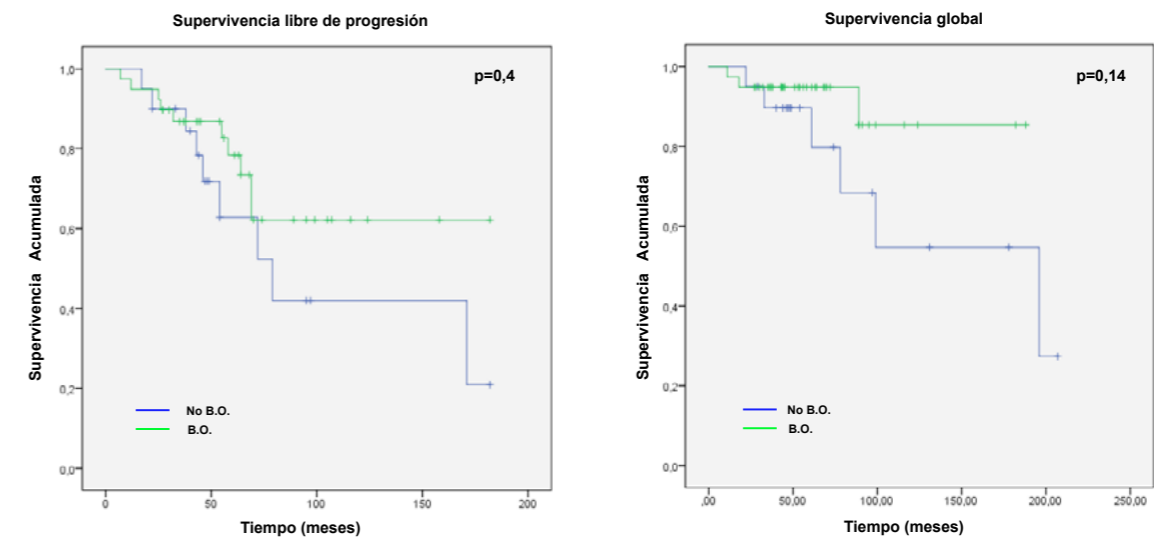
Los pacientes que presentamos bandas oligoclonales tuvieron una mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global que aquellos que no las presentaron con medias de 114 vs. 127 meses y 141 vs. 170 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas. ( $p=0,43$  y  $0,14$ ).

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia libre de progresion			
Ausencia de BO	114	73-155	0,43
Presencia de BO	127	100-154	
Supervivencia global			
Ausencia de BO	141	100-183	0,14
Presencia de BO	170	140-190	

**Tabla 4.35.** Supervivencia en función de la presencia de bandas oligoclonales

BO	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
No	20	11	49	45 %
Si	39	28	11	28,2%
Gobal	59	39	20	33,9 %

**Tabla 4.36.** Progresión en función de las bandas oligoclonales

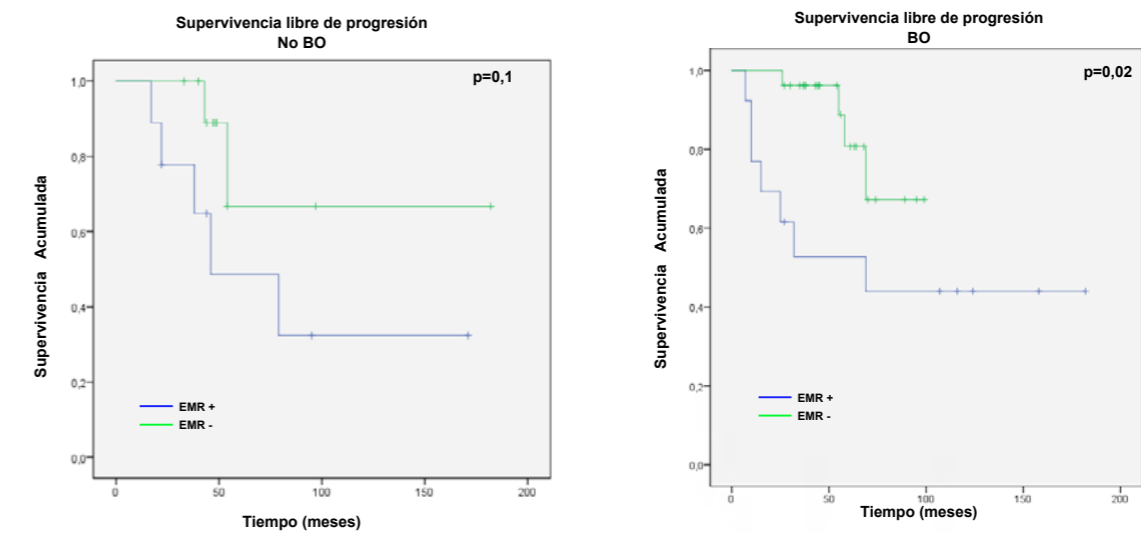


**Figura 4.17.** Supervivencia en función de la presencia de bandas oligoclonales.

Clasificamos a los pacientes en función de la presencia o ausencia de bandas oligoclonales, y analizamos la EMR detectada por CMF en estos pacientes, así como su impacto en la SLP y SG. Entre los 39 pacientes que presentaban BO, 26 casos (67%) no tenían EMR detectable. Dentro de los 20 casos sin BO, en 11 casos (55%) la CMF no detectaba EMR. En ambos grupos (pacientes con presencia y ausencia de BO) la SLP fue favorable para los pacientes en los que no se detectó clonalidad. Estos resultados alcanzaron significación estadística únicamente en los pacientes con presencia de de BO ( $p=0,1$  y  $0,02$  respectivamente).

	Media (meses)	IC 95%	p
Ausencia de BO			
EMR+	84	39-130	0,1
EMR-	138	85-191	
Presencia de BO			
EMR+	85	74-96	0,02
EMR-	94	49-138	

**Tabla 4.37.** SLP en función de la presencia de BO, estratificado por clonalidad por CMF



**Figura 4.18.** SLP en función de la presencia de BO, estratificado por clonalidad por CMF.

**4.4.6. SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DETECTADA SOLO POR CMF**

Analizamos la SLP y la SG de los pacientes en los que no se detectaba enfermedad por citología, IHQ ni CMF frente a aquellos en los que únicamente la CMF detectaba enfermedad residual. Observamos que, los pacientes en los que ninguna técnica detectaba enfermedad, presentaron una SLP y SG mayor q los que únicamente se detectaba por CMF.

De los 62 pacientes estudiados, en 20 casos no se detectaba enfermedad por ninguna de las técnicas, y en 14 únicamente la CMF demostró clonalidad, siendo la citología y la IHQ negativa para enfermedad residual. Estos pacientes con EMR detectada por CMF, tuvieron menor SLP y SG que los pacientes en los que ninguna técnica demostró enfermedad residual, con medias de 81 vs 84 meses para SLP y mediana no alcanzada para SG. Estos resultados fueron estadísticamente significativos ( $p=0,01$  para SLP y  $p=0,02$  para SG).

De los 20 pacientes en los que ninguna técnica demostró enfermedad, únicamente 3 (15%) progresaron, mientras que esta cifra ascendió a 9 (65%) de los 14 casos en los que únicamente la CMF era positiva.

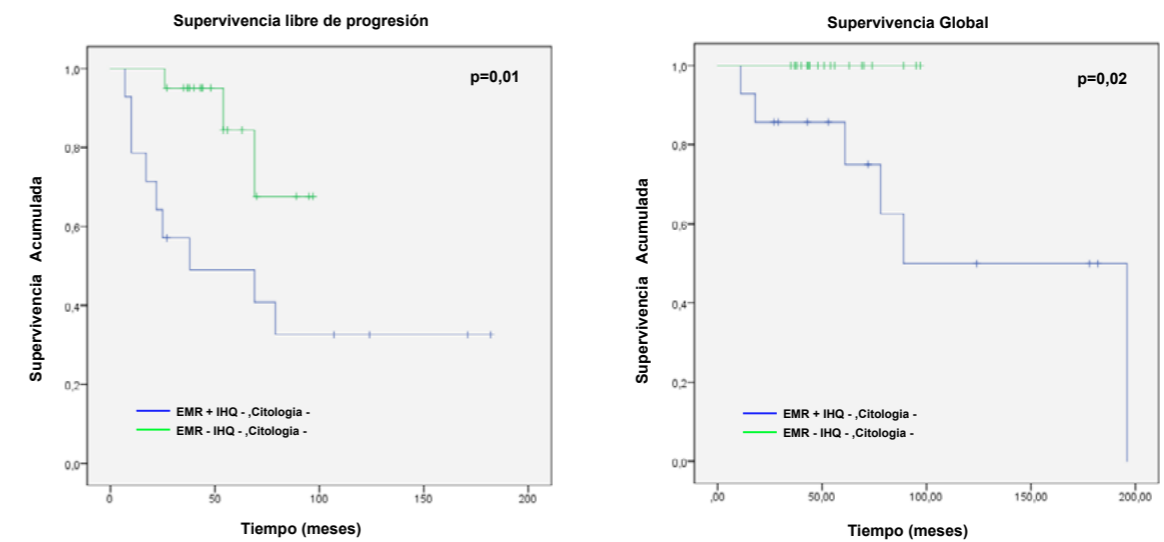
En cuanto a la supervivencia global, todos los casos en los que ninguna técnica detectó clonalidad permanecen vivos, mientras que 6 de los 14 con EMR+ fallecen (43%).

	Media (meses)	IC 95%	p
Supervivencia Libre de progresión			
EMR+, IHQ-, Citología-	81	41-120	0,01
EMR-, IHQ-, Citología	84	71-96	

**Tabla 4.38.** SLP en pacientes con enfermedad detectada solo por CMF

	N Total	NO Progresión	Progresión	
			N	Porcentaje
EMR+, IHQ-, Citología-	14	5	9	65%
EMR-, IHQ-, Citología-	20	17	3	15%
Global	34	22	12	35%

**Tabla 4.39.** Progresión en pacientes con enfermedad detectada solo por CMF



**Figura 4.19 .** Supervivencia en pacientes con enfermedad detectada solo por CMF.

## **DISCUSSION**

---

## 5.1. EVALUACIÓN DE LA PLASMOCITOSIS MEDULAR

El mieloma múltiple es una enfermedad caracterizada por una proliferación de células plasmáticas patológicas en la médula ósea, que son capaces de producir una proteína monoclonal o componente M. Debido a estas dos características fundamentales de la enfermedad, salvo excepciones (mieloma no secretor, plasmocitomas extramedulares), el estudio de médula ósea y la detección del componente M son la base del diagnóstico de Mieloma.

La evaluación de la respuesta al tratamiento se basaba inicialmente en la medición de la reducción del componente monoclonal en sangre y orina, sin dar especial importancia a la reducción de la plasmocitosis medular. En el año 1998 el EBMT publica nuevos criterios de evaluación de la respuesta en el Mieloma (Bladé et al, 1998). Se acepta internacionalmente la definición de Remisión Completa basada en la demostración de <5% de células plasmáticas en médula ósea. A partir de ese momento se incluye el estudio de médula ósea en la evaluación de la respuesta al tratamiento. En estos criterios del EBMT no se especificaba la técnica con la que cuantificar la plasmocitosis medular. Dependiendo del país, e incluso del centro, la plasmocitosis medular se analizaba por estudios citológicos, histológicos o ambos.

Las discrepancias entre el porcentaje de células plasmáticas en el aspirado versus la biopsia de médula ósea han sido ampliamente estudiadas.<sup>16,71</sup> EL estudio de médula ósea se realiza de manera sistemática en el momento del diagnóstico de mieloma desde muy antiguo, sin embargo, en la evaluación a la respuesta al tratamiento, el estudio de médula ósea se incorporó a la práctica clínica a raíz la publicación de los criterios del EBMT. Esto explica que la mayoría de estudios que comparan las dos técnicas se hayan realizado en médulas con alta infiltración medular. Todos los grupos defienden la superioridad de la biopsia de médula ósea frente al aspirado de médula ósea en la cuantificación de células plasmáticas. Justifican el menor porcentaje de células plasmáticas cuantificado en el aspirado, por la fibrosis que frecuentemente se observa, o la tendencia a la infiltración focal, ambas características de la infiltración del mieloma en el momento del diagnóstico. Hay muy pocos trabajos publicados que evalúen el valor del aspirado vs. la biopsia tras el tratamiento.

En 2001 Rajkumar et al. estudian el porcentaje de infiltración medular en AMO vs BMO en pacientes con mieloma en recaída que son sometidos a trasplante. Las medias de infiltración son similares en las dos técnicas (20 vs. 25%) y ninguna se correlaciona con una mejor supervivencia<sup>72</sup>. Más tarde, en el 2008, el grupo del hospital de Hammersmith (Joshi R et al, 2008)<sup>21</sup> estudia 106 médulas de pacientes con mieloma en diferentes momentos tras el tratamiento. Una vez más, demuestran superioridad de la BMO vs. el AMO en la cuantificación de células plasmáticas. En este estudio el 90% de los pacientes tenían enfermedad medible por electroforesis. Como hemos visto, los únicos estudios que comparan el valor del AMO vs la BMO en la evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma, evalúan pacientes con enfermedad residual medible por inmunofijación. Nuestro estudio es el primero que se realiza en pacientes con IF negativa.

Ninguno de los 62 pacientes evaluados tenía enfermedad medible por electroforesis ni inmunofijación. EL porcentaje de células plasmáticas totales cuantificado por histología con técnicas de IHQ fue superior al observado por la citología, con una media de infiltración de 3,5 vs 2%. La citometría de flujo fue la técnica que menores valores detectó con una media de 0,295%. Esta baja infiltración por CMF probablemente se deba a dilución de la muestra en el proceso de aspiración y al procesamiento de la médula para técnicas inmunofenotípicas. Al igual otros grupos han demostrado en el momento del diagnóstico, en nuestro estudio, la inmunohistoquímica muestra superioridad respecto a la citología y la citometría de flujo en la cuantificación de células plasmáticas también en pacientes con IF negativa.

Estudiamos la correlación entre las tres técnicas con un análisis de regresión de Pearson, y únicamente encontramos una baja correlación entre la citología y la CMF. No observamos correlación entre la CMF-IHQ, ni entre la citología y la histología. Llama la atención la ausencia de correlación entre la citología y la IHQ. La metodología utilizada en ambas técnicas en la estimación de la plasmocitosis es similar (tinción de las muestras y observación al microscopio óptico) por lo que cabría esperar una buena correlación entre ambas. Quizá esto pueda ser explicado por la tendencia a la disposición focal que presentan las células plasmáticas. Esto justifica también la correlación entre la citología y la CMF, puesto que ambas técnicas estudian el AMO, en el que existe mayor homogeneidad de la muestra que en la BMO, donde podemos observar la focalidad.

La remisión completa tradicional en el mieloma, introducida por Bladé et al., exige la ausencia de componente monoclonal en sangre y orina y <5% células plasmáticas en médula ósea. Analizamos la concordancia entre la citología y la IHQ en clasificar a los pacientes en remisión completa. Observamos una concordancia muy baja entre ambas técnicas. En el 77% de las muestras (64 casos) las dos técnicas coincidían en clasificar a los pacientes en RC o no. La mayor discrepancia la observamos en los casos que no estaban en RC. Entre estos pacientes, la no concordancia se debía en un 79% de los casos (15 casos de los 19) a que la IHQ detectó un mayor número de células plasmáticas que la citología. Este resultado apoya una vez más que la cuantificación de células plasmáticas en la BMO es mayor que en el AMO. El impacto sobre la supervivencia se explica más adelante (apartado 5.3.).

## 5.2. DETECCIÓN DE CLONALIDAD

Desde la publicación de los criterios de EBMT con la incorporación de la remisión completa a la práctica clínica, el impacto de ésta fue validado extensamente<sup>73</sup> of whom 395 patients received intensive therapy supported by autologous stem cells within the first year. Survival times were calculated after 1 and 2 years from the start of chemotherapy. On the basis of the response status after a 2-year landmark, the subsequent median survival was 9.7 years for patients with CR, 4.4 years for those with PR and 2.7 years for patients with NR (P<0.001.<sup>74</sup> Con la aparición de nuevas terapias más efectivas, se observó que un gran número de pacientes obtenía RC. Sin embargo, un alto porcentaje de éstos recaían. Esto hizo sospechar que en estos pacientes persistía una pequeña enfermedad residual que no era capaz de detectar las técnicas que se estaban utilizando hasta ese momento para evaluar la enfermedad. Con la intención de diferenciar a aquellos pacientes que obtenían mejores resultados de aquellos que recaían, el grupo internacional de mieloma (IMWG) publicó en el año 2006 unos nuevos criterios de evaluación de la respuesta al tratamiento, y añadieron el criterio de remisión completa estricta que requiere además de la presencia de <5% de células plasmáticas, la ausencia de clonalidad y la ausencia de cadenas libres en suero. En este momento se incluyen por primera vez las técnicas histológicas para la detección de clonalidad. Según estos criterios, para obtener la RC estricta era necesario descartar clonalidad por IHQ o por inmunofluorescencia. Por tanto, se incorpora la realización de biopsia de médula ósea en la evaluación de la respuesta al tratamiento. En el año 2011, la CMF es incorporada a los nuevos criterios de respuesta, en los que la clonalidad en la MO

puede ser estudiada por cualquiera de los dos métodos: la tradicional IHQ utilizada hasta el momento, o la CMF de 2 o 4 colores.

Inicialmente analizamos la concordancia entre las dos técnicas propuestas por el IMWG (IHQ y la CMF) en detectar persistencia de CP clonales tras el tratamiento. También estudiamos la capacidad de detectar clonalidad por estudios moleculares con los resultados obtenidos por PCR fluorescente. La CMF detectó clonalidad en el 41% de los casos (38 de 92 muestras). Sin embargo, la IHQ únicamente detectó CP clonales en el 10% de las muestras (9 de 82 casos). Los estudios moleculares detectaron clonalidad en el 27% de las muestras (9 de 33 muestras). Por lo tanto, la CMF fue la técnica con mayor capacidad para detectar clonalidad, y por tanto la técnica más sensible. La concordancia entre las tres técnicas fue muy baja.

La CMF y la IHQ coincidieron en la presencia/ausencia de clonalidad en el 55% de las muestras analizadas (47 de 85 muestras). La mayor concordancia se observó en muestras en las que ninguna técnica detectó clonalidad. Llama la atención que en 33 de los 85 casos (39% de las muestras), la CMF detectó clonalidad en muestras en las que la inmunohistoquímica no demostró persistencia de enfermedad. Estos dos hallazgos apoyan nuestra hipótesis de que la CMF de baja resolución es más sensible que la IHQ convencional. Por lo observado en nuestro estudio, aquellas muestras en las que la CMF no detecta clonalidad, con alta probabilidad presentarían ausencia de clonalidad demostrada en la BMO. Por el contrario, si únicamente realizásemos IHQ para evaluar la clonalidad, un 39% de médulas serían clasificadas como normales, mientras que la CMF demostraría persistencia de enfermedad en esas muestras. Por lo observado, consideramos que no son técnicas comparables en la detección de clonalidad.

Como hemos explicado previamente, el criterio de remisión completa estricta exige no solo la presencia de menos de un 5% de células plasmáticas, sino que además estas CP no sean clonales, y la normalización de cadenas ligeras libres en suero. Analizamos los pacientes que tenían <5% CP clonales y comparamos los resultados por CMF e IHQ.

La CMF demostró >5% CP clonales en el 41% de las muestras (37 de 86). La IHQ demostró >5% CP clonales en el 29% (25 muestras). Estos 25 casos no cumplían alguno de los dos criterios o ninguno: 3 muestras presentaban >5% de células plasmáticas clonales,

en 4 muestras el número de CP era <5% pero se observó clonalidad, y 18 muestras (20% de las muestras totales) presentaban únicamente exceso de CP. En estas 18 muestras la IHQ no demostró clonalidad en ninguna de ellas, y la CMF únicamente en 4 de las muestras. Como hemos visto anteriormente, la cuantificación de células plasmáticas en la BMO por IHQ es mayor que la estimada por CMF o citología, incluso en muestras con muy baja infiltración medular. Esto explica que los porcentajes estimados por la IHQ superen el 5% de CP en muestras en las que, a pesar de tener exceso de células plasmáticas, no se demuestra clonalidad. Siendo riguroso, el criterio de remisión completa exige <5% de células plasmáticas, y el de RC estricta que este <5% de CP no sea clonal. En nuestra muestra, si la estimación de la plasmocitosis la realizamos por IHQ, estaríamos clasificando a un 20% de pacientes como no RC, cuando en realidad ese exceso de CP no presenta clonalidad. La plasmocitosis policlonal<sup>75</sup> se ha descrito en el mieloma múltiple como parte de un fenómeno de reconstitución inmune<sup>76,77,78</sup>. Este hallazgo se ha asociado a buen pronóstico. Según lo expuesto, consideramos que, en la evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma, el criterio de remisión completa debería ser redefinido, ya que hay un elevado porcentaje de pacientes que presentan exceso de CP (>5%) tras el tratamiento, pero éstas CP no son patológicas, y por tanto, no reflejan persistencia de enfermedad. En estos pacientes, lo importante en la evaluación de la respuesta al tratamiento, no es alcanzar un número bajo de células plasmáticas, sino la ausencia de clonalidad.

### 5.3. ANALISIS DE SUPERVIVENCIA

En el momento de nuestro análisis, 10 pacientes habían fallecido y 21 habían progresado. La supervivencia global de la serie fue 161 meses con una mediana de 196 meses, y la supervivencia libre de progresión fue de 117 meses con una mediana de 182 meses.

#### 5.3.1. REMISIÓN COMPLETA

El impacto pronóstico de alcanzar remisión completa ha sido ampliamente validado por muchos grupos<sup>79,80,81,82</sup> desde la incorporación de ésta a los criterios de respuesta del mieloma. Alcanzar remisión completa después del trasplante de médula ósea se consideraba un paso crucial para una supervivencia prolongada. Esto fue evaluado con las terapias antiguas, que no obtenían resultados tan eficaces como los actuales tratamientos. Es indudable que aquellos pacientes que alcanzan remisión completa tendrán una supervivencia libre de progresión más duradera que aquellos que alcanzan remisión parcial. Sin embargo, pocos estudios han evaluado la importancia de alcanzar RC en pacientes con inmunofijación negativa. En el año 2011 dos publicaciones defienden la importancia del estudio morfológico de médula ósea en pacientes con inmunofijación negativa. El grupo de la clínica Mayo<sup>83</sup> on achieving immunofixation-negative status, patients with less than 5% plasma cells in the BM had improved overall survival compared with those with 5% or more BM plasma cells (6.2 years vs 2.3 years, respectively; P = .01 estudia la médula ósea de 92 pacientes con inmunofijación negativa en sangre y orina y observa que un 14% de los pacientes no está en remisión completa y que la supervivencia global de estos pacientes es menor. Al igual que este grupo, nosotros encontramos que el 14% de los pacientes estudiados (8 de los 57) no estaban en RC morfológica. Este porcentaje ascendía a 25% (14 de 58 pacientes) cuando la plasmocitosis se cuantificó por técnicas inmunohistoquímicas. Estos pacientes que no alcanzaron RC presentaron una SLP menor que los pacientes que alcanzaron RC, tanto si la RC se estimó por estudios morfológicos en el aspirado medular como por IHQ en la BMO. Aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Fernández de Larrea et al.<sup>84</sup> P = .009 estudiaron el valor del aspirado de médula ósea en 35 pacientes que adquieren inmunofijación negativa tras el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. En su serie todos los pacientes estaban en remisión

completa. Ellos observan que, entre los pacientes que alcanzan remisión completa, aquellos que tienen menos de 1,5% CP tras el trasplante presentan una supervivencia libre de progresión mayor que los pacientes que tienen más de 1,5% CP. Al igual que el grupo catalán, intentamos establecer mediante curvas ROC un punto de corte predictivo para progresión y supervivencia. Pero en nuestra serie no encontramos un valor que fuese predictivo para la progresión. Esto puede deberse en primer lugar al diseño del estudio: su muestra es muy homogénea ya que analizaron pacientes que obtienen IF negativa tres meses tras el TASPE, mientras que nuestra muestra está constituida por pacientes que alcanzan IF negativa en cualquier momento de la enfermedad. En segundo lugar, a diferencia que en la serie del grupo catalán, no todos los pacientes estaban en RC: la plasmocitosis medular mostró un rango muy amplio (0 a 14% de CP), con una mediana de 2%, mientras que en su serie todos los pacientes estaban en RC, con una mediana de 0,8%

Observamos que los pacientes que no alcanzan RC morfológica (estimada en el AMO), recayeron con mayor frecuencia que los que alcanzan RC, con porcentajes de 37% y 32% respectivamente. A pesar de que las tasas de recaída son menores en los pacientes que alcanzan RC, casi un tercio de los pacientes con <5% CP tras el tratamiento recayeron. Esto se cumplió cuando la RC se cuantificó en el AMO pero no en la BMO. Los pacientes que no alcanzaron RC estimada en la BMO por IHQ, tuvieron una tasa de recaída menor que los que alcanzaron RC (28% vs. 37%). Observamos que dentro del grupo con >5% CP tras el tratamiento (14 pacientes), en 10 pacientes se demostró que la plasmocitosis era policlonal. Esto puede justificar que, en nuestra serie, los pacientes con mayor plasmocitosis estimada por IHQ recayesen menos, ya que la plasmocitosis policlonal que aparece tras el tratamiento, se ha asociado a buen pronóstico.

#### 5.3.2. CLONALIDAD

Uno de los objetivos primarios del presente trabajo era comparar la capacidad de la IHQ vs CMF para demostrar clonalidad en MO, y su impacto en la supervivencia. Como hemos comentado anteriormente, para obtener el actual criterio de respuesta completa estricta, se requiere, entre otros, ausencia de clonalidad estimada por IHQ o por CMF, sin especificar qué técnica utilizar.

En nuestra serie, los pacientes en los que no se demostró clonalidad por técnicas inmunohistoquímicas tuvieron una mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global que aquellos en los que se detectó clonalidad. La IHQ demostró clonalidad únicamente en 6 pacientes (10%); el 50% de ellos recayeron. Este porcentaje de recaídas desciende a 32% en los pacientes en los que la IHQ no demostró clonalidad. Por tanto, la demostración de clonalidad por técnicas inmunohistoquímicas se asocia a una alta probabilidad de recaída. En nuestra opinión, creemos que esto se debe a que la sensibilidad, y por tanto la capacidad de detectar clonalidad, de la IHQ en muestras con muy poca enfermedad es baja. La IHQ solo es capaz de detectar CP clonales en muestras con alta infiltración medular, y por tanto muestras con mayor probabilidad de recaída debido a la poca profundidad de la respuesta.

Los pacientes en los que la CMF no detectó clonalidad, mostraron una supervivencia libre de progresión mayor que los pacientes en los que se detectó persistencia de CP clonales. El mismo impacto se observó en la supervivencia global. Los pacientes en los que la CMF detectó clonalidad, recayeron con mayor frecuencia que aquellos que en los que no demostró clonalidad (45% vs 25%).

Analizamos la clonalidad detectada por CMF y por IHQ de 20 pacientes que progresaron de nuestra serie. La IHQ había detectado clonalidad únicamente en 3 de estos pacientes (15%), mientras que la citometría de flujo detectó clonalidad en 12 pacientes (60%). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que la citometría de flujo es una técnica más sensible que la inmunohistoquímica para detectar clonalidad en médulas con muy baja infiltración medular.

Analizamos la supervivencia en función de la magnitud de la EMR medida por CMF: pacientes con EMR negativa o baja EMR ( $\leq 0,01\%$ ), frente a pacientes con EMR alta ( $> 0,01\%$ ). Observamos que los pacientes con EMR baja o negativa tuvieron mejor SLP y SG que los pacientes con alta EMR. Lo mismo observamos al analizar únicamente a los pacientes con EMR positiva: los pacientes con EMR  $\leq 0,01\%$  tuvieron mejor SLP y SG que los pacientes con EMR  $> 0,01\%$ . Esto coincide con lo observado por Martínez- Sánchez et al.<sup>62</sup> Defiende que la profundidad de la respuesta al tratamiento tiene impacto en la supervivencia.

### 5.3.3. OBTENCIÓN DE <5% CP CLONALES

En nuestra serie, los pacientes con <5% de células plasmáticas clonales analizadas por citología y CMF, tuvieron mayor SLP y SG que los pacientes con >5% CP clonales. Cuando la estimación se realizó por IHQ, los resultados fueron contradictorios: pacientes con >5% CP clonales presentaron una SLP y SG más prolongadas que los que la IHQ detectaba <5% CP clonales. Entre los pacientes con <5% CP clonales, la CMF detectó clonalidad en el 75% de los pacientes que recayeron. Por tanto, cuando la plasmocitosis y clonalidad se estudia por IHQ, la obtención de <5% CP clonales no se asocia a mejor supervivencia. Una vez más, este resultado apoya nuestra hipótesis de que la IHQ es menos sensible que la CMF en la detección de enfermedad residual en pacientes con IF negativa.

En aquellos pacientes que no estaban en RC por IHQ, observamos que los pacientes en los que la CMF detectó una EMR alta ( $> 0,01\%$ ) presentaron una SLP menor que los pacientes en los que la CMF detectó EMR baja. Por lo tanto, en pacientes que no están en RC por IHQ, la CMF es capaz de discriminar aquellos pacientes que tendrán mejor supervivencia en función de la magnitud de la EMR.

La biopsia de médula ósea, necesaria para el estudio inmunohistoquímico, es una técnica incómoda para el paciente, y costosa en términos de tiempo, por el procesamiento de la muestra. En contra, el aspirado de médula ósea es poco doloroso y rápido para el paciente y para el procesamiento de las muestras. Por todo lo expuesto hasta ahora, la biopsia de médula ósea no parece que aporte ninguna información que justifique su realización en la evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma.

### 5.3.4. REMISIÓN COMPLETA ESTRICTA

Se han realizado varios estudios analizando el valor de la obtención de un ratio normal de cadenas ligeras libres en suero tras el tratamiento. Sin embargo, los resultados son contradictorios<sup>42,70,45</sup>. Dispenzieri et al. observan que la obtención de un ratio de cadenas libres en suero normal se asocia a mayor SLP y SG incluso en pacientes que no alcanzan RC. Martínez- López et al. observan que la obtención de un ratio de cadenas libres normal no discrimina pacientes con mayor riesgo de progresión. En nuestra serie, los pacientes con ratio de CLS normal y ratio alterado tuvieron una SLP y SG similar. El porcentaje de progresión entre los pacientes con ratio normal y alterado fue similar (26% y 28% respectivamente). Nosotros defendemos que en pacientes con IF negativa, obtener un ratio de CLS normal no discrimina pacientes con menor riesgo de progresión.

Respecto a la obtención de RC estricta, el análisis de cadenas libres en suero no aporta ningún dato adicional a la obtención de <5% CP clonales. Los resultados de supervivencia en función de la RC estricta fueron equiparables a los obtenidos únicamente con el análisis del porcentaje de CP clonales: por CMF y citología, los pacientes en RC estricta tuvieron una mayor SLP y SG que los que no estaban en RC estricta; estimada por IHQ, los pacientes que no estaban en RC estricta presentaron una SLP y SG mayor que los que estaban en RC estricta. Los resultados fueron similares, pero al añadir el ratio de cadenas ligeras libres en suero, no se alcanzó significación estadística (que si ocurrió alcanza cuando solo se analizó el % de CP clonales). Por lo tanto, en pacientes con IF negativa, obtener <5% CP clonales tiene mayor impacto en la supervivencia que obtener RC estricta. Dado que el ratio de cadenas ligeras libres en suero no aporta un valor añadido a la presencia/ausencia de clonalidad, consideramos que el criterio de RC estricta debería ser redefinido.

Únicamente encontramos un subgrupo de pacientes con <5% de CP clonales estimadas en la BMO, en los que la obtención de un ratio normal de cadenas ligeras libres en suero se asoció a mejor SLP, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Observamos que, entre los pacientes que no están en RC estricta estimada por IHQ, aquellos pacientes con EMR baja detectada por CMF tenían una SLP mayor, que los que tenían una EMR alta (>0,01%). Por lo tanto, entre los pacientes con persistencia de enfermedad estimada por IHQ, la CMF es capaz de discriminar dos grupos de pacientes en función de la magnitud de la EMR.

### 5.3.5. ENFERMEDAD DETECTADA SOLO POR CMF

Los pacientes en los que ninguna de las técnicas utilizadas detectó enfermedad residual, tuvieron una SLP y SG mayor que los pacientes en los que únicamente la CMF detectó EMR. Observamos que el porcentaje de recaídas en pacientes sin enfermedad residual fue muy inferior al de pacientes en los que sólo la CMF detectaba enfermedad (15% vs. 65%). De igual manera, ninguno de los 20 pacientes sin enfermedad medible fallece, mientras que el 44% con solo EMR+ fallece. Por lo tanto, aquellos pacientes en los que, tras el tratamiento, ninguna técnica detecta persistencia de enfermedad tienen impacto pronóstico positivo.

### 5.3.6. PRESENCIA DE BANDAS OLIGOCLONALES

La aparición de bandas oligoclonales como reflejo de una respuesta humoral oligoclonal es un acontecimiento bien conocido tras el tratamiento del mieloma múltiple<sup>32,34,87,88</sup> y posteriormente Fernández Larrea et al<sup>89</sup> 54.5% estudiaron su prevalencia en pacientes tratados con nuevas terapias vs pacientes terapias convencionales, encontrando una mayor prevalencia en los pacientes que habían recibido nuevos agentes (11 vs 65%). En nuestra serie, 39 de los 59 pacientes estudiados (66%) presentaban bandas oligoclonales. Hubo pocas diferencias entre los pacientes que recibieron TASPE y aquellos que no lo recibieron (64 vs.70%). Esto probablemente se deba a que 34 de los 44 pacientes (77%) que recibieron TASPE, fueron tratados con nuevas terapias como parte del acondicionamiento. Al igual otros grupos grupos de trabajo,<sup>90</sup> observamos que los pacientes que habían recibido nuevas terapias tuvieron una mayor incidencia de bandas oligoclonales que los que fueron tratados con quimioterapia convencional (70% vs 45%). En nuestro estudio, los pacientes que presentaban bandas oligoclonales tras el tratamiento tuvieron una supervivencia libre de progresión y supervivencia global más prolongada que aquellos que no las presentaban con medias de 114 vs. 127 para SLP (p= 0,43) y 141 vs. 170 para SG (p=0,1). Aunque hay grupos que ponen en duda el impacto pronóstico de la aparición de bandas oligoclonales tras el tratamiento,<sup>91</sup> en nuestra serie se asocia a buen pronóstico.

## **CONCLUSIONES**

---

1. La cuantificación de células plasmáticas en médula ósea analizada por inmunohistoquímica es mayor que la estimada por citología o citometría de flujo.
2. En la evaluación de la respuesta al tratamiento en el mieloma múltiple la citometría de flujo de baja resolución es más sensible que la inmunohistoquímica en detectar persistencia de enfermedad, y debería ser el método de elección para detectar clonalidad.
3. La remisión completa en aquellos enfermos que tienen una infiltración mayor del 5% por técnicas citológicas, debería ser redefinida añadiendo como criterio la ausencia de clonalidad mediante citometría y/o inmunohistoquímica
4. La biopsia de médula ósea no es necesaria de manera rutinaria en la evaluación de la respuesta al tratamiento del mieloma.
5. El estudio de cadenas ligeras libres en suero en pacientes con IF negativa no identifica pacientes con mayor riesgo de progresión.
6. La aparición de bandas oligoclonales tras el tratamiento se asocia a mejor pronóstico en pacientes con IF negativa.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

1. H. Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, S. Jaffe E, A. Pieri S SH. *WHO Classifications of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.; 2008.
2. Kenneth Kaushansky, MACP, Josef T. Prchal, Oliver W. Press MAL. *Williams Hematology*. 9th ed. New York: Mc GrawHill; 2016.
3. Kyle RA, Child JA, Anderson K, et al. *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: A report of the International Myeloma Working Group*. *Br J Haematol*. 2003;121(5):749-757.
4. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. *Blood*. 2009;113(22):5412-5417.
5. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. *Multiple myeloma*. *Lancet*. 2009;374(9686):324-339.
6. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-e548.
7. Ribourtout B, Zandecki M. *Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders*. *Morphologie*. 2015;99(325):38-62.
8. Lichtman MA, Shafer JA, Felgar RW WN. *Lichtman's Atlas of Hematology*. Mc Graw Hill; 2016.
9. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, et al. *Bone marrow histology in myeloma: its importance in diagnosis, prognosis, classification and staging*. *Br J Haematol*. 1982;51(3):361-375.
10. Naresh KN, Lampert I, Hasserjian R, et al. *Optimal processing of bone marrow trephine biopsy: the Hammersmith Protocol*. *J Clin Pathol*. 2006;59(9):903-911.
11. O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. *CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker*. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(2).
12. Wei a, Juneja S. *Bone marrow immunohistology of plasma cell neoplasms*. *J Clin Pathol*. 2003;56(6):406-411.

13. Majumdar G, Grace RJ, Singh AK, Slater NG. The value of the bone marrow plasma cell cytoplasmic light chain ratio in differentiating between multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leuk Lymphoma*. 1992;8(6):491-493.
14. Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica*. 2009;94(11):1599-1602.
15. Mike Leach, Mark Drummond, Allyson Doig. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. United Kingdom: Willey-Blackwell.; 2013.
16. Terpstra WE, Lokhorst HM, Blomjous F, Meuwissen OJ, Dekker a W. Comparison of plasma cell infiltration in bone marrow biopsies and aspirates in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1992;82(1):46-49.
17. Subramanian R, Basu D, Dutta TK. Prognostic significance of bone marrow histology in multiple myeloma. *Indian J Cancer*. 2009;46(1):40-45.
18. Subramanian R, Basu D, Dutta TK. Significance of bone marrow fibrosis in multiple myeloma. *Pathology*. 2007;39(5):512-515.
19. Charles KS, Winfield DA, Angel C, Goepel J. Audit of bone marrow aspirates and trephine biopsies in multiple myeloma - A single centre study. *Clin Lab Haematol*. 2004;26(6):403-406.
20. Stifter S, Babarović E, Valković T, et al. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagn Pathol*. 2010;5:30.
21. Joshi R, Horncastle D, Elderfield K, Lampert I, Rahemtulla a, Naresh KN. Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients. *J Clin Pathol*. 2008;61(2):213-216.
22. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, Braylan RC, Douglas-Nikitin VK. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 2007;38(12):1779-1787.
23. Matsue K, Matsue Y, Kumata K, et al. Quantification of bone marrow plasma cell infiltration in multiple myeloma: usefulness of bone marrow aspirate clot with CD138 immunohistochemistry. *Hematol Oncol*. May 2016.
24. Ng AP, Wei A, Bhurani D, Chapple P, Feleppa F, Juneja S. The sensitivity of CD138 immunostaining of bone marrow trephine specimens for quantifying marrow involvement in MGUS and myeloma, including samples with a low percentage of plasma cells. *Haematologica*. 2006;91(7):972-975.
25. Vincent Rajkumar S. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014;89(10):999-1009.
26. Lee N, Moon SY, Lee J-HH, et al. Discrepancies between the percentage of plasma cells in bone marrow aspiration and BM biopsy : Impact on the revised IMWG diagnostic criteria of multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017;7(2):1-4.
27. van der Velden VHJ, Hochhaus a, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2003;17(6):1013-1034.
28. Martinez-Lopez J, Fern??ndez-Redondo E, Garc??a-S??nchez R, et al. Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma: Results from a GEM/PETHEMA study. *Br J Haematol*. 2013;163(5):581-589.
29. Compagno M, Mantoan B, Astolfi M, Boccadoro M, Ladetto M. Real-Time Polymerase Chain Reaction of Immunoglobulin Rearrangements for Quantitative Evaluation of Minimal Residual Disease in Myeloma. In: *Multiple Myeloma*. Vol 113. New Jersey: Humana Press; 2005:145-164.
30. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. No Title. *Leukemia*. 2003;17(12)..
31. Wadhera RK, Kyle RA, Larson DR, et al. Incidence, clinical course, and prognosis of secondary monoclonal gammopathy of undetermined significance in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2011;118(11):2985-2987.
32. Hovenga S, de Wolf JT, Guikema JE, et al. Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma after VAD and EDAP courses: a high incidence of oligoclonal serum Igs post transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(7):723-728.
33. Liu AJ, Zong H, Yang GZ, Zhai YH, Li LH. Significance of oligoclonal bands after stem cell transplantation in multiple myeloma cases. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2012;13(4):1483-1486.

34. Jimenez-Zepeda VH, Reece DE, Trudel S, et al. Oligoclonal and monoclonal bands after single autologous stem cell transplant in patients with multiple myeloma: impact on overall survival and progression-free survival. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(10):2284-2289..
35. Fujisawa M, Seike K, Fukumoto K, et al. Oligoclonal bands in patients with multiple myeloma: Its emergence per se could not be translated to improved survival. *Cancer Sci*. 2014;105(11):1442-1446. .
36. Davids MS, Murali MR, Kuter DJ. Serum free light chain analysis. *Am J Hematol*. 2010;85(10):787-790.
37. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta*. 2014;427:15-20.
38. Siegel D, Bilotti E, van Hoeven KH, Siegel E.; van Hoeven, K. H. D. B. Serum Free Light Chain Analysis for Diagnosis, Monitoring, and Prognosis of Monoclonal Gammopathies. *Labmedicine*. 2009;40(6):363-366.
39. Kröger N, Asenova S, Gerritzen A, Bacher U, Zander A. Questionable role of free light chain assay ratio to determine stringent complete remission in multiple myeloma patients. *Blood*. 2010;115(16):3413-3414.
40. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(9):1467-1473.
41. Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, et al. Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4529-4535. .
42. Martínez-López J, Paiva B, López-Anglada L, et al. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood*. 2015;126(7):858-862.
43. Asenova S, Bacher U, Gerritzen A, Zander AR, Kroeger N. Role of free light chain assay ratio to distinguish between CR according EBMT criteria or stringent complete remission (sCR) according IMWG in multiple myeloma patients. *Blood*. 2009;114(22):1787a.
44. Iwama K, Chihara D, Tsuda K, Ugai T, Sugihara H, Nishida Y. Normalization of free light chain kappa / lambda ratio is a robust prognostic indicator of favorable outcome in patients with multiple myeloma. 2012;90(Cml):134-141..
45. Proposed guidelines for protocol studies. II. Plasma cell mieloma. Prepared by a Committee of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force, National Cancer Institute. *Cancer Chemother REp* 3. 1968;1(1):17-39.
46. Grande- García G M-SP. Terapéutica. Mieloma Múltiple. *JANO*. 2003;59(1459):25-27.
47. Bladé J, Samson D, Reece D, et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1115-1123.
48. Kyle RA, Rajkumar V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1):3-9. .
49. Rajkumar SV, Harousseau J-L, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011;117(18):4691-4695.
50. Woessner S, Florensa L. La Citología Óptica En El Diagnóstico Hematológico. 5th editio. Acción Médica S.A. y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia.; 2006.
51. Iakovleva S V. [The prognostic significance of cytological study of the bone marrow in multiple myeloma]. *Ter Arkh*. 2000;72(7):48-51.
52. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
53. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(5):728-732.
54. Arroz M, Came N, Lin P, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*. 2015:31-39.
55. Paiva B, Cedena M-T, Puig N, et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood*. 2016;127(25):3165-3174.

56. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2015;0(January)
57. Mike Leach, Mark Drummond AD. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. United Kingdom,: Willey-Blackwell; 2013.
58. Paiva B, García-sanz R, Miguel JFS. Multiple Myeloma Minimal Residual Disease. :103-122.
59. Paiva B, Vidriales M-B, Cerveró J, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112(10):4017-4023.
60. Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015:1-10.
61. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-2317.
62. Martínez-Sánchez P, Montejano L, Sarasquete ME, et al. Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-polymerase chain reaction: The prognostic impact of achieving molecular response. *Br J Haematol*. 2008;142(5):766-774.
63. S-Y LA. Fixation and fixatives. In: RC. WA and E, ed. *Laboratory Histopathology*. Edinburggh: Churchill Livingstone; 1994:4.1-1—4.1-26.
64. Bancroft J, Gamble M. *Theory and Practice of Histochemical Techniques*. 5th editio. London: Churchill Livingstone; 2002.
65. Torlakovic EE, Brynes RK, Hyjek E, et al. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow immunohistochemistry. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(4):431-449.
66. Chilosì M, Adami F, Lestani M, et al. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol*. 1999;12(12):1101-1106.
67. O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(2).
68. Singhal N, Singh T, Singh ZN, Shome DK, Gaiha M. Histomorphology of multiple myeloma on bone marrow biopsy. *Indian J Pathol Microbiol*. 2004;47:359-363.
69. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem*. 2001;47(4):673-680.
70. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009;23(2):215-224.
71. Su J-Y, Tao Y, Liu Y-Z, et al. [Comparison of bone marrow biopsy and smear efficacy in patients with multiple myeloma]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2012;20(6):1389-1391.
72. Rajkumar S V, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Methods for estimation of bone marrow plasma cell involvement in myeloma: predictive value for response and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2001;68(4):269-275.
73. Wang K.; Feng, L.; Thomas, S.; Giralt, S.; Qazilbash, M.; Handy, B.; Lee, J. J.; Alexanian, R. M. D. CR represents an early index of potential long survival in multiple myeloma. *Bone Marrow Transpl*. 2010;45(3):498-504.
74. van de Velde HJK, Liu X, Chen G, Cakana A, Deraedt W, Bayssas M. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica*. 2007;92(10):1399-1406.
75. Guikema JE, Vellenga E, Veeneman JM, et al. Multiple myeloma related cells in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 1999;104(4):748-754.
76. González-Calle V, Cerdá S, Labrador J, et al. Recovery of polyclonal immunoglobulins one year after autologous stem cell transplantation as a long-term predictor marker of progression and survival in multiple myeloma. *Haematologica*. January 2017:haematol.2016.158345.
77. Zamarin D, Devlin SM, Arcila ME, et al. Polyclonal immune activation and marrow plasmacytosis in multiple myeloma patients receiving long-term lenalidomide therapy: incidence and prognostic significance. *Leukemia*. 2013;27:2422-2424.

78. Li L, Hsu P, Patel K, Saffari Y, Ashley I, Brody J. Polyclonal plasma cell proliferation with marked hypergammaglobulinemia and multiple autoantibodies. *Ann Clin Lab Sci.* 2006;36(4):479-484.
79. Harousseau J-L, Palumbo A, Richardson PG, et al. Superior outcomes associated with complete response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone. *Blood.* 2010;116(19):3743-3750.
80. Harousseau J-L, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood.* 2009;114(15):3139-3146.
81. Gay F, Larocca A, Wijermans P, 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):3025-3031.
82. Chanan-Khan A a, Giralt S. Importance of achieving a complete response in multiple myeloma, and the impact of novel agents. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2612-2624. .
83. Chee CE, Kumar S, Larson DR, et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2009;114(13):2617-2618.
84. Fernández de Larrea C, Tovar N, Rozman M, et al. Multiple myeloma in serologic complete remission after autologous stem cell transplantation: impact of bone marrow plasma cell assessment by conventional morphology on disease progression. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(7):1084-1087.
85. Alhaj Moustafa M, Rajkumar S V, Dispenzieri a, et al. Utility of serum free light chain measurements in multiple myeloma patients not achieving complete response to therapy. *Leukemia.* 2015;29(April):1-6.
86. Hall SL, Tate J, Gill D, Mollee P. Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Clin Biochem Rev.* 2009;30(3):113-118.
87. Sucak G, Suyani E, ??zkurt ZN, Ye??in ZA, Aki Z, Yagci M. Abnormal protein bands in patients with multiple myeloma after haematopoietic stem cell transplantation: Does it have a prognostic significance? *Hematol Oncol.* 2010;28(4):180-184.
88. Zent CS, Wilson CS, Tricot G, et al. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 1998;91(9):3518-3523.
89. Fernandez de Larrea C, Tovar N, Cibeira MT, et al. Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. *Haematologica.* 2011;96(1):171-173.
90. Mark T, Jayabalan D, Coleman M, et al. Atypical serum immunofixation patterns frequently emerge in immunomodulatory therapy and are associated with a high degree of response in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2008;143(5):654-660.
91. Byrne E, Giles C, Andrews J, Rahemtulla A, Naresh KN. Lack of correlation between emergence of an abnormal protein band or of oligoclonal bands and survival in patients with multiple myeloma achieving complete remission following autologous stem cell transplantation. *Haematologica.* 2011;96(4):e29.



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Características morfológicas del mieloma.	44	<b>Figura 4.11.</b> Supervivencia según ratio de cadenas libres en suero.	127
<b>Figura 1.2.</b> Características morfológicas del mieloma II.	45	<b>Figura 4.12.</b> Supervivencia según la RC estricta por IHQ.	129
<b>Figura 1.3.</b> Biopsia de médula ósea con diagnóstico de Mieloma.	46	<b>Figura 4.13.</b> Impacto de cadenas libres en suero en pacientes con <5%CP.	130
<b>Figura 1.4.</b> Células de mieloma con pobre diferenciación (plasmablastos).	47	<b>Figura 4.14 .</b> SLP en pacientes no RC estricta según la magnitud de la EMR.	131
<b>Figura 1.5.</b> Tinción CD138 para identificar células de mieloma.	47	<b>Figura 4.15.</b> Supervivencia según la RC estricta por CMF.	133
<b>Figura 1.6.</b> Detección de células plasmáticas por CMF.	49	<b>Figura 4.16.</b> Supervivencia según la obtención de RC estricta por Citología y CMF.	135
<b>Figura 1.7.</b> Células plasmáticas patológicas.	50	<b>Figura 4.17.</b> Supervivencia en función de la presencia de bandas oligoclonales.	137
<b>Figura 1.8.</b> Células plasmáticas aberrantes.	50	<b>Figura 4.18.</b> SLP en función de la presencia de BO, estratificado por clonalidad por CMF.	139
<b>Figura 1.9.</b> Detección de pico clonal por PCR fluorescente.	53	<b>Figura 4.19 .</b> Supervivencia en pacientes con enfermedad detectada solo por CMF.	141
<b>Figura 1.10.</b> Electroforesis de proteínas normal (línea de abajo) y con bandas monoclonales.	54		
<b>Figura 3.1.</b> Aspirado de médula ósea con escasa infiltración por células plasmáticas.	87		
<b>Figura 3.2.</b> Aspirado de médula ósea en el que se observa una célula plasmática.	88		
<b>Figura 3.3.</b> Citometría de médula ósea al diagnóstico de Mieloma.	92		
<b>Figura 3.4.</b> Diagnóstico de mieloma por CMF.	92		
<b>Figura 3.5.</b> Poblaciones de células plasmáticas normales y patológicas.	93		
<b>Figura 3.6.</b> Detección de células plasmáticas clonales residuales (EMR) por CMF.	93		
<b>Figura 3.7.</b> PCR fluorescente en la evaluación de la respuesta al tratamiento .	95		
<b>Figura 3.8.</b> Ejemplos de reordenamientos de cadenas ligeras: lambda, kappa V-J y KDE.	95		
<b>Figura 3. 9.</b> Tinción CD138 para identificar células plasmáticas. <sup>68</sup> .	97		
<b>Figura 3.10.</b> Tinción para cadenas ligeras kappa-lambda <sup>2</sup> .	97		
<b>Figura 3.11.</b> Análisis de cadenas ligeras libres en suero.	100		
<b>Figura 4.1</b> Histograma de frecuencias.	106		
<b>Figura 4.2</b> Diagramas de dispersión.	106		
<b>Figura 4.3.</b> Supervivencia RC por citología.	113		
<b>Figura 4.4.</b> Supervivencia según la plasmocitosis estudiada por Inmunohistoquímica.	115		
<b>Figura 4.5.</b> Supervivencia según la clonalidad medida por IHQ.	117		
<b>Figura 4.6.</b> Gráficas de supervivencia según CMF.	119		
<b>Figura 4.7.</b> SLP en función de la EMR ( $\leq 0,01$ o EMR negativa vs $>0,01$ ).	120		
<b>Figura 4.8.</b> Supervivencia según la magnitud de la EMR.	121		
<b>Figura 4.9.</b> Supervivencia según $</>5\%$ células plasmáticas clonales.	123		
<b>Figura 4.10.</b> Supervivencia según $</> 5\%$ CP clonales por Citología y CMF.	125		

## INDICE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Clasificación de las gammapatías <sup>4</sup> .	40	<b>Tabla 4.21.</b> Tabla cruzada progresión CMF - Histología	123
<b>Tabla 1.2.</b> Criterios diagnósticos de Mieloma sintomático <sup>6</sup> .	42	<b>Tabla 4.22.</b> Supervivencia en función de la % CP clonales por IHQ	123
<b>Tabla 1.3.</b> Características inmunofenotípicas de las células plasmáticas	48	<b>Tabla 4.23.</b> Progresión según </> 5% CP clonales por Citología y CMF	125
<b>Tabla 1.4.</b> Criterios de respuesta en MM (CLMTF (1968, 1973)	58	<b>Tabla 4.24.</b> Supervivencia según </> 5% CP Clonales por Citología y CMF	125
<b>Tabla 1.5.</b> Criterios de respuesta en MM Southwest Cancer Chemotherapy Study Group (1972)	59	<b>Tabla 4.25.</b> Progresión según ratio de cadenas ligeras libres en suero	127
<b>Tabla 1.6.</b> Definición de la fase de Plateau (Medical Research Council)	59	<b>Tabla 4.26.</b> Supervivencia según ratio de cadenas libres en suero	127
<b>Tabla 1.7.</b> Criterios de respuesta, recaída y progresión (EBMT, 1998)	63	<b>Tabla 4.27.</b> Progresión según la RC estricta por IHQ	129
<b>Tabla 1.8.</b> Criterios de respuesta en el mieloma múltiple (IMWG, 2006)	67	<b>Tabla 4.28.</b> Supervivencia según la RC estricta por IHQ	129
<b>Tabla 3.1.</b> Características clínicas de los pacientes al diagnóstico	81	<b>Tabla 4.29.</b> SLP en pacientes no RC estricta según la magnitud de la EMR	131
<b>Tabla 3.2.</b> Tratamiento recibido	82	<b>Tabla 4.30.</b> SLP en pacientes no RC estricta según la magnitud de la EMR	131
<b>Tabla 3.3.</b> Datos de laboratorio al diagnóstico	82	<b>Tabla 4.31.</b> Progresión según la RC estricta por CMF	133
<b>Tabla 4.1.</b> Porcentajes de infiltración medular.	105	<b>Tabla 4.32.</b> Supervivencia según la RC estricta por CMF	133
<b>Tabla 4.2.</b> Coeficiente de correlación de Pearson	106	<b>Tabla 4.33.</b> SLP según obtención de RC estricta por Citología y CMF	135
<b>Tabla 4.3.</b> Concordancia en la valoración de la Remisión Completa	107	<b>Tabla 4.34.</b> Progresión según la obtención de RC estricta por Citología y CMF	135
<b>Tabla 4.4.</b> Concordancia clonalidad CMF - IHQ	109	<b>Tabla 4.35.</b> Supervivencia en función de la presencia de bandas oligoclonales	137
<b>Tabla 4.5.</b> Concordancia clonalidad CMF - PCR fluorescente	110	<b>Tabla 4.36.</b> Progresión en función de las bandas oligoclonales	137
<b>Tabla 4.6.</b> Concordancia clonalidad IHQ - PCR fluorescente	110	<b>Tabla 4.37.</b> SLP en función de la presencia de BO, estratificado por clonalidad por CMF	139
<b>Tabla 4.7.</b> Concordancia clonalidad <5% CP clonales	111	<b>Tabla 4.38.</b> SLP en pacientes con enfermedad detectada solo por CMF	141
<b>Tabla 4.8.</b> Progresión en función de la RC morfológica	113	<b>Tabla 4.39.</b> Progresión en pacientes con enfermedad detectada solo por CMF	141
<b>Tabla 4.9.</b> Supervivencia en función de la RC por citología	113		
<b>Tabla 4.10.</b> Progresión en función de la RC por IHQ	115		
<b>Tabla 4.11.</b> Supervivencia en función de la RC por IHQ	115		
<b>Tabla 4.12.</b> Progresión en función de la clonalidad por IHQ	117		
<b>Tabla 4.13.</b> Supervivencia en función de la clonalidad por IHQ	117		
<b>Tabla 4.14.</b> Progresión en función de la clonalidad por CMF	119		
<b>Tabla 4.15.</b> Supervivencia en función de la clonalidad por CMF	119		
<b>Tabla 4.16.</b> Progresión según la magnitud de la EMR	120		
<b>Tabla 4.17.</b> Supervivencia según la magnitud de la EMR	120		
<b>Tabla 4.18.</b> Progresión según la magnitud de EMR	121		
<b>Tabla 4.19.</b> Supervivencia libre de progresión según EMR	121		
<b>Tabla 4.20.</b> Progresión en función de % CP clonales por IHQ	122		