

# Importancia clínica de la evaluación de la enfermedad mínima residual en mieloma múltiple.

Clinical importance of the evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma.

Duarte P

Sección Hematología y Unidad de Trasplante de Médula Ósea,  
Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario CEMIC. Bs. As.

pjduartemd@gmail.com



ENFERMEDAD  
MÍNIMA RESIDUAL

HEMATOLOGÍA  
Volumen 21 N° Extraordinario: 152-157  
XXIII Congreso Argentino  
de Hematología  
Noviembre 2017

**Palabras claves:** mieloma múltiple, enfermedad mínima residual, citometría de flujo.

**Keywords:** multiple myeloma, minimal residual disease, flow cytometry.

El tratamiento del mieloma múltiple (MM) ha cambiado radicalmente durante los últimos 15 años gracias a la introducción de nuevas drogas con diferentes mecanismos de acción, lo que permitió prolongar la supervivencia de los pacientes con MM<sup>(1)</sup>. Las combinaciones de drogas inmunomoduladoras (IMiDs) e inhibidores del proteasoma (IP) han permitido que un grupo importante de pacientes logren remisiones completas (RC) prolongadas, retrasando significativamente la recaída de enfermedad<sup>(1-3)</sup>. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que logran RC eventualmente presentan recaída de enfermedad, lo que sugiere que una pequeña población de células patológicas no son detectadas por las técnicas clási-

cas de evaluación de respuesta (proteinograma electroforético, inmunofijación, cadenas livianas libres y cuantificación de células plasmocitarias en médula ósea)<sup>(4,5)</sup>.

En los últimos años se han desarrollado métodos de mayor sensibilidad para detectar enfermedad mínima residual (EMR) en MM. Éstos incluyen a la citometría de flujo (CMF) multiparamétrica, la reacción de cadena polimerasa cuantitativa de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO-qPCR, por sus siglas en inglés) y a las técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés)<sup>(4,5)</sup>.

Si bien estas técnicas son útiles para monitorear la EMR en la médula ósea, el compromiso por MM

puede ser heterogéneo, lo que posibilitaría resultados falsos negativos. Además, no permiten la detección de enfermedad fuera de la médula ósea<sup>(4,5)</sup>. Por lo comentado, también se han investigado la aplicación de estudios por imágenes como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la tomografía computada por emisión de positrones (PET-TC) para detectar anatómicamente lugares de persistencia de enfermedad<sup>(6)</sup>.

Para la mayoría de las enfermedades onco-hematológicas la ausencia de EMR se asocia a mayor supervivencia global. El MM no sería una excepción a dicho paradigma. Un metanálisis reciente de catorce estudios clínicos con un total de 1273 pacientes con MM, evaluó el impacto de la EMR luego del tratamiento de primera línea. La EMR negativa luego del tratamiento se asoció significativamente con mayor supervivencia libre de progresión (SLP) y mayor supervivencia global (SG). Estos hallazgos se observaron tanto en pacientes candidatos como no candidatos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH)<sup>(7)</sup>.

La mayor compresión, estandarización y aplicabilidad de las diferentes técnicas de monitoreo de EMR permitirán próximamente incorporarlas en las decisiones terapéuticas en todas las etapas del tratamiento de los pacientes con MM.

### **Importancia clínica de la profundidad de respuesta**

La relación entre profundidad de respuesta al tratamiento y la prolongación significativa de la SLP y SG ha sido publicada en numerosos estudios clínicos, tanto para pacientes candidatos a TCPH como para la población añosa<sup>(8)</sup>.

No sólo lograr la RC sino mantenerla en el tiempo sería un requisito fundamental para lograr supervivencias prolongadas. Esto fue demostrado en el estudio de "Terapia Total 2" de la Universidad de Arkansas, donde los pacientes que mantuvieron la RC por 3 años tuvieron una supervivencia global significativamente mayor comparado a los pacientes que no lograron RC o que lograron la misma pero recayeron antes de los 3 años. Uno de cada 3 pacientes con RC podrían estar potencialmente curados, libres de recaída de enfermedad a 10 años de seguimiento<sup>(9)</sup>.

Sin embargo, existen subgrupos de pacientes que aún sin lograr RC (por los métodos convencionales)

alcanzan supervivencias prolongadas. Los pacientes con perfil de gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) al diagnóstico o con subtipos moleculares específicos pueden lograr supervivencias prolongadas, incluso con respuestas parciales al tratamiento. Es importante destacar que estos subgrupos representan sólo el 10% del total de pacientes con MM<sup>(10)</sup>.

Aproximadamente el 40% de los pacientes en RC presentarán recaída de enfermedad dentro de los 4 años de iniciado el tratamiento y un 5% de los mismos presentarán recaídas antes del año<sup>(1)</sup>. Esto demuestra que los métodos convencionales de monitoreo de respuesta terapéutica completa como la inmunofijación negativa en sangre y orina, la desaparición de plasmocitos, la ausencia de células plasmáticas clonales en médula ósea por inmunohistoquímica y la normalización de la relación de cadenas livianas libres en suero son sub-óptimos<sup>(7,8)</sup>. Por lo tanto, lograr la RC medida por los métodos convencionales no necesariamente representa la máxima respuesta al tratamiento. Como consecuencia se han desarrollado técnicas de mayor sensibilidad para una mejor detección de EMR en los pacientes con MM.

### **Detección de enfermedad mínima residual en médula ósea**

La desaparición de plasmocitos clonales por inmunohistoquímica es uno de los requisitos para definir RC. Con la finalidad de incrementar la sensibilidad de detección de células de MM en médula ósea se han desarrollado métodos como la CMF multiparamétrica, la ASO-qPCR y la NGS. Estos métodos permiten la evaluación de millones de células de la médula ósea (o su correspondiente cantidad de ADN) por determinación y proporcionan una cuantificación de células tumorales residuales en la médula ósea en un tiempo relativamente rápido.

### **Citometría de flujo multiparamétrica para la detección de enfermedad mínima residual**

**Métodos de primera generación.** Estas técnicas permiten discriminar entre células de MM y células plasmáticas normales analizando simultáneamente los diferentes patrones de expresión antigénica. Los antígenos de membrana más utilizados incluyen al CD138, CD38, CD45, CD56, CD19 y cadenas livianas kappa y lambda citoplasmáticas<sup>(8)</sup>.

Marcadores adicionales, muchos de los que se encuentran aberrantemente expresados en células de MM, como CD27, CD28, CD81 y CD117, también han sido utilizados. Sin embargo, debido a la expresión heterogénea de estos marcadores y a diferencias en el número de eventos estudiados como en las estrategias de análisis utilizadas, las comparaciones de los resultados entre diferentes estudios es confusa. Recientemente se han desarrollado guías de consenso para intentar estandarizar la evaluación de enfermedad en MM<sup>(11)</sup>.

El grupo español de mieloma (PETHEMA/GEM) utilizó CMF de cuatro-colores (cuatro antígenos analizados) para estudiar la EMR en 295 pacientes con MM de reciente diagnóstico. La EMR negativa al día 100 post TCPH autólogas se correlacionó significativamente con mayor SLP y SG<sup>(12)</sup>. De manera similar, el grupo inglés (*MRC IX clinical trial*) evaluó la EMR en varias etapas del tratamiento del MM en pacientes candidatos a TCPH con CMF de seis-colores (seis antígenos analizados). La EMR negativa al día 100 post trasplante también se asoció significativamente a mayor SLP y SG<sup>(13)</sup>. La sensibilidad de estas técnicas detecta 1 célula patológica en 10.000 ( $10^{-4}$ ) células plasmáticas totales<sup>(4,8)</sup>. La evaluación de EMR post tratamiento también ha sido estudiada en pacientes no candidatos a TCPH logrando resultados similares a los descriptos para los pacientes jóvenes<sup>(14)</sup>.

Diferentes estudios han demostrado que la sensibilidad de estas técnicas se incrementa significativamente cuando  $\geq 6$  marcadores se analizan simultáneamente. La CMF de ocho colores (ocho antígenos analizados simultáneamente) logra una sensibilidad de 1 célula patológica en 100.000 ( $10^{-5}$ ) células plasmáticas totales<sup>(4,8)</sup>.

**Citometría de flujo de próxima generación (*Next-generation flow*).** Intentos recientes de estandarización de la CMF y automatización para análisis de resultados, hacen a esta técnica atractiva para la detección de rutina de la EMR en MM.

El método actual EuroFlow para CMF de próxima generación propone, para la detección de EMR en MM, dos paneles de 8 marcadores de membrana (8-colores). Estos marcadores combinan antígenos de membrana para la identificación de células plasmáticas clonales con fenotipos aberrantes como también la expresión intracitoplasmática de cade-

nas livianas kappa y lambda para confirmar clonalidad<sup>(15)</sup>.

Una característica de esta técnica de 8-colores es su balance entre efectividad (sensibilidad + especificidad) y disponibilidad en hospitales/centros de relativa

Por último, los centros que realicen CMF de próxima generación deben cumplir con los criterios de validación y control de calidad propuestos por el consenso EuroFlow<sup>(4,8,15)</sup>.

### **Métodos moleculares para la detección de enfermedad mínima residual**

#### **Reacción de cadena polimerasa cuantitativa de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO-qPCR).**

Los rearrreglos de los segmentos de genes V, D, J en los complejos genéticos de inmunoglobulinas (IGH, IGK e IGL) proporcionan a cada célula B de combinaciones específicas VDJ en las diferentes moléculas de inmunoglobulinas. Estas inserciones o deleciones de nucleótidos en los sitios VDJ representan una “huella digital” única para cada célula B y también para cada clon de células B malignas<sup>(4,16)</sup>. Estas segmentos VDJ deben identificarse para cada paciente al diagnóstico. Los mismos pueden secuenciarse con técnicas estándar y, de esta forma, diseñar oligonucleótidos específicos para usarlos en la detección por PCR de las células malignas. La sensibilidad de la técnica puede detectar 1 célula maligna por cada 10.000 ( $10^{-4}$ ) a 100.000 ( $10^{-5}$ ) células plasmáticas<sup>(4,8)</sup>.

Si bien es una técnica sensible y específica, es aplicable en una proporción baja de pacientes con MM, se dispone en laboratorios muy especializados y es más laboriosa comparada a la CMF. Algunos estudios han comparado las técnicas de ASO-qPCR con CMF multiparamétrica con resultados similares<sup>(17,18)</sup>. Actualmente, esta técnica ha sido remplazada por los métodos de NSG.

#### **Secuenciación de próxima generación (NGS).**

Esta técnica amplifica ADN utilizando *primers* locus-específicos para los genes de cadenas pesadas IGH-VDJ o IGH-DJh o IGK. Una vez amplificado, el ADN de los genes de inmunoglobulinas es secuenciado y se determinan las frecuencias de los diferentes tipos de clones celulares<sup>(4,8)</sup>.

Una vez detectados dichos clones al diagnóstico, pueden determinarse y cuantificarse durante el se-

guimiento del paciente, y de esta forma evaluar la presencia de EMR. La sensibilidad de la técnica puede detectar 1 célula maligna por cada 100.000 ( $10^{-5}$ ) células plasmáticas<sup>(4,8)</sup>. Estudios recientes han demostrado alcanzar por esta técnica una sensibilidad de 1 en 1.000.000 ( $10^{-6}$ )<sup>(4,8,19)</sup>.

La mayoría de la información publicada con NGS ha sido generada utilizando la plataforma LymphoSI-GHT (Sequentia/Adaptive Inc.), que usa “primers” de consenso para la amplificación y secuenciación de los segmentos de genes de inmunoglobulinas.

El grupo español (PETHEMA/GEM) evaluó el valor pronóstico de la EMR evaluada por NGS en médulas óseas de 133 pacientes con MM que lograron  $\geq$  MBRP luego del tratamiento de primera línea. Los

pacientes con EMR negativa tuvieron significativamente mayor SLP (80 vs 31 meses;  $p < 0.001$ ) y mayor SG (no alcanzada vs 81 meses;  $p < 0.002$ ). También demostraron que la concordancia entre NGS y CMF multiparamétrica o ASO-qPCR fue de 83% y 85% respectivamente<sup>(19)</sup>. Resultados similares fueron encontrados en el estudio IFM-DFCI 2009 del grupo francés<sup>(20)</sup>.

**Comparación entre las técnicas que evalúan enfermedad mínima residual en médula ósea**

Cada una de las técnicas comentadas (basadas en el fenotipo o genotipo de las células plasmáticas) poseen ventajas como desventajas que deben tenerse en cuenta (Tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación entre las diferentes técnicas que evalúan enfermedad residual mínima en médula ósea.

Característica	CMF	NGS	ASO-qPCR
<b>Necesidad de muestra al diagnóstico</b>	NO	Sí. Debe identificarse rearrreglo específico del clon dominante	Sí. Deben generarse sondas específicas para cada paciente
<b>Procesamiento de la muestra</b>	Dentro 24-48hs	Puede congelarse	Puede congelarse
<b>Sensibilidad</b>	$10^{-4}$ a $10^{-5}$ (mayor si 8 colores)	$10^{-6}$	$10^{-5}$ a $10^{-6}$
<b>Control de calidad de la muestra</b>	Sí. Al analizar la totalidad de las células de MO	NO	NO
<b>Complejidad de la técnica</b>	++ (horas)	++ (5-10 días)	+++ (semanas)
<b>Utilidad *</b>	90- 100%	90-100%	60-70%
<b>Estudio de clones</b>	Evalúa múltiples clones	Evalúa múltiples clones	Detecta sólo un clon

\*Utilidad: posibilidad de obtener un resultado positivo en 100 muestras analizadas.

La prueba ideal para monitorear EMR debería cumplir las siguientes características: 1) gran aplicabilidad (posibilidad de usarse en la mayoría de los pacientes), 2) elevada sensibilidad y especificidad, 3) alta utilidad (obtención de resultados en la mayoría de los pacientes), 4) accesibilidad, 5) necesidad de una muestra pequeña y trasladable fácilmente, 6) reproducibilidad y 7) valor clínico documentado<sup>(4,8)</sup>. Al momento actual, ninguno de los métodos descriptos cumple completamente con todas estas características ideales, pero la CMF de próxima generación y la NGS cumplen con la mayoría de ellas. Ambas poseen plataformas que podrían aplicarse de manera

uniforme entre las diferentes instituciones y países. La inclusión de ambos métodos en estudios prospectivos permitirá comprender mejor las ventajas y desventajas de los mismos, como su aplicación en las distintas etapas de la enfermedad.

**Detección de enfermedad en hueso y extramedular**

La posibilidad de compromiso de la médula ósea “parcheado” por MM o enfermedad extramedular con una evaluación de EMR negativa es un desafío para las técnicas descriptas que analizan muestras de aspirados únicos de médula ósea<sup>(4,6,8)</sup>.

Esta situación podría generar evaluaciones de res-

puesta falsamente negativas y motivó considerar a técnicas por imágenes de alta sensibilidad para redefinir la respuesta completa al tratamiento.

La técnica por imagen más sensible y específica para monitorear EMR es el PET-TC<sup>(6,21)</sup>. Detecta enfermedad ósea como enfermedad extramedular y posee sensibilidad similar pero mayor especificidad que la RMN de cuerpo entero<sup>(6,21)</sup>.

Diferentes estudios han demostrado su utilidad pronóstica en relación a la detección de lesiones PET-positivas en pacientes con MM, tanto al diagnóstico como en la recaída.

Recientemente el grupo italiano (GIMEMA) publicó resultados sobre 282 pacientes con MM de reciente diagnóstico tratados con IMiDs e IP con lesiones PET-positivas al inicio del tratamiento<sup>(22)</sup>. En este estudio se demostró que aquellos pacientes en RC (según métodos convencionales) pero con PET-positivo tuvieron significativamente menor SLP y menor SG que los pacientes en RC con PET-negativo. La SLP fue de 44 vs 84 meses y la SG a 5 años de 70% vs 90% respectivamente. Resultados similares fueron encontrados por el grupo francés en el estudio IFM-DFCI 2009<sup>(23)</sup>.

El rol del PET-TC como método para evaluar EMR probablemente sea complementario al de las técnicas que la evalúan en médula ósea. Son necesarios protocolos estandarizados y validados de respuesta al tratamiento por PET, para definir la correcta aplicación de esta técnica<sup>(4,6,8)</sup>.

### Conclusiones

En la era de nuevos agentes terapéuticos para el MM que logran tasas elevadas de RC, la negatividad de EMR post tratamiento sería un factor predictor de supervivencias libre de enfermedad y globales prolongadas.

La EMR podría ser utilizada como un bio-marcaador para evaluar la eficacia terapéutica en diferentes etapas de enfermedad (inducción, trasplante, consolidación, mantenimiento, recaída) y tal vez adaptar la terapia según cada caso en particular. Además podría considerarse como subrogante de SG en el diseño de estudios clínicos.

Finalmente, el uso de técnicas de detección de EMR en el MM tiene el potencial de una mejor evaluación de respuesta al tratamiento, de discriminar el riesgo de recaída de enfermedad y de poder condicionar decisiones terapéuticas.

### Declaración de conflictos de interés:

El autor declara haber recibido honorarios por conferencias de laboratorios Janssen, Varifarma, honorarios por consultoría de laboratorios Gador y Pfizer y honorarios por actividad educativa de laboratorio Gador.

### Bibliografía

- Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV et al. New drugs and novel mechanism of action in Multiple Myeloma. *Leukemia*. 2014; 28: 525-542.
- Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2013; 28:122-128.
- 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; 31:4529-4535.
- Sherrod AM, Hari P, Mosse CA et al. Minimal residual disease testing after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2016; 51:2-12.
- Landgren O, Owen RG. Better therapy requires better response evaluations: paving the way for minimal residual disease testing for multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015; 90:14-20.
- Caers J, Withofs N, Hillengass J et al. The role of positron emission tomography-computed tomography and magnetic resonance imaging in diagnosis and follow up of multiple myeloma. *Haematologica*. 2014; 99:629-637.
- Munshi NC, Avet-Loiseau A, Rawstron AC et al. Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma. A meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017; 3: 28-35.
- Paiva B, Jacques J, van Dongen M et al. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*. 2015; 125: 3059-3068.

9. Barlogie B, Anaissie E, Haessler J et al. Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma. *Cancer*. 2008; 113:355-359.
10. Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V et al. Gene expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*. 2007; 109:1692-1700.
11. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016; 90:16-30.
12. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J et al. Multi-parameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008; 112:4017-4023.
13. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM et al. Minimal residual disease assessed by multiparametric flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol*. 2013; 31:2540-2547.
14. Mateos MV, Oriol A, Martinez-Lopez J et al. GEM2005 trial update comparing VMP/VTP as induction in elderly multiple myeloma patients. *Blood*. 2014; 124:1887-1893.
15. Mailankordy S, Korde N, Lesokhin A et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015; 12:286-295.
16. Korthals M, Shenke N, Kronenwett R et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013; 19:1109-1115.
17. Sarasquete M, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005; 90:1365-1372.
18. Puig N, Sarasquete M, Balanzategui A et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease detection in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*. 2014; 28:391-397.
19. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123:3073-3079.
20. Avet-Loiseau H, Core L, Lauwers-Canes V et al. Evaluation of minimal residual disease by next generation sequencing is highly predictive of PFS in the IFM/DFCI 2009 Trial. *Blood*. 2015; 126:191.
21. Zamaghni E, Nanni C, Patriarca F et al. A prospective comparison of 18-F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica*. 2007; 92:50-55.
22. Zamaghni E, Nanni C, Mancusso K et al. PET/TC improves the definition of complete response and allows to detect otherwise unidentifiable skeletal progression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015; 21:4384-4390.
23. Moreau P, Attal M, Caillet D et al. Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and [18F] Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography at Diagnosis and Before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients With Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial. *J Clin Oncol*. 2017; Jul 7: epub.