

## Bases biológicas y moleculares en el desarrollo de la patogenia en la enfermedad del mieloma múltiple.

*Diego Fernández-Lázaro*

Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Valladolid. Campus de Soria. España.

**Palabras clave:** mieloma múltiple; bases moleculares; micro medioambiente; inmunofenotipo; oncogen.

**Resumen.** El mieloma múltiple (MM), es una neoplasia de células B clonales con acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea (MO). Las células mielomatosas secretan una paraproteína monoclonal detectable en el suero y/u orina, y desencadenan un conjunto de alteraciones clínicas en forma de anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia o lesiones óseas. El MM representa el 1% de todas las neoplasias, el 10% de las hemopatías malignas y la segunda en orden de presencia. Su incidencia es de 4 casos por cada 100.000 habitantes y año. La mediana de edad para el diagnóstico es de 65 años y de 3 años para la supervivencia. A pesar de los avances en el tratamiento farmacológico y en los trasplantes de MO, el MM sigue siendo una enfermedad incurable. Profundizar en las bases biológicas de los mecanismos patogénicos, el conocimiento de la interacción de la célula plasmática con su micro medioambiente, la descripción de sus características antigénicas, el establecimiento de los factores pronóstico desde el punto de vista molecular, así como de los cambios de expresión génica tras el tratamiento servirá como herramienta para desarrollar futuros enfoques terapéuticos efectivos y específicos frente al MM.

## **Biological and molecular bases in the development of the pathogenic of the disease of multiple myeloma.**

*Invest Clin 2019; 60 (3): 247-264*

**Keywords:** multiple myeloma; molecular bases; cell microenvironment; immunophenotype; oncogene.

**Abstract.** Multiple myeloma (MM) is a clonal B-cell neoplasm with accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow (BM). The myelomatous cells secrete a monoclonal paraprotein detected in serum and/or urine, and trigger clinical alterations in the form of anemia, renal failure, hypercalcemia or bone lesions. The MM represents 1% of all neoplasms, 10% of malignant hemopathies and the second in order of presence. Its incidence is four cases per 100,000 inhabitants per year. The median age for diagnosis is 65 years and a three year-survival. Despite advances in pharmacological treatment and MO transplants, MM remains an incurable disease. In-depth study of the biological bases of the pathogenic mechanisms, knowledge of the interaction of the plasma cell with its microenvironment, the description of its antigenic characteristics, the establishment of prognostic factors from the molecular point of view, as well as changes in gene expression after treatment, will serve as tools for developing future effective and specific therapeutic approaches against the MM.

*Recibido 23-11-2018 Aceptado 10-07-2019*

### **INTRODUCCIÓN**

Las gammopatías monoclonales (Tabla I), constituyen un grupo de trastornos caracterizados por la proliferación clonal de células plasmáticas (CP) que producen una proteína homogénea de carácter monoclonal (componente M o paraproteína), que se detecta en suero y/o en orina (1). Según la descripción del grupo de investigación Internacional Myeloma Working Group (IMWG) (2), sobre los criterios diagnóstico para los pacientes con mieloma múltiple (MM), estos deben tener un componente M sérico superior a 30 g/L, o bien excretar más de 1 g de cadenas ligeras en la orina durante 24 horas. Además, presentar una infiltración medular ocasionada por CP superior al 10% y acompañarse de anemia, insuficiencia re-

nal, hipercalcemia y/o lesiones osteolíticas. Los valores del componente M y del grado de infiltración medular son arbitrarios, y se acepta el diagnóstico de MM con valores inferiores a los fijados, siempre que exista afectación orgánica atribuible al mieloma.

### **Epidemiología**

El MM representa el 1% de todas las neoplasias y el 10% de las hemopatías malignas. La incidencia anual es de 4 casos nuevos por 100.000 habitantes. La edad mediana de presentación se sitúa alrededor de los 65 años, es excepcional en individuos menores de 30 años (0,3% de todos los casos). Únicamente entre el 1 y el 12% de los pacientes tienen una edad menor de 40 y 50 años, respectivamente (3, 4).

**TABLA I**  
CLASIFICACIÓN DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.

Gammapatías monoclonales malignas		Gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI)
Mieloma múltiple (MM)	MM sintomático	Gammapatía monoclonal idiopática (significado incierto)
	MM quiescente	
	Leucemia de células plasmáticas	Gammapatías monoclonales transitorias en el contexto de inmunodepresión
	MM no secretor	
POEMS*		

\*POEMS: polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, componente M, alteraciones cutáneas (mieloma osteosclerótico).

### Manifestaciones clínicas

Está contrastado que el dolor óseo constituye la manifestación inicial en el 70% de los casos, lo que supone aproximadamente que el 80% de los pacientes padece osteoporosis, lesiones osteolíticas y/o fracturas patológicas (5). Los pacientes que presentan anemia se cifran en un 30%. Sin embargo, los procesos febriles asociados al MM son infrecuentes y lo sufre únicamente el 1% de los pacientes. Por otra parte, son relativamente frecuentes las infecciones pulmonares y urinarias en los pacientes de MM. Se ha comprobado que el 10% de los pacientes diagnosticados de MM presenta una insuficiencia renal que requiere tratamiento mediante diálisis. La insuficiencia renal está causada por la hipercalcemia y se reconoce como el síndrome “*riñón del mielomatoso*” (6). Los plasmocitomas extramedulares aparecen en el momento del diagnóstico aproximadamente en el 10% de los pacientes. El 20% de los pacientes presenta hepatomegalia y menos del 5% esplenomegalia. Mientras que en los pacientes con MM con amiloidosis asociada, la cual puede manifestarse en forma de síndrome nefrótico, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome del túnel carpiano, polineuropatía periférica o hipotensión ortostática, se manifiesta en un el 5% de los casos (7, 8).

### Etiología biológica del Mieloma Múltiple

El mecanismo desencadenante del MM indica que la célula clonogénica es una célula B madura, que ha pasado por el centro germinal del folículo linfoide. Estas células han sufrido el proceso de hipermutación somática y un cambio del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, lo que condiciona el cambio de isotipo de la cadena pesada de las inmunoglobulinas “*IgH switch*”. En condiciones normales, el linfocito que ha pasado por el centro germinal migra a la médula ósea donde puede permanecer durante largo tiempo como célula plasmática (9).

Una fracción considerable de los pacientes con MM tiene una fase preclínica de Gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), que permanece estable durante años hasta que se desencadena la transformación maligna, por la alteración de los mecanismos reguladores que limitaban su crecimiento (9).

### Análisis de Laboratorio: proteinograma electroforético

Una tercera parte de los pacientes presenta una cifra de hemoglobina inferior a 9 g/dL, por el contrario, los valores de leucocitos y plaquetas se encuentran en cantidades normales. En el aspirado de médula ósea suele encontrarse una infiltración medular

por CP superior al 20%. El proteinograma electroforético revela una banda homogénea en el 85% de los casos, el 15% restante muestra una electroforesis sérica normal o sólo una pequeña banda (mielomas de cadenas ligeras, algunos casos de mieloma IgG o IgA con escaso componente M y los raros casos de mieloma IgD o no secretor). En la mitad de los casos se encuentra proteinuria de cadenas ligeras. El diagnóstico de laboratorio, de tipo cualitativo, de las inmunoglobulinas por la técnica de inmunofijación resulta imprescindible para identificar la clase de inmunoglobulina que se produce en exceso y confirmar su carácter monoclonal. La distribución del MM según el tipo de inmunoglobulina es la siguiente: IgG (50-60%), IgA (20-30%), cadenas ligeras *-Bence Jones puro-* (15%), IgD (2%), no secretor (1-2%); los tipos IgE e IgM son excepcionales. La relación de cadenas ligeras kappa:lambda es de 2:1.

Con respecto a las manifestaciones clínicas, los mielomas de IgG e IgA presentan una gran similitud entre sí. De igual forma, los mielomas de cadenas ligeras e IgD presentan manifestaciones clínicas y biológicas comunes entre ellos: insuficiencia renal, hipercalemia y amiloidosis, con mayor proteinuria de cadenas ligeras que en los otros tipos MM como los de IgG e IgA (9, 10).

#### Expresión de marcadores moleculares

La célula plasmática normal que es CD38+ intensa, CD19+ y CD56-, en el proceso de transformación a célula mielomatosa, Pérez-Andrés y col. (11), describieron que hay una disminución progresiva en la expresión de CD38 desde las CP normales hasta las clonales de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), MM y leucemia de células plasmáticas (LCP). La expresión del fenotipo de la célula plasmática mielomatosa es IgS-, IgC+, CD38+ débil, CD138+ (Syndecan-1), CD19- y CD56+ (12). También, pueden mostrar una expresión variable de otros antígenos de línea B

o incluso de otras líneas hematopoyéticas (CD10, CD20, CD22, CD34, CD117). Una forma de diferenciar el MM de la GMSI es mediante el porcentaje de CP con fenotipo normal (CD19+, CD56-) o patológico (CD19-, CD56+). Esta proporción en el 98% de las GMSI tiene más de un 3% de CP normales mientras que tan solo el 1,5% de los MM tiene valores superiores al 3% (13).

#### Estudio biológico de las anomalías moleculares que dan origen a la enfermedad del Mieloma Múltiple

Los estudios moleculares han contribuido a aclarar el posible origen de las células tumorales del MM (14, 15). La transformación de un linfocito normal, en una célula B mielomatosa requiere de dos tipos de eventos oncogénicos: primarios y secundarios.

#### Traslocaciones primarias

Las traslocaciones primarias serían responsables de la yuxtaposición de un oncogen y también de la yuxtaposición del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (16, 17), que actuaría como potenciador o "enhancer". Estas traslocaciones se originan a partir de errores durante el proceso fisiológico de recombinación del ácido desoxirribonucleico (ADN), principalmente en el momento del cambio de isotipo de la IgH, e incluirían tres grandes grupos: 1) las traslocaciones que implican ciclinas: D1 (en 11q23), D3 (en 6q21) y D2 (en 12p13), que están presentes en el 20-25% de los MM; 2) las que involucran a dos genes codificados en 4p16: MMSET (*Multiple Myeloma SET domain protein*) y FGFR3 (*Fibroblast Growth Factor Receptor-3*), que están traslocados en el 15% de MM; y 3) las que implican a dos factores de transcripción: C-maf (en 16q23) y maf-B (*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma oncogene homolog B*) (en 20q11), traslocados en el 10% de MM. En el resto de los casos o no se conoce o no se produce una traslocación en IgH o Ig (18).

### Traslocaciones secundarias

Los eventos oncogénicos secundarios se caracterizan por la aparición de inestabilidad cariotípica, deleciones (*Rb*: retinoblastoma) o mutaciones génicas (*Ras*), y finalmente nuevas traslocaciones que afectarían a genes diferentes del locus de las Igs, aunque también puedan involucrar la región 14q32, como es el caso de las traslocaciones de *c-myc* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) (t(8;14), t(2;8), t(8;22)) (18).

La progresión tumoral del MM está asociada con traslocaciones cromosómicas secundarias, de las cuales *c-myc* es el modelo más representativo. Las traslocaciones secundarias en *c-*, *n-*, o *l-myc*, que están asociadas con el aumento de expresión del gen *myc*, las cuales están presentes en una baja frecuencia en tumores de MM intramedulares, pero ocurren en cerca del 50% de los tumores avanzados, y están presentes en casi todas las líneas celulares de MM. Esta desregulación de un gen *myc* podría estar asociada a que la célula mielomatosa progrese a un fenotipo más agresivo y proliferativo (19). Las alteraciones de *c-myc* en cariotipos complejos se correlacionan con estadios avanzados de la enfermedad. Las implicaciones clínicas y pronósticas de las alteraciones de *myc* son desconocidas, ya

que se trata de alteraciones poco frecuentes y no hay un número suficiente de casos como para extraer conclusiones definitivas al respecto. Probablemente tengan una incidencia negativa en la supervivencia, ya que se sospecha que representan eventos de progresión tardíos, que son más frecuentes en subgrupos de mielomas con cariotipos anormales, que tienen un índice de proliferación elevado, y un pronóstico más adverso (20, 21).

### Potenciales objetivos terapéuticos

Se ha descrito un número importante de alteraciones cromosómicas recurrentes, numéricas y estructurales, como se detalla en la Tabla II. Algunas de estas anomalías moleculares constituyen potenciales dianas terapéuticas. La activación de FGFR3, que se produce como consecuencia de la t(4;14) y las mutaciones de *Ras* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene*) (22) provocan la activación de vías de señalización proliferativas como la vía de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Erk 1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2*) y antiapoptóticas (vía de PI3K (*Phosphatidyl Inositol-3 kinase/Akt*) (*v-akt murine thymoma viral oncogene*)), que podrían contrarrestarse mediante inhibidores de quinasas y de farnesil transferasas, respectivamente.

**TABLA II**  
ALTERACIONES CITOGENÉTICAS EN MIELOMA MÚLTIPLE.

Alteraciones Translocaciones IGH	Genes Involucrados	Frecuencia 50-73%
t(11;14)	CCND1/IGH*	15
t(4;14)	FGFR3-MMSET/IGH	15
t(14;16)	IGH/CMAF	5
t(6;14)	CCND3/IGH	3
t(14;20)	IGH/MAFB	2
Monosomía/Del 13	RB1	30-55
Deleción de 17p13	P53	10

\*IGH: gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas

### **Papel de la interacción entre la célula mielomatosa y el micro medioambiente en la patogénesis del Mieloma Múltiple**

El micro medio ambiente de la médula ósea (MO) está formado por proteínas de la matriz extracelular, y por diferentes poblaciones celulares: células estromales, células endoteliales, osteoblastos, osteoclastos y linfocitos (23, 24). Durante el proceso de maduración, las células B van adquiriendo una amplia variedad de moléculas de adhesión que facilitan su regreso a la MO para continuar su diferenciación (25, 26). Una vez en la MO, las moléculas de adhesión median la interacción con otras CP, con la matriz extracelular y con las células estromales de la MO (BMSC: *Bone Marrow Stromal Cells*) (27). En el MM, la expresión de las moléculas de adhesión cambia a lo largo del curso de la enfermedad y esto puede favorecer la migración de la célula mielomatosa de la MO a la sangre periférica (27).

La adhesión de las células de mieloma al estroma de la MO, está mediada por la unión de varios tipos de receptores de membrana como CD44, CD54/ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), CD56/VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) y CD138/Syndecan-1 con sus ligandos: LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*), MUC-1 (*Mucin-1-Transmembrane*), VLA-5 (*Very Late Antigen 5*) y VLA-4 (*Very Late Antigen 4*). Syndecan-1 y VLA-4 interactúan con el colágeno y con la fibronectina, respectivamente, que son componentes de la matriz extracelular. La adhesión va acompañada de la expresión de metaloproteinasas de la matriz, como MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase-9*) que a su vez contribuye a la resorción ósea y a la movilidad de la célula mielomatosa (28). Esta unión de la célula de MM a la MO induce un fenotipo CAM-DR (*Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance*), a través de distintos mecanismos: 1) Parada de ciclo celular en G1 asociado a la sobreexpresión de p27 (inhibidor de CDKs) (26) 2) Inhibición de apoptosis mediante sobreexpresión FLIP (*FLICE In-*

*hibitory Protein*) (inhibidor endógeno del receptor Fas (CD95) que induce apoptosis) (26) y 3) Protección contra el daño al ADN producido eventualmente por fármacos, reduciendo la actividad topoisomerasa (26) La unión de VLA-4 a la fibronectina induce la sobreexpresión de 53 genes, 11 de los cuales son regulados por NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-Kappa B*) (26).

En general, estas uniones también estimulan la secreción de citocinas como la IL-6 (*Interleukin-6*) y TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) desde las células estromales y de IL-1 $\beta$  (*Interleukin-1 $\beta$* ), TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), IL-6 y VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) desde la célula mielomatosa (29). Estas citocinas y factores de crecimiento juegan un papel clave en la patogénesis del MM, ya que, al actuar con los correspondientes receptores en la CP, estimulan la expansión clonal y favorecen la destrucción ósea.

### **Características antigénicas de la célula mielomatosa**

Los estudios de investigación de las características fenotípicas de las CP en la médula ósea, presentan dificultad para identificar a las normales, debido a su escasa representación medular ( $\approx 0,25\%$  de la celularidad global de la MO) y también por la pérdida de expresión de los marcadores asociados a la línea B: receptor de célula B (RCB), receptores de complemento, antígenos HLA clase II y receptores Fc (30).

### **CD138 y CD38**

La expresión de CD138 y una reactividad muy fuerte para CD38 son los mejores marcadores para la identificación de las CP mielomatosas así como de las CP normales (31). Sin embargo, se ha demostrado que las CP mielomatosas contienen bajos niveles de CD38 comparados con las CP normales (32). Un estudio (33) confirma estos datos, puesto que han observado una disminución progresiva en la expresión de CD38 desde las CP normales hasta las clonales en la GMSI,

MM y LCP. El marcador CD38 es una molécula multifuncional capaz de traducir señales implicadas en la proliferación y diferenciación celular y en mediar la adherencia al estroma medular, entre otras funciones (34). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que el marcador CD38 desempeña un papel importante en la interacción entre la CP y el microambiente medular, y que puede influir en el destino de la CP maligna y facilitar su migración a una fase extramedular.

### Otros antígenos

Las CP mielomatosas muestran una baja reactividad o ausencia de expresión de los antígenos clásicamente considerados pan-B, tales como CD19, CD20, CD22, CD24, moléculas HLA clase II y de antígenos presentes en célula B madura como CD20 y CD23 (35). Sin embargo, expresan, con una frecuencia variable, antígenos presentes en la línea mielomonocítica, principalmente CD13 y CD33 (36).

### Moléculas de Adhesión

En el MM la CP expresa una gran variedad de moléculas de adhesión: 1.-  $\beta$ 1 integrinas: VLA-1 (CD29-CD49a), VLA-4 (CD29-CD49d) y VLA-5 (CD29-CD49e) implicadas principalmente en la unión a la matriz extracelular (37); 2.-  $\beta$ 2 integrinas: LFA-1 (CD11-CD18) que se expresa también en linfocitos y participa en la respuesta inmune e inflamatoria (38); 3.- Superfamilia de las Igs: NCAM (CD56) e ICAM-1 (CD54); 4.- Proteoglicanos: CD44 y syndecan-1 (CD138). Las moléculas de adhesión son proteínas de la superficie celular que intervienen en la interacción entre células durante la respuesta inmune normal, condicionando la migración celular y proporcionando los medios para la localización celular en un nuevo microambiente. A diferencia de las CP normales, las CP mielomatosas son por lo general CD56 fuertes, aunque no expresen otros marcadores asociados a las células natural killer (NK) (39-41). La ausencia de expresión de CD56 en el MM, se ha asociado con una enfermedad más agresiva y con la diseminación extramedular de la CP (42-44).

También se ha asociado la pérdida de intensidad de expresión del marcador CD138 con una mayor capacidad de la CP para diseminarse hacia la sangre periférica (SP) (45).

### Interleucina 6 (IL-6)

La producción de IL-6 por las células estromales de la MO, se realiza a través de la interacción entre las moléculas de adhesión de las CP mielomatosas y sus respectivos receptores presentes en las células del estroma (46). Esta citocina, IL-6, es uno de los principales factores implicados en la supervivencia y proliferación de las CP (47). La IL-6 ejerce su función a través de su unión con el receptor de IL-6 (IL-6R) constituido por dos subunidades: una subunidad a la cual se une la IL-6 (CD126) y una subunidad encargada de la transducción de la señal (CD130) (48).

### Marcadores de la célula "stem"

En relación con los marcadores asociados con la célula "stem", las CP mielomatosas no expresan CD34 (49, 50), mientras que expresan CD117 en casi un tercio de los casos con MM (51). El antígeno CD117 es un receptor tirosinquinasa que se une específicamente con el factor de crecimiento SCF ("stem cell factor"). Está presente en varios tipos de células que incluyen células hematopoyéticas normales y neoplásicas. Generalmente se expresa en un escaso porcentaje de células en la MO normal (0,5%-4%), la mayoría de ellas precursores mieloides que co-expresan CD34 (50%-70%). Además, se expresa en los mastocitos de la MO, así como en un pequeño subgrupo de células NK que demuestran una fuerte reactividad para CD56 (52).

### CD45

Las CP normales y mielomatosas no suelen expresar CD45. Sin embargo, algunos casos, especialmente con una morfología más inmadura, pueden ser CD45+ (53-55). La molécula CD45 es una glicoproteína transmembrana presente en la superficie de todas las células hematopoyéticas, excepto

en eritrocitos maduros y plaquetas. En la diferenciación linfoide B normal, la expresión de CD45 se incrementa progresivamente y alcanza su máximo valor en el linfocito B maduro. Aunque la CP también expresa CD45, su intensidad es menor que en el linfocito B maduro. Por tanto, la población de CP CD45+ en el MM corresponde a la fracción de células más proliferantes, a diferencia de las células mielomatosas con expresión débil o falta de expresión para CD45, que son menos proliferantes y que se encuentran en mayor proporción con respecto a las CD45+ (54). Se ha observado que la proporción de CP que expresan CD45 es mayor entre los pacientes con formas iniciales de la enfermedad (GMSI o mieloma múltiple quiescente: MMQ), que en los pacientes con MM sintomático o en recaída (56).

### CD28

La mayoría de las células mielomatosas de los pacientes con enfermedad avanzada expresa CD28, mientras que este antígeno no se observa en las células B o en las CP normales (57, 58). Esta molécula está ampliamente estudiada en los linfocitos T, sin embargo, su función en el MM se desconoce. En los MMQ la expresión de CD28 es rara, mientras que, por el contrario, más del 90% de los mielomas extramedulares expresa CD28 (59, 60). Por lo tanto, se puede considerar que la expresión aberrante de CD28 parece asociarse con progresión de la enfermedad (61).

En resumen, el conjunto de los datos inmunofenotípicos, sugiere que la heterogeneidad en la expresión antigénica es un factor común tanto en la CP normal como en la CP mielomatosa. En este sentido, las células mielomatosas están caracterizadas por una baja reactividad para CD38, fuerte expresión de CD56 y ausencia de expresión de CD19, a diferencia de las CP normales, las cuales son CD38+ fuertes, CD56- y CD19+.

### Factores pronóstico en relación a las características biológicas del Mieloma Múltiple

El diagnóstico de MM no acostumbra ofrecer dificultades, ya que la mayoría de los pacientes presenta síntomas propios de la enfermedad y anomalías de laboratorio que incluyen la siguiente tríada: 1) componente M sérico y/o urinario, 2) proporción de CP especificar si en es periférica o MO superior al 10% y 3) lesiones osteolíticas. Si a esto se añade que la supervivencia de los pacientes con MM es muy variable, desde unos pocos meses a más de 10 años, con una mediana de 3 años de supervivencia (62, 63), se hace evidente que el estudio de los factores implicados en el pronóstico del MM es fundamental por tres razones: para proporcionar una información más individualizada sobre el pronóstico de la enfermedad; para identificar los distintos grupos de riesgo con el fin de adaptar los tratamientos a cada grupo en particular; y para detectar asociaciones entre las características biológicas del clon tumoral y el comportamiento clínico, con el fin de entender mejor la patogenia de la enfermedad.

Por lo tanto, se hace necesario conocer las características clínicas y biológicas del MM que influyen en la supervivencia de los pacientes, aunque sólo algunas pocas constituyen factores pronóstico independientes que están relacionados con el paciente o con el clon tumoral.

### Factores relacionados con el paciente

La edad y el estado general del paciente son dos factores con valor pronóstico independiente. Los pacientes entre 60 y 70 años tienen una supervivencia más prolongada que aquellos con mayor edad (8, 64). Además, se ha descrito que los pacientes menores de 40 años con una función renal normal y con niveles bajos de B2-microglobulina, tienen una mediana de supervivencia de 8 años (3). El estado inmunológico del paciente es un factor importante en el control de la enfermedad. De hecho, se ha observado que las diferentes subpoblaciones de linfo-



citós varían a lo largo de la evolución del MM. Por otra parte, un nivel bajo de células CD4+ o alto de células CD19+ se correlaciona con una menor o mayor supervivencia, respectivamente y el estado general bueno (ECOG $\leq$ 2) confiere un pronóstico favorable a los pacientes con MM (65).

### Factores relacionados con el clon tumoral

De los parámetros relacionados con el clon tumoral que tienen valor pronóstico, cabe destacar: la morfología y el índice proliferativo de la célula plasmática, la citogenética, el inmunofenotipo y la expresión de determinados oncogenes.

### Morfología de la célula mielomatosa

A diferencia de lo que ocurre en otras hemopatías, como las leucemias o los linfomas en que la morfología es muy importante para el diagnóstico y clasificación, en el MM no se ha prestado mucha atención a la morfología de la célula plasmática. Con todo, la morfología inmadura o plasmoblástica se asocia a peor evolución y tiene valor pronóstico independiente (65). En este sentido, varios grupos (66-70) han demostrado una asociación entre la morfología plasmoblástica y un peor pronóstico, por lo que se considera que el MM plasmoblástico es una entidad particular con un comportamiento agresivo y corta supervivencia (71). La presencia de un patrón difuso de infiltración de la MO también se ha relacionado con un peor pronóstico (72).

### Índice proliferativo de la célula plasmática

La capacidad proliferativa de la célula mielomatosa que es definida por la cantidad de CP que se encuentra en fase S y evaluada mediante el índice proliferativo, ha demostrado ser uno de los factores pronóstico más importantes en los pacientes con MM (73-76).

Las mutaciones de RAS y los niveles elevados del receptor soluble de la IL-6 contribuyen a un mayor índice proliferativo de la célula mielomatosa y a una menor supervi-

encia (71). Se ha sugerido que su efecto adverso desaparece con altas dosis de quimioterapia (62), aunque un estudio señala que un índice proliferativo alto, así como la presencia de CP circulantes en SP se asocia con una supervivencia más corta tras trasplante autólogo (77). La presencia de CP con elevada tasa proliferativa en SP, probablemente refleja la independencia de señales de crecimiento por parte de las CP en las fases terminales de la enfermedad, lo que condiciona un pronóstico más adverso (78, 79).

Aquellos pacientes de MM que tienen un índice de proliferación tumoral bajo y responden con rapidez al tratamiento citostático tienen muy buen pronóstico, ya que en estos casos la respuesta rápida se debe exclusivamente a la exquisita sensibilidad de la clona mielomatosa a los citostáticos. Por el contrario, si el índice de proliferación celular es alto, una respuesta rápida se asocia a recaída temprana y a mal pronóstico (65).

### Alteraciones citogenéticas

En el MM la hipodiploidia y la presencia de cariotipos complejos, influyen de manera negativa en el pronóstico (80-82). Por el contrario, las trisomías de los cromosomas 9, 11 y 17 se asocian con una mejor supervivencia (83).

Las traslocaciones de IGH también tienen un profundo significado pronóstico en el MM. La t (11;14) (q11;q32) en algunos estudios está asociada a una mejor supervivencia, especialmente en pacientes tratados con altas dosis de quimioterapia y trasplante de progenitores hematopoyéticos (84, 85), mientras que en otros trabajos se asocia con una supervivencia similar a la que tienen los enfermos sin alteraciones citogenéticas (86). Sin embargo, dada la elevada frecuencia de la t (11;14) (q11;q32) en las líneas celulares de MM, parece que en algunos casos esta traslocación puede producir un clon de crecimiento agresivo si se adquieren aberraciones genéticas secundarias (87). Las traslocaciones t (4; 14)(p16;q32) y t(14;16)

(q32;q23), especialmente la primera, constituyen un factor pronóstico desfavorable para los pacientes con MM tratados con dosis estándar o dosis elevadas de quimioterapia (84, 86). Además, según algunos resultados preliminares, la t (14;20) se asocia también con un pronóstico adverso (88).

Por otra parte, independientemente del tratamiento (dosis estándar vs dosis elevadas de quimioterapia) y del modo de detección (cariotipo vs Hibridación fluorescente *in situ*: FISH), la  $\Delta 13$  se ha asociado con una peor supervivencia y con una respuesta escasa al tratamiento (83, 89, 90). El efecto neto de  $\Delta 13$  en el pronóstico, es mayor cuando esta alteración se observa en el cariotipo que cuando es detectada por FISH en interfase, dado que las metafases anormales indican una elevada carga tumoral y un clon más proliferativo (17, 83, 89).

Las deleciones o mutaciones del gen P53 están asociadas con progresión de la enfermedad, por lo que podrían ser reflejo de una enfermedad más agresiva y refractaria al tratamiento. Estos pacientes tienen una supervivencia corta independientemente de la modalidad terapéutica utilizada (86, 91, 92).

Las alteraciones de C-MYC en cariotipos complejos se correlacionan con estadios avanzados de la enfermedad y tienen una incidencia negativa en la supervivencia, ya que representan eventos de progresión tardíos que tienen un índice de proliferación de CP elevado, y pronóstico más adverso (21, 93). Las mutaciones de K-RAS, pero no las de N-RAS, se asocian con una supervivencia más baja (94).

### Expresión oncogénica

Las alteraciones de determinados oncogenes o genes supresores de tumores implicados en la patogenia del MM también tienen influencia pronóstica. Entre ellos destacan las mutaciones o deleciones de p53, Retinoblastoma (Rb) o K-RAS. Asimismo, la metilación del gen supresor p16 también se asocia a un pronóstico adverso (65).

### Inmunofenotipo de la célula mielmatosa

La influencia pronóstica del inmunofenotipo ha sido bastante estudiada (73, 95). Así la expresión de CD20 y de inmunoglobulinas de superficie (que identifican a las CP inmaduras), están asociadas a un pronóstico desfavorable (95). Además, la baja expresión de CD44 se han asociado con la diseminación extramedular de las CP malignas (60, 96), y la expresión de CD28 está relacionada con una fase altamente proliferativa de la enfermedad (59, 60).

### Factores relacionados con la masa tumoral

Algunos marcadores bioquímicos como la  $\beta 2M$  y la proteína C reactiva (PCR) tienen validez pronóstica y para predecir la supervivencia de los pacientes con MM. Los niveles séricos de PCR se consideran un fiel reflejo de la concentración de IL-6. La  $\beta 2M$  aumenta con la masa tumoral y el deterioro de la función renal y su aumento se correlaciona con una menor supervivencia. Además, existe un Índice Pronóstico Internacional basado en la determinación de los niveles de  $\beta 2M$  y albúmina. Este sistema permite discriminar tres grupos pronóstico independientemente de la edad, región geográfica o tipo de tratamiento, mediante parámetros fácilmente cuantificables y reproducibles (97).

### Cambios en la expresión génica tras el tratamiento con inmunomoduladores (IMiDs)

El efecto tumoricida de los inmunomoduladores (IMiDs), se produce a través de varios mecanismos, que incluyen la disminución de la producción de citoquinas y de factores de crecimiento que conducen a la interrupción de la ayuda del estroma, la inducción de genes supresores de tumores que conduzca a la parada del ciclo celular y la activación de las caspasas con inducción de apoptosis (98).

Cuando nosotros hemos realizado estudios de expresión génica (99), para conocer las alteraciones en los genes inducidas por acción de los IMiDs usados como agentes

únicos, observamos que los genes desregulados por el tratamiento de pomalidomida a tiempos cortos de exposición al fármaco, fueron el doble que los genes desregulados por lenalidomida. Al emplear tiempos más prolongados de tratamiento (con una apoptosis mayor, los genes desregulados por pomalidomida fueron casi 10 veces más que los alterados por lenalidomida (359 y 39 respectivamente), constatándose que pomalidomida además de desregular casi todos los genes de lenalidomida, es capaz de actuar sobre muchos otros genes. Estos datos apoyarían la mayor capacidad antimielomatosa de pomalidomida comparada con lenalidomida en monoterapia.

Entre las alteraciones génicas tempranas inducidas por los IMiDs cabe destacar dos genes importantes para algunas funciones biológicas del MM: IRF-4 (interferon regulatory factor 4) y MYB (Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog). Con respecto a IRF-4 que aparecería infraexpresado tras tratamiento con lenalidomida, es un oncogén regulador de la transcripción nucleolar que regula numerosos genes implicados en ciclo celular, muerte, así como otros relacionados con el aumento de la supervivencia y proliferación de las células tumorales, considerados como una nueva diana terapéutica en MM (100). El aumento de expresión de IRF-4, es muy común en MM y se asocia a mal pronóstico en comparación con los pacientes de MM con la expresión baja de IRF-4 (101). Nuestros datos de infraexpresión de IRF-4 tras tratamiento con lenalidomida coinciden con los aportados por el grupo de López-Girona que demostró infraexpresión de IRF-4 en líneas celulares de MM, diferentes a la empleada por nosotros, tras tratamiento con los IMiDs. El papel relevante que IRF-4 tiene en la patogénia del MM y los efectos antitumorales que lenalidomida ejerce a través de la disminución de la expresión de IRF-4, podría servir como biomarcador predictor de respuesta.

Además, entre los genes comunes a ambos IMiDs alterados tempranamente,

fue también reseñable la infraexpresión de MYB, que ejerce un control sobre células hematopoyéticas y su tumorigénesis, además de jugar un papel importante en la activación de los linfocitos B maduros (102). Los oncogenes MYB y MYC se expresan en los centroblastos del centro germinal y son frecuentemente objeto de traslocaciones cromosómicas en las enfermedades hematológicas. De hecho, la relación directa MYB-MYC se considera un elemento crucial en la transformación de tumores hematológicos (103), además existen hipótesis respecto la relación cooperativa de MYB-MYC en su efecto oncogénico (104). Un hallazgo interesante fue que, en tiempos prolongados de tratamiento, el gen MYB continuó estando infraexpresado con ambos fármacos, mientras que la infraexpresión de IRF-4 por lenalidomida desaparecía. Esto indicaría que, aunque parte de los mecanismos de los IMiDs son tiempo independiente (como la modificación de MYB), otros parece que varían en función del tiempo (99).

## CONCLUSIONES

Desde los primeros descubrimientos del concepto y características esenciales del MM, prácticamente no se ha introducido ninguna descripción nueva, pero si se ha avanzado en los conocimientos moleculares de la enfermedad, por eso creemos necesario el ordenarlos y revisarlos, desatacando:

- Estudios moleculares han contribuido a conocer el origen de las células tumorales del MM

- Las anomalías detectadas por los estudios de biología molecular constituyen posibles nuevas dianas terapéuticas

- La expresión de moléculas de adhesión entre la célula mielomatosa y el micro medioambiente de la MO, es cambiante a lo largo del proceso de la enfermedad y favorece la migración entre la célula de MM y la sangre periférica.

- Citoquinas y factores de crecimiento son imprescindibles para la patogénesis del

MM, para la expansión clonal y para la destrucción ósea.

– Los resultados de citometría de flujo multiparamétrica indican una expresión heterogénea en la CP normal y patológica, caracterizando a esta última por la baja reactividad a CD38, fuerte expresión CD56 y ausencia de CD19.

– El pronóstico de MM es multifactorial, y por se necesita estudiar los factores relacionados con el paciente, con clon tumoral, con la expresión oncogénica, con el inumofenotipo y con la masa de celular tumoral.

– El análisis de los cambios inducidos en el perfil de expresión génica de células mielomatosas tras el tratamiento con fármacos inmunomoduladores mostró que pomalidomida desreguló un número de genes sensiblemente superior a lenalidomida. Debe reseñarse que ambos fármacos generan infraexpresión de los genes IRF-4 y MYB en monoterapia.

#### AGRADECIMIENTO

Al instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL), por prestarnos su ayuda en el uso de sus bases bibliográficas.

#### REFERENCIAS

1. **Sirohi B, Powles R.** Multiple myeloma. *Lancet* 2004;363(9412):875-887.
2. **Group MW.** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-757.
3. **Blade J, Kyle RA, Greipp PR.** Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol* 1996;93(2):345-351.
4. **Blade J, Kyle RA, Greipp PR.** Multiple myeloma in patients younger than 30 years. Report of 10 cases and review of the literature. *Arch Intern Med* 1996;156(13):1463-1468.
5. **Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR.** Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78(1):21-33.
6. **Blade J, Fernandez-Llama P, Bosch F, Montoliu J, Lens XM, Montoto S, Cases A, Darnell A, Rozman C, Montserrat E.** Renal failure in multiple myeloma: presenting features and predictors of outcome in 94 patients from a single institution. *Arch Intern Med* 1998;158(17):1889-1893.
7. **Kyle RA, Rajkumar SV.** Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004;351(18):1860-1873.
8. **Kyle RA.** Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cells* 1995;13 Suppl 2:56-63.
9. **San Miguel JF.** Multiple Myeloma. Sixth ed. Wiley-Blackwell, editor. London 2010.
10. **Blade J, Kyle RA.** IgD monoclonal gammopathy with long-term follow-up. *Br J Haematol* 1994;88(2):395-396.
11. **Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Nunez G, Galende J, Borrego D, Rodríguez MJ, Ortega F, Hernandez J, Moreno I, Domínguez M, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A.** Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005;19(3):449-455.
12. **San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A.** Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8(4):735-759.
13. **Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, López-Berges C, Moro MJ, Hernández J, Escibano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF.** Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998;152(6):1655-65.
14. **Bakkus MH.** Ig gene sequences in the study of clonality. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47(2):128-147.

15. **Stevenson FK, Sahota SS.** B cell maturation in relation to multiple myeloma. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47(2):89-97.
16. **Denault JB, Boatright K.** Apoptosis in Biochemistry and Structural Biology. 3-8 February 2004, Keystone, CO, USA. *IDrugs* 2004;7(4):315-317.
17. **Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Kromer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J.** Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000;95(6):1925-1930.
18. **Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC.** Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104(3):607-618.
19. **Kuehl WM, Bergsagel PL.** Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):175-187.
20. **Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IR, Bergsagel PL, Kuehl WM.** Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Nat Acad Sci* 2000;97(1):228-233.
21. **Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R.** Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 2001;98(10):3082-3086.
22. **Portier M, Moles JP, Mazars GR, Jeanteur P, Bataille R, Klein B, Theillet C.** p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene* 1992;7(12):2539-43.
23. **Gupta D, Hideshima T, Anderson KC.** Novel biologically based therapeutic strategies in myeloma. *Rev Clin Exp Hematol* 2002;6(3):301-324.
24. **Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC.** The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 2001;20(33):4519-4527.
25. **Shain KH, Landowski TH, Dalton WS.** The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr Opin Oncol* 2000;12(6):557-563.
26. **Dalton WS.** The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer Treat Rev* 2003;29 Suppl 1:11-19.
27. **Shain KH, Landowski TH, Dalton WS.** The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr Opin Oncol* 2000;12(6):557-556.
28. **Parmo-Cabanás M, Molina-Ortiz I, Matias-Roman S, García-Bernal D, Carvajal-Vergara X, Valle I, Pandiella A, Arroyo AG, Teixidó J.** Role of metalloproteinases MMP-9 and MT1-MMP in CXCL12-promoted myeloma cell invasion across basement membranes. *J Pathol* 2006;208(1):108-118.
29. **Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC.** Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 1993;82(12):3712-3720.
30. **Adler S, Atiya MS, Chiang IH, Frank JS, Haggerty JS, Kycia TF, Li KK, Littenberg LS, Sambamurti A, Stevens A, Strand RC, Witzig C, Louis WC, Akrib DS, Ardebili M, Convery MR, Ito MM, Marlow DR, McPherson RA, Meyers PD, Selen MA, Shoemaker FC, Smith AJ, Blackmore EW, Bryman DA, Felawka L, Kitching P, Konaka A, Kujala VA, Kuno Y, Macdonald JA, Nakano T, Numao T, Padley P, Poutissou JM, Poutissou R, Roy J, Soluk R, Turcot AS.** Search for the decay  $K^{+} \rightarrow \pi^{+} + \nu_{\mu} + \bar{\nu}_{\mu}$ . *Phys Rev Lett* 1996;76(9):1421-1424.
31. **Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM.** A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996;94(2):318-323.
32. **Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, García-Sanz R, López-Berges C, Moro MJ, Hernández J, Escibano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF.** Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Im-

- plications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998;152(6):1655-1665.
33. **Perez-Andres M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro M, Martín-Núñez G, Galende J, Borrego D, Rodríguez MJ, Ortega F, Hernandez J, Moreno I, Domínguez M, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A.** Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005;19(3):449-455
  34. **Funaro A, Malavasi F.** Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13(1):54-61.
  35. **Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS.** Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2004;121(4):482-488
  36. **Almeida J, Orfao A, Mateo G, Ocqueteau M, Garcia-Sanz R, Moro M, Hernandez J, Ortega F, Borrego D, Barez A, Mejido M, San Miguel JF.** Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathologie-biologie* 1999;47(2):119-127.
  37. **Helfrich MH, Livingston E, Franklin IM, Soutar RL.** Expression of adhesion molecules in malignant plasma cells in multiple myeloma: comparison with normal plasma cells and functional significance. *Blood Rev* 1997;11(1):28-38.
  38. **Gahmberg CG.** Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(5):643-650.
  39. **Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A.** Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993;81(10):2658-2663.
  40. **Leo R, Boeker M, Peest D, Hein R, Bartl R, Gessner JE, Selbach J, Wacker G, Deicher H.** Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38<sup>++</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, cIg<sup>+</sup> is the common phenotype of myeloma cells. *Ann Hematol* 1992;64(3):132-139.
  41. **Ruiz-Argüelles GJ, San Miguel JF.** Cell surface markers in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 1994;69(7):684-690.
  42. **Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jégou G, Puthier D, Robillard N, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R.** The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998;12(12):1977-1982.
  43. **Martin P, Santon A, Bellas C.** Neural cell adhesion molecule expression in plasma cells in bone marrow biopsies and aspirates allows discrimination between multiple myeloma, monoclonal gammopathy of uncertain significance and polyclonal plasmacytosis. *Histopathology* 2004;44(4):375-380.
  44. **García-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, Taberner MD, Blade J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Sanz MA, Pérez-Simón JA, Rasillo A, Miguel JF.** Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999;93(3):1032-1037.
  45. **Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, Horvathova M, Liautard J, Rossi JF, Wijdenes J, Brochier J, Klein B.** The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998;100(4):637-646.
  46. **Vidriales MB, Anderson KC.** Adhesion of multiple myeloma cells to the bone marrow microenvironment: implications for future therapeutic strategies. *Mol Med Today* 1996;2(10):425-431.
  47. **Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, Muehlinghaus G, Szyska M, Radbruch A, Manz RA.** Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 2003;171(4):1684-1690.
  48. **Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R.** Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 1995;85(4):863-872.
  49. **Kimlinger T, Witzig TE.** Expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34 on blood and bone marrow monoclonal plasma cells from patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(6):553-556.

50. **Vescio RA, Hong CH, Cao J, Kim A, Schiller GJ, Lichtenstein AK, Berenson RJ, Berenson JR.** The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma. *Blood* 1994;84(10):3283-3290.
51. **Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS.** Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2004;121(4):482-488.
52. **Escribano L, Ocqueteau M, Almeida J, Orfao A, San Miguel JF.** Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1998;30(5-6):459-466.
53. **Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R.** Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 2005;105(12):4845-4848.
54. **Pellat-Deceunynck C, Bataille R.** Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32(2):293-301.
55. **Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA.** The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 2002;99(6):2154-2161.
56. **Kumar S, Rajkumar SV, Kimlinger T, Greipp PR, Witzig TE.** CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia* 2005;19(8):1466-1470.
57. **Kozbor D, Moretta A, Messner HA, Moretta L, Croce CM.** Tp44 molecules involved in antigen-independent T cell activation are expressed on human plasma cells. *J Immunol* 1987;138(12):4128-4132.
58. **Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, Lu ZY, Gu ZJ, Jourdan M, Boiron JM, Bataille R, Klein B.** Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 1994;83(12):3654-3663.
59. **Robillard N, Jegó G, Pellat-Deceunynck C, Pineau D, Puthier D, Mellerin MP, Barillé S, Rapp MJ, Housseau JL, Amiot M, Bataille R.** CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998;4(6):1521-1526.
60. **Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, Housseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Wijdenes J, Amiot M.** Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 1994;84(8):2597-2603.
61. **Shapiro VS, Mollenauer MN, Weiss A.** Endogenous CD28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: implications for multiple myeloma progression. *Blood* 2001;98(1):187-193.
62. **Boccardo M, Pileri A.** Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997;11(1):111-131.
63. **Bergsagel DE.** The role of chemotherapy in the treatment of multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8(4):783-794.
64. **Tureson I, Abildgaard N, Ahlgren T, Dahl I, Holmberg E, Hjorth M, Nielsen JL, Odén A, Seidel C, Waage A, Westin J, Wistlöf F.** Prognostic evaluation in multiple myeloma: an analysis of the impact of new prognostic factors. *Br J Haematol* 1999;106(4):1005-1012.
65. **San Miguel JF, Garcia-Sanz R.** Prognostic features of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18(4):569-583.
66. **Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR.** Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 1996;88(5):1780-1787.
67. **Schambeck CM, Bartl R, Hochtlen-Vollmar W, Wick M, Lamerz R, Fateh-Moghadam A.** Characterization of myeloma cells by means of labeling index, bone marrow histology, and serum beta 2-microglobulin. *Am J Clin Pathol* 1996;106(1):64-68.
68. **Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW, Therneau TM, Lacy MQ, Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA.** Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;113(1):73-77.
69. **Piccinini L, Artusi T, Bonacorsi G, Arigliano V.** Acute leukemia of plasmablastic type as terminal phase of multiple myeloma. *Haematologica* 2002;87(2):EIM04.

70. Lee CK, Ma ES, Shek TW, Lam CC, Au WY, Wan TS, Chan LC. Plasmablastic transformation of multiple myeloma. *Hum Pathol* 2003;34(7):710-714.
71. Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gailard JP, Klein B, Stewart JA, Martin M, Oken, Neil E, Kay, Ness VN, Kyle RA. Plasmablastic morphology--an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. *Blood* 1998;91(7):2501-2507.
72. Pich A, Chiusa L, Marmont F, Navone R. Risk groups of myeloma patients by histologic pattern and proliferative activity. *Am J Surg Pathol* 1997;21(3):339-347.
73. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Moro MJ, Hernandez JM, Ortega F, Borrego D, Carnero M, Casanova F, Jimenez R. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood* 1995;85(2):448-455.
74. Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* 1993;81(12):3382-3387.
75. Garcia-Sanz R, Gonzalez-Fraile MI, Mateo G, Hernandez JM, López-Bergés MC, de las Heras N, Fernández-Calvo J, Ortega F, Portero JA, Báez A, Galende J, Orfão A, San Miguel JF. Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients. *Int J Cancer* 2004;112(5):884-889.
76. Fabian P, Kren L, Nenutil R. Determination proliferative activity of myeloma cells in histologic material. *Cesk Patol* 2004;40(2):46-49.
77. Gertz MA, Witzig TE, Pineda AA, Greipp PR, Kyle RA, Litzow MR. Monoclonal plasma cells in the blood stem cell harvest from patients with multiple myeloma are associated with shortened relapse-free survival after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(4):337-342.
78. Kumar S, Rajkumar SV, Greipp PR, Witzig TE. Cell proliferation of myeloma plasma cells: comparison of the blood and marrow compartments. *Am J Hematol* 2004;77(1):7-11.
79. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ, Lust JA, Dispenzieri A, Greipp PR, Kyle RA, Rajkumar SV. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2005;106(7):2276-2279.
80. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 2003;17(2):427-436.
81. Fassas AB, Spencer T, Sawyer J, Zangari M, Lee CK, Anaissie E, Muwalla F, Morris C, Barlogie B, Tricot G. Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002;118(4):1041-1047.
82. Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, Moro MJ, Hernandez JM, Ortega F, Borrego D, Carnero M, Jimenez R, Portero JA, San Miguel JF. Prognostic implications of DNA aneuploidy in 156 untreated multiple myeloma patients. Castelfranco-Leones (Spain) Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br J Haematol* 1995;90(1):106-112.
83. Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Taberner MD, Almeida J, Gonzalez M, Fernandez-Calvo J, Moro MJ, Hernandez JM, San Miguel JF, Orfao A. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998;91(9):3366-3371.
84. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, Bataille R, Avet-Loiseau H. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 2002;100(5):1579-1583.
85. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Fonseca R. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005;106(8):2837-2840.



86. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101(11):4569-4575.
87. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996;88(2):674-681.
88. Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL, Epstein J, Fenton RG, Jacobson J, Kuehl WM, Shaughnessy J, Tricot G. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:248-278.
89. Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, Ayers D, Tricot G, Badros A, Zangari M, C, Munshi NC, Anaissie E, Spoon D, Siegel D, Jagannath S, Vesole D, Epstein J, Shaughnessy J, Fassas A, Lim S, Roberson P, Crowley J. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood* 2000;95(12):4008-4010.
90. Shaughnessy J, Jacobson J, Sawyer J, McCoy J, Fassas A, Zhan F, Bumm K, Epstein J, Anaissie E, Jagannath S, Vesole D, Siegel D, Desikan R, Munshi N, Badros A, Tian E, Zangari M, Tricot G, Crowley J, Barlogie B. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood* 2003; 101(10):3849-3856.
91. Ortega MM, Melo MB, De Souza CA, Lorand-Metze I, Costa FF, Lima CS. A possible role of the P53 gene deletion as a prognostic factor in multiple myeloma. *Ann Hematol* 2003;82(7):405-409.
92. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Kromer E, Schuster R, Gisslinger H, DeSantis M, Zojer N, Fiegl M, Roka S, Schuster J, Heinz R, Ludwig H, Huber H. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92(3):802-809.
93. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IR, Bergsagel PL, Kuehl WM. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):228-233.
94. Liu P, Leong T, Quam L, Billadeau D, Kay NE, Greipp P, Kyle RA, Oken MM, Van Ness B. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 1996;88(7):2699-2706.
95. Omede P, Boccadoro M, Fusaro A, Gallone G, Pileri A. Multiple myeloma: 'early' plasma cell phenotype identifies patients with aggressive biological and clinical characteristics. *Br J Haematol* 1993;85(3):504-513.
96. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Puthier D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M. Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res* 1995;55(16):3647-3653.
97. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3412-3420.
98. Fernandez-Lazaro D, Fernandez-Lazaro CI, Caballero Garcia A, Córdova Martinez A. Immunomodulator drugs for the treatment of multiple myeloma. *Rev Med Chil* 2018;146(1):1444-1456.
99. Fernández-Lázaro D. Pre-clinical comparative analysis of the efficacy, mechanism of action and resistance mechanisms of two immunomodulatory drugs (IMiDs), lenalidomide and pomalidomide, in multiple myeloma. [Doctoral Thesis: clinical oncology UNESCO 320101]. University of Salamanca; 2011.
100. Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W, Powell J, Dave S, Yu X, Zhao H, Zeng Y, Chen B, Epstein J, Staudt LM. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* 2008;454(7201):226-231.

- 101. Lopez-Girona A, Heintel D, Zhang LH, Mendy D, Gaidarova S, Brady H, Bartlett JB, Schafer PH, Schreder M, Bolomsky A, Hilgarth B, Zojer N, Gisslinger H, Ludwig H, Daniel T, Jäger U, Chopra R.** Lenalidomide downregulates the cell survival factor, interferon regulatory factor-4, providing a potential mechanistic link for predicting response. *Br J Haematol* 2011;154(3):325-336.
- 102. Ying GG, Arsura M, Introna M, Golay J.** The DNA binding domain of the A-MYB transcription factor is responsible for its B cell-specific activity and binds to a B cell 110-kDa nuclear protein. *J Biol Chem* 1997;272(40):24921-24926.
- 103. Magrath I.** The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* 1990;55:133-270.
- 104. Marhamati DJ, Bellas RE, Arsura M, Kypreos KE, Sonenshein GE.** A-myb is expressed in bovine vascular smooth muscle cells during the late G1-to-S phase transition and cooperates with c-myc to mediate progression to S phase. *Mol Cell Biol* 1997;17(5):2448-2457.