

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS MOLECULARES DE CLONALIDAD EN EL
MIELOMA MÚLTIPLE, APLICACIÓN EN EL SEGUIMIENTO
DE LA ENFERMEDAD Y VALOR PRONÓSTICO**

María del Pilar Martínez Sánchez

2007

Dr. Joaquín Martínez López, Doctor en Medicina, Profesor asociado del Departamento de Medicina Interna de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo su dirección por Dña. María del Pilar Martínez Sánchez titulado "Estudios moleculares de clonalidad en el mieloma múltiple, aplicación en el seguimiento de la enfermedad y valor pronóstico" para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizado en base a hipótesis científicas, contiene una base experimental y unos resultados originales y posee un formato académico adecuado.

Por lo que AUTORIZA a la doctoranda para que presente su investigación al tribunal calificador correspondiente.

Y para que así conste, firma la siguiente autorización en Madrid, a 29 de enero de 2007.

Fdo: Dr. Joaquín Martínez López

*A mi familia,
en especial a los que
se fueron demasiado pronto*

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Joaquín Martínez, por la confianza depositada en este trabajo y por su apoyo incondicional; por su generosidad y paciencia durante casi 3 años de tenerme en la mesa de al lado y durante otro año, que aunque cambié de mesa, no se pudo librar completamente de mí.

A las dos primeras personas que me “animaron” a comenzar la tesis, la Dra. Gilsanz y el Dr. Lahuerta, porque siempre necesitamos un primer empujón.

A todos mis compañeros del Servicio de Hematología y del Laboratorio de Biología Molecular, aunque algunos estén ahora por otro sitio, entre los que he encontrado amigos increíbles. Por los cafés compartidos, las tertulias, las meriendas improvisadas, las risas y el cariño que me han regalado. Queta, Laura, Silvia...esto no hubiera sido lo mismo sin vuestra querida compañía.

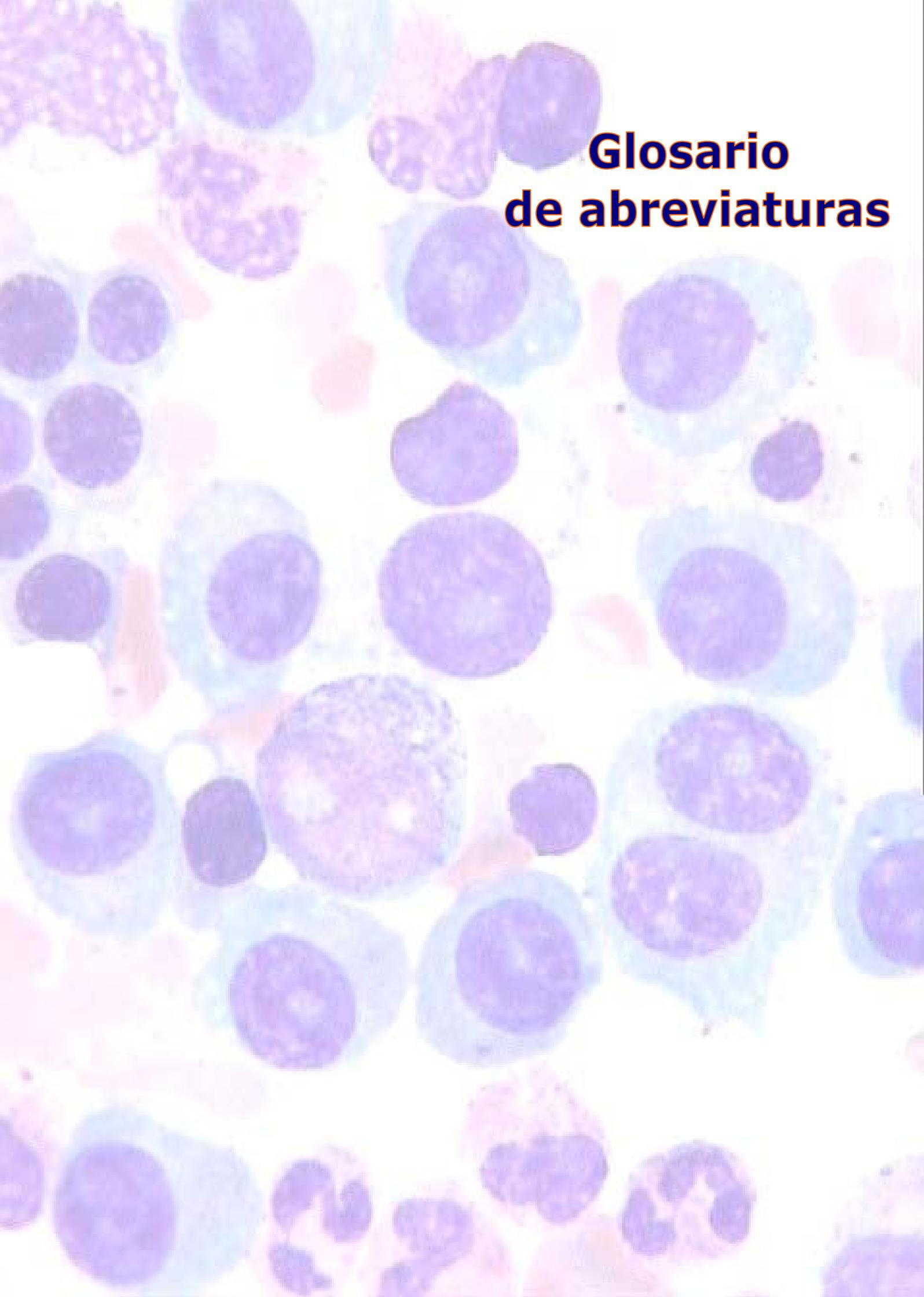
A Rosa, no sólo por pertenecer al grupo de arriba, sino también por tener la paciencia de enseñarme la estadística y de contestar a todos mis correos.

A los amigos de siempre, a los que siguen siéndolo a pesar de todo y a los que se van uniendo en el camino, porque todos demostraron interés en mi trabajo, ¡aunque sólo fuera por cortesía!

A David, por permitirme trabajar con él durante este último año. Ha sido una estupenda experiencia profesional, pero además ha supuesto la inolvidable aventura de conocer otro país, otro idioma, otra cultura y gente maravillosa. Por facilitarme la escritura de esta tesis, por compartir conmigo sus conocimientos del tema (sin duda mucho mayores que los míos), por sus sugerencias y, en fin, por ofrecerme su amistad cuando más echaba de menos a los amigos.

A mi familia, por apoyar todas mis decisiones y por quererme aunque me equivoque, porque ellos son siempre mi refugio.

A todos...muchas gracias por estar ahí.

The background of the page is a microscopic image of various cells. The cells are stained with a purple dye, likely hematoxylin, which highlights the nuclei. Some cells also show pinkish or reddish staining, possibly from eosin, which highlights cytoplasmic components or extracellular matrix. The cells vary in size and shape, with some appearing as large, rounded cells and others as smaller, more irregular cells. The overall appearance is that of a tissue section or a cell culture preparation.

Glosario de abreviaturas

Glosario de abreviaturas

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CMF: citometría de flujo

CPSP: concentrado de progenitores de sangre periférica

ECOG: escala de calidad de vida del grupo oncológico cooperativo del este (*Eastern Cooperative Oncology Group*)

EMR: enfermedad mínima residual

FDA: *Food and Drug Administration*

FISH: hibridación fluorescente in situ (*Fluorescent In Situ Hybridization*)

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos (*Granulocyte Colony Stimulate Factor*)

GELTAMO: grupo español de linfomas y trasplante autólogo de médula ósea

GEM: grupo español de mieloma

IPI: índice pronóstico internacional

LDH: láctico deshidrogenasa

MO: médula ósea

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RC: remisión completa

RQ-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

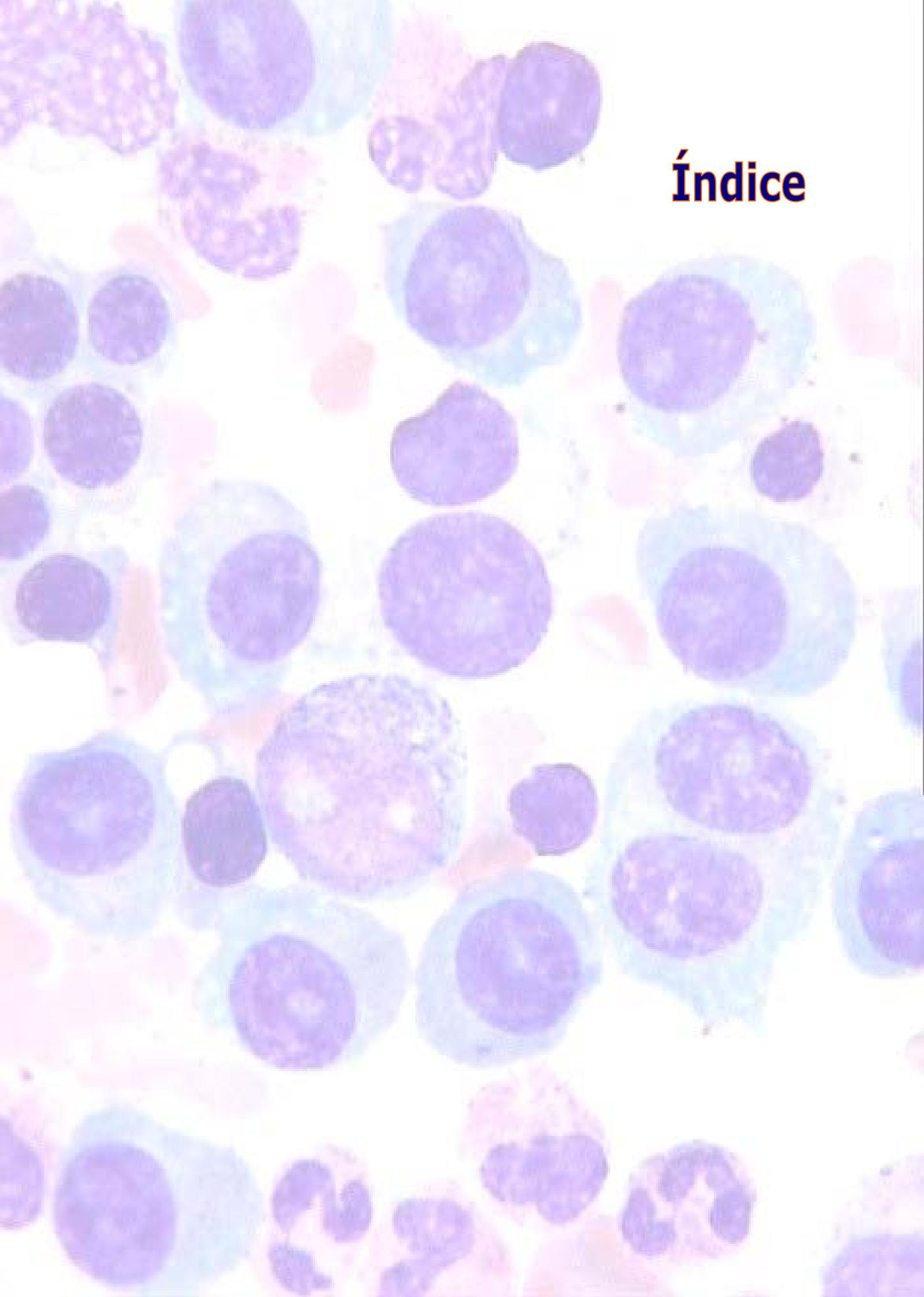
SP: sangre periférica

SWOG: grupo oncológico del suroeste (*SouthWest Oncology Group*)

QT: quimioterapia

TAPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

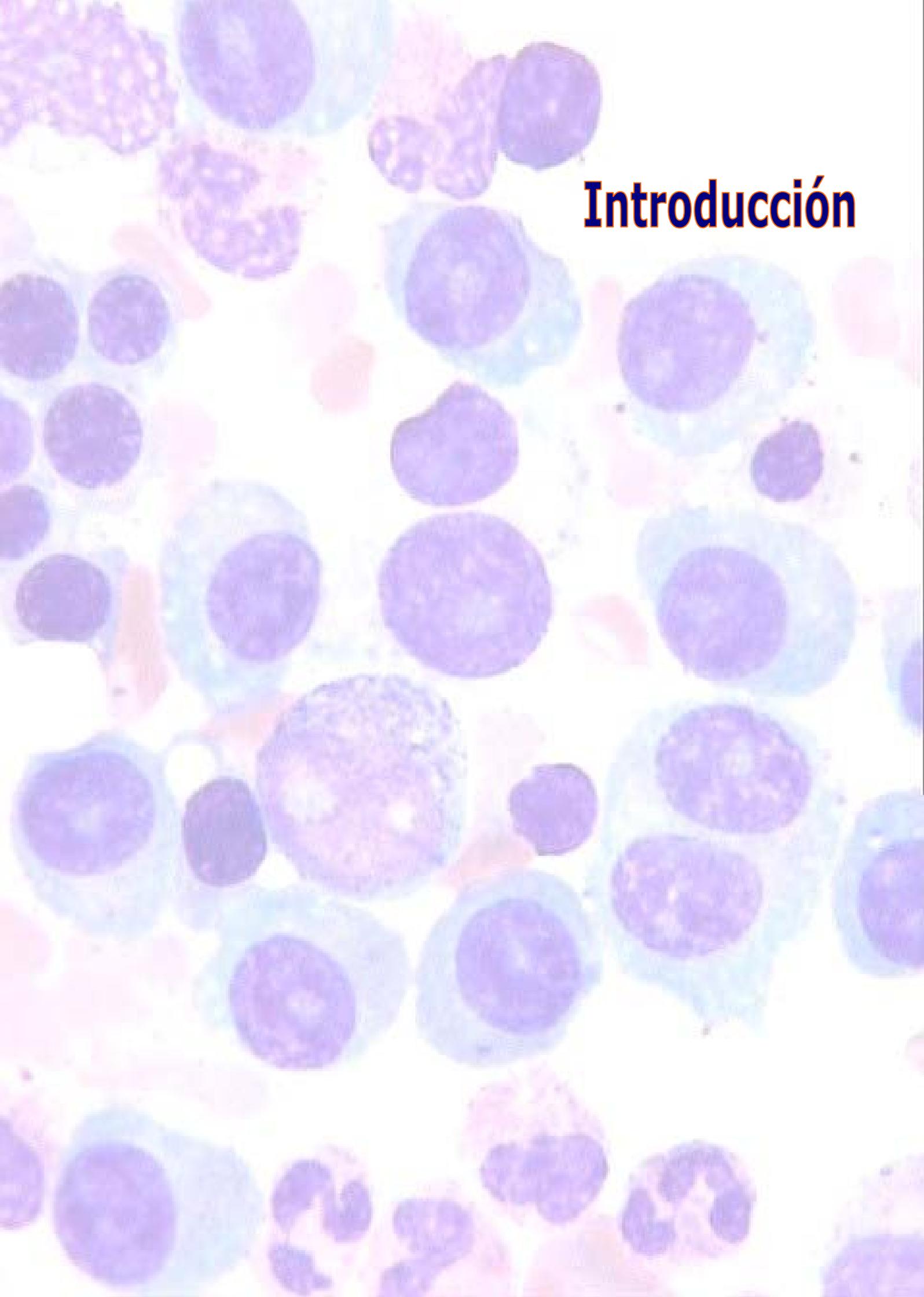
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

A microscopic image of a blood smear, likely a peripheral blood smear, showing various types of white blood cells and red blood cells. The white blood cells are stained with a purple dye, and the red blood cells are stained with a pink dye. The white blood cells are scattered throughout the field, with some showing distinct nuclei and cytoplasm. The red blood cells are smaller and more numerous, appearing as small, pinkish discs. The overall appearance is that of a normal blood smear.

Índice

INTRODUCCIÓN	5
1. Generalidades del Mieloma Múltiple	6
2. Los genes de la Inmunoglobulinas en el Mieloma Múltiple	16
3. Evaluación de la respuesta al tratamiento. Enfermedad mínima residual	27
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	34
1. Justificación para la elección del tema	35
2. Objetivos	36
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Pacientes y muestras	38
2. Métodos	42
2.1. Extracción del ADN	42
2.2. PCR cualitativa	42
2.3. PCR fluorescente	44
2.4. Secuenciación y análisis de secuencias	47
2.5. PCR cuantitativa alelo-específica en tiempo real con sondas TaqMan	47
2.6. PCR cuantitativa alelo-específica en tiempo real con oligonucleótido auto-hibridante	49
2.7. Estudio del inmunofenotipo de las células plasmáticas por CMF	50
2.8. Análisis estadístico	52
RESULTADOS	53
Capítulo I. Estudio de los genes de las inmunoglobulinas en el Mieloma Múltiple	54
Capítulo II. Diseño de un método de PCR cuantitativa alelo-específica con un oligonucleótido consenso fluorescente. Comparación con el método estándar	61
Capítulo III. Enfermedad Mínima Residual por PCR fluorescente. Significado pronóstico	67
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	86
APÉNDICES	97
<i>1. Minimal Residual Disease Monitorization in Multiple Myeloma Patients Achieving Complete Response after Autologous Stem Cell Transplantation: A comparative study between ASO Real Time Quantitative PCR and Flow Cytometry</i>	99
<i>2. Application of self-quenched JH consensus primers for real-time quantitative PCR of IgH gene to minimal residual disease evaluation in Multiple Myeloma</i>	106

Introducción



1. Generalidades del Mieloma Múltiple

DEFINICIÓN. CONCEPTO

El Mieloma Múltiple (MM) es una enfermedad neoplásica caracterizada por la proliferación clonal e incontrolada de las células plasmáticas que asientan en la médula ósea (MO) y producen una inmunoglobulina (Ig), o fracción de ésta, monoclonal.

Se ha clasificado a esta enfermedad como una gammapatía monoclonal, como una discrasia de células plasmáticas y también como un síndrome linfoproliferativo (SLP), ya que las células plasmáticas constituyen el último estadio madurativo del linfocito B.

BREVE HISTORIA DEL MIELOMA

La primera descripción documentada de esta enfermedad data de los años 1840s y los responsables fueron tres médicos ingleses (Macintyre, Bence-Jones y Darymple) que describieron las características clínicas y hallazgos post-mortem. Los principales hitos en la historia del mieloma se resumen en la tabla 1.

No fue hasta un siglo después de la primera descripción de la enfermedad, cuando se descubrió en Rusia el Sarcolysin, fármaco del que deriva el Melfalán, que Bersagel utilizó por primera vez con éxito en 1962. Sydney Salmon y Raymond Alexanian, pioneros en la investigación de esta enfermedad, introdujeron el uso de Prednisona y, en 1969, Alexanian demostró que la combinación Melfalán+Prednisona era mejor que Melfalán sólo. Probablemente Alexanian no se imaginaba que su pauta de tratamiento iba a ser utilizada durante cerca de 40 años, ya que los múltiples intentos de combinación de diferentes drogas no han conseguido alargar sustancialmente la supervivencia de los pacientes, calculada ya en los años 70 entre 3 y 4 años.

Pero estamos en el siglo XXI y, afortunadamente, el nuevo siglo ha comenzado cargado de optimismo...

Tabla 1. Breve historia del Mieloma Múltiple

Fecha	Autores	Acontecimiento
1840s	Macintyre, Bence-Jones, Darymple	1ª descripción de la enfermedad
1873	Von Rustizky	Acuña el término Mieloma Múltiple, por la presencia de varios tumores en la MO de distintos huesos
1880	Otto Kähler	Relaciona la proteinuria de Bence-Jones con la enfermedad ósea
1886	Ramón y Cajal	Descubre las células plasmáticas en estudios histológicos de tumores epiteliales ¹
1898	Weber	Usa los rayos X para el diagnóstico de mieloma y postula que la proteína Bence-Jones se origina en la MO
1917	Jacobson	Comunica la presencia de proteína Bence-Jones en el suero
1928		Se describe un aumento de proteínas séricas
1937-1939	Tiselius	Empieza las técnicas electroforéticas para el estudio de las proteínas
1950		La electroforesis en acetato de celulosa se convierte en estudio rutinario
1960s	Alexanian	Se empieza a tratar la enfermedad Se establece la pauta Melfalán+Prednisona
1970s	Kyle	Se establecen las bases del diagnóstico ²
1980s		Se realizan los primeros trasplantes
1990s		El trasplante cobra fuerza y demuestra mejores resultados que la QT convencional
2000....		Por fin nuevos fármacos y nuevas esperanzas

EPIDEMIOLOGÍA

El MM constituye el 1% de todos los cánceres y el 10% de las neoplasias hematológicas (la segunda más frecuente tras los linfomas).

La frecuencia con la que se identifica el MM en una población depende en buena parte de la edad, la raza y la existencia de un buen sistema sanitario.

En general, es ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres en todas las razas. La incidencia en la población caucásica es de 4-5 casos/100.000 hab/año; en la población negra americana de 8-10 casos/100.000 hab/año; en la población asiática de 1-2 casos/100.000 hab/año.

Aunque entre 1950-1980 se comunicó un incremento de la incidencia, en los últimos años no parece continuar esta tendencia, habiendo podido incluso disminuir ligeramente.

La edad media al diagnóstico es de 71 años, 66 para los varones negros y 73 para las mujeres blancas. Es muy raro por debajo de los 35 años (0,6% de todos los casos). La incidencia aumenta progresivamente con la edad, alcanzando tasas de 40,3 casos/100.000 hab/año en el grupo de edad entre 80-84 años³.

Respecto a Europa, los países del sur tienen tasas de incidencia y mortalidad más bajas que los del norte.

Los datos en España más recientes se recogen en El Libro Blanco del Mieloma, edición de 2004. Según esos datos la incidencia es de 3,5/100.000 hab/año en los hombres y 2,5/100.000 hab/año en las mujeres, con homogeneidad en la distribución geográfica en las distintas Comunidades Autónomas. Según previsiones del año 2000, en la actualidad la prevalencia del mieloma en España sería de más de 2400 casos entre los varones y algo más de 2000 casos entre las mujeres.

ETIOLOGÍA

Aunque no sabemos la etiología del mieloma, como ocurre en la mayoría de las neoplasias, podemos revisar algunos de los factores de riesgo que se han postulado hasta ahora.

La exposición a radiaciones se pensó durante un tiempo que aumentaba la incidencia de mieloma, pero esto no se ha confirmado en estudios a largo plazo en los supervivientes de las bombas atómicas de Japón^{4,5}, ni en trabajadores de centrales nucleares⁶.

Tampoco se ha encontrado relación con las condiciones socio-económicas⁷.

Factores ambientales ocupacionales. Los trabajadores con mayor incidencia de MM parecen ser los granjeros⁸ y los agricultores^{4,8}, aunque el factor causal no está aclarado, se ha sugerido que pudieran ser algunos herbicidas. Algunos estudios han comunicado un aumento de la incidencia entre trabajadores del metal, pinturas, madera, cuero y textil y producción de petróleo³.

Estimulación antigénica crónica. Al hablar de una neoplasia de células responsables de la inmunidad, siempre cabe preguntarse si la transformación maligna no se verá favorecida por la estimulación antigénica crónica. De momento no hay evidencia clara de ello, no habiéndose encontrado historia previa de infecciones, alergias, inmunizaciones o enfermedades autoinmunes. Si embargo, hay algunos trabajos en pacientes con Artritis Reumatoide que sí encuentran asociación⁹⁻¹². Como hallazgo interesante, se ha comunicado un paciente con MM y seropositivo para el VIH-1, cuya proteína monoclonal reconocía específicamente el antígeno p24 gag del virus, sugiriendo esto que la infección pudo jugar un papel etiológico¹³.

Factores genéticos. Las diferencias en la incidencia de mieloma entre razas y la existencia de mielomas con asociación familiar, sugieren la importancia de factores genéticos aún por determinar¹⁴.

FISIOPATOGENIA

La teoría actual defiende que el desarrollo de MM sintomático es debido a un proceso secuencial que incluye una serie de cambios genéticos que se van acumulando en la célula plasmática, junto al desarrollo de cambios en el micro ambiente medular que favorecen el crecimiento tumoral, todo ello permitido por el fracaso del sistema inmune en el control de la enfermedad.

Los fenómenos descritos en la evolución de esta enfermedad incluyen alteraciones cromosómicas, anomalías epigenéticas, de expresión génica, funcionales y de interacción con el medio, que se resumen mediante tablas y esquemas presentados en la figura 1.

Las alteraciones cromosómicas más importantes, que además clasifican al mieloma desde el punto de vista molecular, son las traslocaciones que tienen lugar entre el gen de la cadena pesada de la Ig (gen *IGH*) y otros genes y las alteraciones de la ploidía. Así se describen dos grandes grupos de mieloma desde el punto de vista patogénico: los mielomas hiperdiploides y los mielomas no hiperdiploides. Estos últimos presentan traslocaciones recurrentes del gen *IGH* en más del 85% de los casos, así como mayor frecuencia de alteraciones en otros cromosomas y tienen peor pronóstico que los del primer grupo.

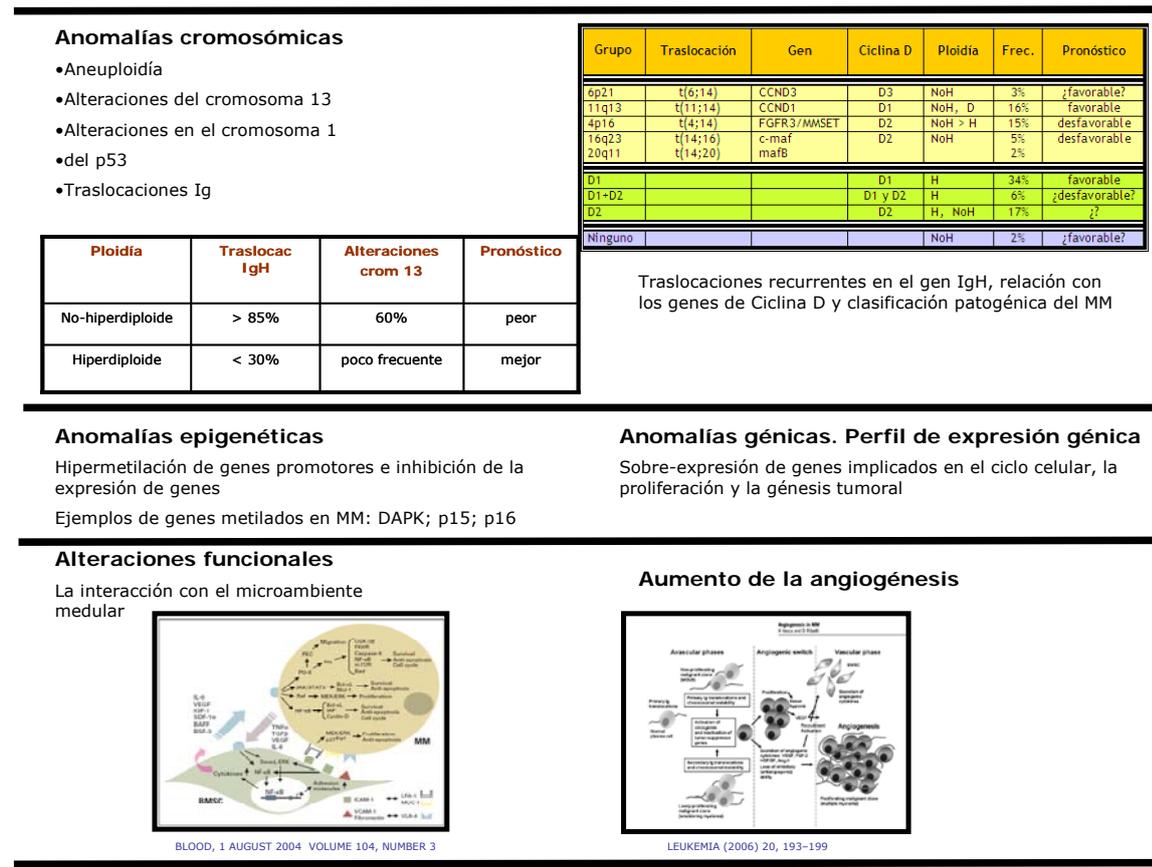
Bien directamente por una traslocación cromosómica conocida entre *IGH* y otros genes (6p21; 11q13; genes *MAF*), o bien por mecanismo desconocido en el resto de los casos, en más del 95% de los mielomas podemos encontrar alteración en la expresión de los genes de Ciclina D, siendo ésta un regulador positivo del ciclo celular¹⁵.

Entre las anomalías epigenéticas del mieloma se ha descrito la hipermetilación de ciertos genes con la consecuente inactivación de su expresión.

También se sabe por estudios de expresión génica (estudios de *arrays*) que muchos de los genes implicados en el ciclo celular, la proliferación y la génesis tumoral, están sobre-expresados en esta enfermedad.

La interacción de la célula plasmática tumoral con el micro ambiente medular y el papel de la angiogénesis, son fenómenos complejos pero ampliamente descritos, sin los cuales no se explica ya la fisiopatogenia del tumor.

Figura 1. Eventos patogénicos en el MM



MODELO PATOGENICO

Desde hace años se acepta que la patogenia del mieloma es un proceso desarrollado en múltiples pasos, con adquisición secuencial de distintas alteraciones y progresión a distintas fases de la enfermedad^{15,16}.

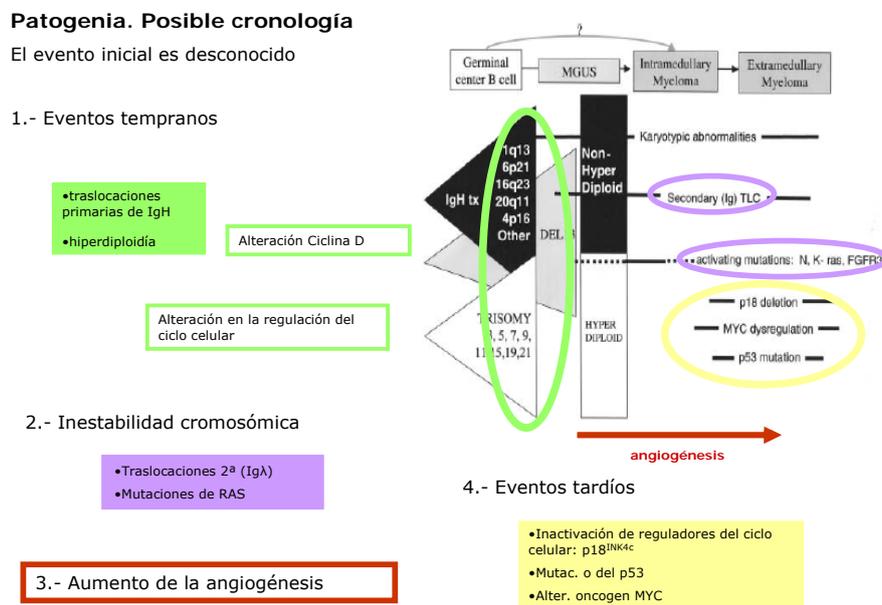
Los eventos tempranos (alteraciones cromosómicas como las traslocaciones de *IGH* o la hiperdiploidía) ocurrirían en el centro germinal. Al menos un evento patogénico que parece universal y temprano y que es la alteración en la expresión de los genes de Ciclina D, se produce como consecuencia de estas anomalías. Después de esto, la célula quedaría con inestabilidad cromosómica y se podrían sumar otras traslocaciones

secundarias o mutaciones de genes como el gen RAS, que podrían relacionarse con el paso de fases asintomáticas a MM sintomático¹⁷.

La enfermedad puede quedar un tiempo estable, pero posteriormente se pueden añadir otros eventos tardíos como la inactivación de reguladores del ciclo celular (p18INK4c), mutaciones o deleciones del gen TP53 (gen de la proteína p53) o alteraciones del oncogen MYC, que serían los responsables de la progresión a fases más proliferativas y agresivas¹⁷.

La alteración de la angiogénesis es otro fenómeno que progresa de forma paralela a la enfermedad, pudiendo ser a su vez un factor patogénico de la misma¹⁸. En la figura 2 se muestra un esquema de la cronología del mieloma (tomado de *Kuehl WH, ASH2005*)¹⁷.

Figura 2. Patogenia y cronología del mieloma



CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS. DIAGNÓSTICO

Los síntomas más frecuentes de presentación son la fatiga, el dolor óseo y las infecciones recurrentes¹⁹. Hay anemia al diagnóstico en el 70% de los casos, aumento de creatinina en casi la mitad e hipercalcemia en el 25%. La radiología convencional muestra a normalidades en el 80% y la proteína monoclonal (proteína M) se detecta en suero por electroforesis en el 82% y por inmunofijación en el 93%.

Un 3% se consideran mielomas no secretores, pues no se detecta la proteína M ni en el suero ni en la orina. En estos casos se está empleando la detección de cadenas ligeras libres en el suero^{20,21}.

El diagnóstico de mieloma requiere una infiltración medular por células plasmáticas de al menos un 10%, la presencia de proteína M en suero y/o en orina y la evidencia de daño de un órgano diana (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas que no se justifiquen por otra causa). En la tabla 2 se resumen los criterios para el diagnóstico diferencial entre gammapatía monoclonal de significado incierto, mieloma indolente o "smoldering" y mieloma sintomático, acordados por el Grupo de Trabajo Internacional de Mieloma en el año 2003²².

Tabla 2. Criterios para la clasificación de las gammapatías monoclonales (tomados del *International Myeloma Working Group 2003*)

<p>Tabla I. Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (GMSI)</p> <p>Proteína M en suero < 30g/l Células plasmáticas clonales en MO <10% No evidencia de otras enfermedades linfoproliferativas B Ausencia de daño en órganos o tejidos, incluido lesiones óseas</p>	<p>Tabla III. Mieloma asintomático (<i>smoldering myeloma</i>)</p> <p>Proteína M en suero ≥ 30g/l y/o Células plasmáticas clonales en MO ≥10% Ausencia de daño en órganos o tejidos, incluido lesiones óseas y ausencia de síntomas</p>
<p>Tabla II. Daño orgánico relacionado con Mieloma, debido a la proliferación de células plasmáticas</p> <p>Aumento de los niveles de calcio sérico >0.25mmol/l del límite superior de la normalidad o Ca⁺⁺ sérico >2.75mmol/l Insuficiencia renal: Creat >173mmol/l Anemia: Hb 2gr/dl menor al límite inferior de la normalidad o <10gr/dl Lesiones óseas: lesiones líticas u osteoporosis con fracturas Otras: hiperviscosidad sintomática, amiloidosis, infecciones bacterianas recurrentes (>2 en 12 meses)</p>	<p>Tabla IV. Mieloma Múltiple sintomático</p> <p>Proteína M en suero o en orina Células plasmáticas clonales en MO* o plasmocitoma Daño en órganos o tejidos relacionado con Mieloma, incluido lesiones óseas</p> <p>*Si se realiza CMF, la mayoría de las células plasmáticas (>90%) presentarán fenotipo neoplásico</p>

PRONÓSTICO

La supervivencia media es de unos 3 años, aunque hay pacientes que viven más de 10 años desde el diagnóstico. Desde 1975 se ha utilizado la clasificación pronóstica de Durie-Salmon²³, pero tiene algunas limitaciones, sobre todo a la hora de categorizar las lesiones óseas. Recientemente se ha publicado el Sistema de Estadiaje Internacional (SEI), fruto del trabajo de 17 instituciones y el análisis de 11,171 pacientes (tabla 3)²⁴. Una vez clasificados los pacientes según el SEI, existen otros factores pronósticos mayores e independientes que ayudan a predecir la evolución, como son: el *performance status*; la citogenética convencional si existe delección del cromosoma 13 o hipodiploidía;

la existencia de t(4;14), t(14;16) o del (17p) por FISH; los niveles elevados de LDH; la morfología plasmablastica y el índice de proliferación²⁵⁻²⁹. Tener dos, uno o ninguno de estos factores separa claramente tres grupos con distinta supervivencia³⁰.

Tabla 3. Sistema de Estadiaje Internacional

Estadio	Frecuencia (% pacientes)*	Supervivencia media (meses)	% de pacientes con estadio III de Durie-salmon
Estadio I Albúmina >3.5gr/l y β_2 microglobulina <3.5 μ g/ml	29	62	38
Estadio II Cuando no tiene criterios de I ni de III	38	44	54
Estadio III β_2 microglobulina \geq 5.5 μ g/ml	34	29	70

*el % no es exactamente el 100% por el redondeo

Finalmente, podemos definir un MM de alto riesgo cuando presenta cualquiera de los factores de la tabla 4, donde se estima que la supervivencia media es de 2-3 años, comparado con más de 6-7 años fuera de este grupo²⁸.

Otras características como la edad, el nivel de hemoglobina, calcio, creatinina, albúmina, subtipo de Ig y extensión de la infiltración medular, aunque también tienen valor pronóstico, no añaden valor adicional a lo comentado previamente.

Tabla 4. Criterios de MM de alto riesgo de la Clínica Mayo

Anomalía de alto riesgo	% de pacientes que presentan la anomalía al diagnóstico
Citogenética convencional del 13 (monosomía)	14
hipodiploidía	9
hipodiploidía o del 13	17
FISH	
t(4;14)	15
t(14;16)	5
17p-	10
<i>Plasma cell labeling index</i> \geq 3%	6
Una cualquiera de estas anomalías	25-30

TRATAMIENTO

Bien porque el mieloma no es una enfermedad que compromete la vida de forma inmediata al menos en la mayoría de los casos, bien porque la edad media al diagnóstico es de unos 65 años, bien porque no ha habido ningún tratamiento curativo, o bien por todo ello, el enfoque histórico del manejo de esta enfermedad ha sido, hasta ahora, fundamentalmente paliativo.

La combinación Melfalán+Prednisona (MP) se ha mantenido como "*gold standard*" del tratamiento durante casi cuatro décadas, a pesar de su limitada eficacia (50-60% de respuestas parciales y menos del 5% de remisiones completas, con supervivencia media de 3 años)³¹.

La adición de otros agentes alquilantes, antraciclinas y alcaloides de la vinca a este régimen, no consiguió mejorar la supervivencia³². Con dosis escaladas de esteroides

como la pauta VAD (Vincristina, Adriamicina, Dexametasona), se conseguía una marcada y rápida citorreducción en el 50% de los pacientes que recaían tras MP, pero no se incrementó por ello la tasa de remisión completa ni se prolongó la supervivencia.³³

El siguiente paso lo marcó la experiencia en el tratamiento de las leucemias agudas, donde se sabía que la condición *sine qua non* para prolongar la supervivencia era la obtención de remisiones completas. Así se empezó a intensificar el tratamiento, siendo el Melfalán de nuevo el fármaco elegido debido a su probada eficacia y a que se podía asumir su toxicidad. Aunque los primeros ensayos con Melfalán a dosis altas se realizaron sin soporte de trasplante³⁴, rápidamente el trasplante de MO y posteriormente de progenitores de SP, se convirtieron en el tratamiento más eficaz en los años 90³⁵, consiguiendo evidencias de que este tratamiento superaba los resultados de la QT convencional^{36,37}. El doble trasplante autólogo en tandem lo han empleado diferentes grupos. Mientras que los grupos francés y alemán³⁸ no consiguieron encontrar beneficios, otros grupos, entre ellos el español GELTAMO³⁹, encontró que el doble trasplante mejoraba el pronóstico al menos de los pacientes que no obtuvieron remisión completa con el primer trasplante^{40,41}.

El trasplante alogénico no ha sido un tratamiento empleado habitualmente debido a la edad media de los pacientes al diagnóstico, la alta mortalidad relacionada con el procedimiento y a no haber demostrado superar los resultados del trasplante autólogo⁴²⁻⁴⁴. Con los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida, se está mejorando el panorama de este tipo de trasplante y, aunque podría ser una alternativa en los casos de alto riesgo, todavía no se puede generalizar la recomendación.

Paralelamente al tratamiento citotóxico, se ha ido mejorando el tratamiento de soporte, generalizándose el uso de bifosfonatos^{45,46}, eritropoyetina⁴⁷ e introduciéndose técnicas quirúrgicas poco invasivas para el tratamiento de la enfermedad ósea, como la vertebroplastia⁴⁸ y la quiroplastia⁴⁹.

NUEVAS TERAPIAS

A pesar de la mejoría en la supervivencia con altas dosis de QT, el MM continúa siendo una enfermedad incurable. Este hecho, junto con los numerosos estudios publicados en los últimos años que caracterizan los mecanismos de interacción entre el MM y el medio medular, los mecanismos de regulación del crecimiento tumoral y la supervivencia y la migración de las células, han proporcionado un marco incomparable para el desarrollo y la investigación de nuevos fármacos.

Ya no se trata sólo de acabar con la célula tumoral, sino de interferir en su medio ambiente y en las interrelaciones entre ambos.

Talidomida y análogos

La talidomida se empezó a considerar por su efecto antiangiogénico⁵⁰ en el tratamiento del mieloma en 1998, al comprobarse que el aumento de vascularización en las biopsias de MO de los pacientes tenía importancia en el pronóstico⁵¹. Los primeros trabajos a finales de los 90 y principios del 2000 se empezaron con pacientes en recaída, consiguiéndose un 25% de respuestas en pacientes previamente refractarios^{52,53}.

Actualmente se sabe que el efecto antiangiogénico no es el único por el que la Talidomida es eficaz en el MM⁵⁴⁻⁵⁸.

La Talidomida se ha utilizado sólo y en combinación con Dexametasona, consiguiéndose con esta última hasta un 55% de respuestas en casos de refractariedad a tratamientos previos⁵⁹. También se ha ensayado con otros esquemas de tratamiento⁶⁰.

Tras comprobarse los beneficios obtenidos en los casos de recaídas, se comenzó a emplear como tratamiento de primera línea^{61,62}. En la actualidad, con el propósito de mejorar la eficacia y reducir la toxicidad, se emplean ya los derivados análogos de este fármaco, los IMiDs (*immunomodulatory thalidomide analogs*) como Revimid o CC-5013⁶³.

Inhibidores del proteasoma. Bortezomib

El sistema proteolítico del proteasoma y su contribución a la regulación del ciclo celular, fue descrito en 1996⁶⁴. Los inhibidores del proteasoma como nueva herramienta terapéutica se empezaron a ensayar en 1999⁶⁵. Gracias a los estudios de *microarrays* se han identificado mecanismos de acción de este fármaco, como la inhibición del crecimiento y supervivencia tumoral, el aumento de la apoptosis, la inhibición de la reparación del ADN y la actividad antiangiogénica^{66,67}. El primer estudio en fase 1 se publica en el 2002⁶⁸ y rápidamente se empiezan los estudios en fase 2 en pacientes refractarios con resultados prometedores (tasa general de respuestas del 35% con un 24% de casos que se mantienen con enfermedad estable sin progresar)⁶⁹. Esto ha originado la aprobación del fármaco por la FDA en un tiempo récord. En los ensayos actuales este fármaco se incluye ya como primera línea de tratamiento.

Otros nuevos fármacos

Se están ensayando una gran cantidad de fármacos que actúan sobre el tumor y el medio. Algunos ejemplos son el trióxido de arsénico, los inhibidores de citoquinas claves como factor de crecimiento derivado del endotelio (VEGF), los inhibidores de farnesil-transferasa, de histona-deacetilasa, de proteínas de choque térmico. Aunque la lista puede ser muy larga, todavía no han alcanzado la importancia de los anteriores.

El futuro

Podemos decir, que las claves del nuevo paradigma en el tratamiento del mieloma son: tratar el tumor y el medio en el que se desarrolla, interferir en los mecanismos moleculares de sensibilidad y resistencia a drogas y acercarnos cada vez más a las terapias selectivas.

2. Los genes de las inmunoglobulinas

Las Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Igs) se describieron a mediados del siglo pasado^{70,71}. Constituyen el componente básico de la respuesta inmune humoral, encargadas de reconocer a los antígenos, unirse a ellos y desencadenar los pasos para la inactivación o eliminación de agentes patógenos.

Son proteínas compuestas por 4 cadenas polipeptídicas, idénticas dos a dos, unidas por enlaces covalentes de puentes disulfuro. Las dos de mayor peso molecular son las cadenas pesadas (IgH) y las dos menores son las cadenas ligeras (IgL). Hay cinco tipos de cadenas pesadas que definen el isotipo de la Ig y que se diferencian en cuanto al tamaño, la carga, la composición de aminoácidos y el contenido de hidratos de carbono⁷² (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) y dos tipos de cadenas ligeras (kappa y lambda). En la molécula de Ig, una vez ensamblada, se puede distinguir una región variable en el extremo aminoterminal (Fab) implicada en el reconocimiento antigénico y una región constante en el extremo carboxiterminal (Fc) que participa en las funciones efectoras celulares, como desencadenar señales de transducción post-membrana y facilitar la unión de la Ig a otras proteínas, células y tejidos⁷³ (figura 3). La Ig de superficie, o receptor de la célula B (BCR), se une en la membrana de la célula a un heterodímero denominado CD79, siendo esta unión necesaria para la transmisión de las señales⁷⁴.

Las células plasmáticas neoplásicas del mieloma sintetizan y segregan en la mayoría de los casos un tipo de Ig que puede ser detectada en suero y/o en orina, conocida como proteína M o monoclonal. Así el mieloma puede ser IgG, IgA, etc, según la inmunoglobulina que sintetice de forma aberrante. En una revisión reciente, las frecuencias de los diferentes tipos de mieloma según la Ig que se detecta son las siguientes: IgG 58%; IgA 23.3%; IgM 3.4%; IgD 2.9%; mielomas que sólo expresan cadenas ligeras 10.9% y mielomas no secretores e IgE 2.1%²⁴. En cuanto a las cadenas ligeras, un 63% de mielomas expresan kappa y un 37% lambda¹⁹.

Los genes de las inmunoglobulinas

La capacidad para reordenar el ADN germinal es exclusiva de las células linfoides, tanto B como T. Los linfocitos B, durante su proceso madurativo, reordenan los genes de las inmunoglobulinas, lo que resulta esencial para producir un repertorio funcional y casi infinito de anticuerpos (figura 3).

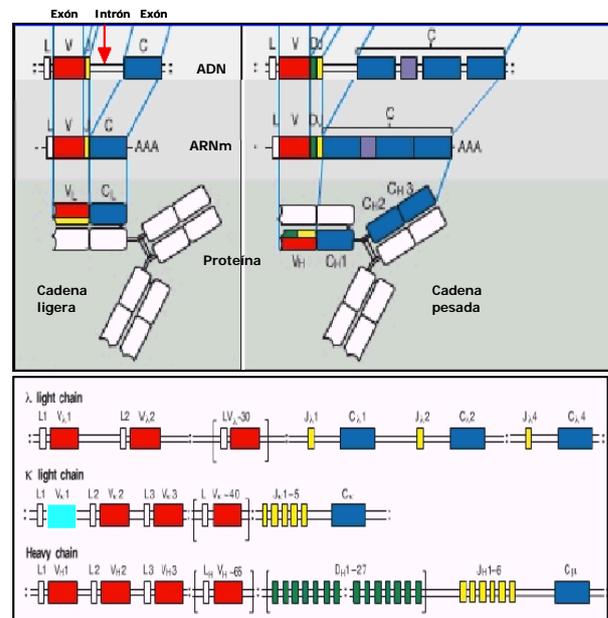
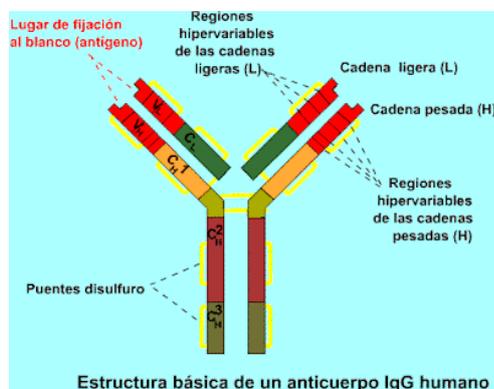
Los primeros artículos acerca de la evidencia de que existían múltiples genes que codificaban inmunoglobulinas, datan de principios de los años 70^{75,76}. Poco después se empieza a hablar de reordenamientos y de genes que codifican regiones constantes y variables de la proteína⁷⁷⁻⁷⁹. En los años 80 se publican más de 1700 artículos sobre los genes de las inmunoglobulinas y el número se triplica en los años 90.

El estudio de la organización de estos genes y la configuración de los reordenamientos ha contribuido al conocimiento de la historia natural del mieloma y ha proporcionado información acerca del origen clonal de la enfermedad. Además, actualmente proporciona una herramienta clínica para el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad.

Figura 3. La molécula de Ig y los genes de las Igs

Imagen derecha: genes de las Igs, estructura germinal y mecanismo de reordenamiento

Imagen inferior: esquema de la molécula de Ig



ESTRUCTURA DE LOS GENES DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Los genes que codifican las Igs se localizan en tres cromosomas diferentes: el cromosoma 14 (14q32) para la cadena pesada, el 2 (2p12) para la cadena ligera kappa y el 22 (22q11) para la cadena ligera lambda.

En todos estos genes se pueden distinguir varias regiones genéticas denominadas V (variable) D (diversidad, sólo en el gen de la cadena pesada) y J (unión, del inglés *joining*), constituidas a su vez por numerosos segmentos génicos (figura 3).

GEN DE LA CADENA PESADA (IGH)

El locus de la cadena pesada contiene más de 120 segmentos V_H (aunque sólo 51 son funcionales) agrupados en siete familias, 27 segmentos D_H también agrupados en siete familias y 6 segmentos J_H ^{80,81}. Cada uno de estos segmentos está flanqueado por unas secuencias denominadas secuencias señal de la recombinación (*recombination signal sequences* o RSS), constituidas por un heptámetro palindrómico igual en todos los segmentos, un nonámetro de secuencia también conservada y una secuencia o espaciador entre ambos que ocupa 12 ó 23pb. La recombinación génica, que veremos más

adelante, se produce siempre entre estas secuencias RSS⁸². Las secuencias RSS están también en los genes de las cadenas ligeras.

A continuación de los segmentos variables se localizan los genes de la región constante, que codifican cada uno de los nueve isotipos posibles de la cadena pesada: μ , δ , γ_{1-4} , α_{1-2} y ϵ . Cada segmento constante funcional, excepto C δ , está precedido por una región necesaria para el cambio de isotipo (región *switch*)⁸³.

GEN DE LA CADENA LIGERA KAPPA (IGK)

Está formado por 76 segmentos V κ agrupados en siete familias, 5 segmentos J κ y un segmento constante C κ ⁸⁴. Algunas familias V κ tienen genes funcionales y pseudogenes, mientras que otras sólo tienen un pequeño número de segmentos⁸⁵. Los segmentos V κ están distribuidos inmediatamente antes de los J κ , en sentido 5'-3', pero también los hay más distales y con orientación invertida⁸⁶. Localizada a 24Kb en dirección telomérica respecto a C κ , se encuentra la secuencia denominada Kde (*kappa deleting element*), que está implicada en los reordenamientos que se producen en el gen en el caso de no conseguirse alelos funcionales VJ κ y procederse a su delección⁸⁷.

GEN DE LA CADENA LIGERA LAMBDA (IGL)

El locus de *IGL* tiene 10 familias de segmentos V λ (más de 70 segmentos, de los cuales 36 son funcionales), 7 segmentos J λ y 7 segmentos C λ prácticamente idénticos entre si, tres de los cuales son pseudogenes no funcionales⁸⁸.

Descripción del proceso secuencial de reordenamiento génico

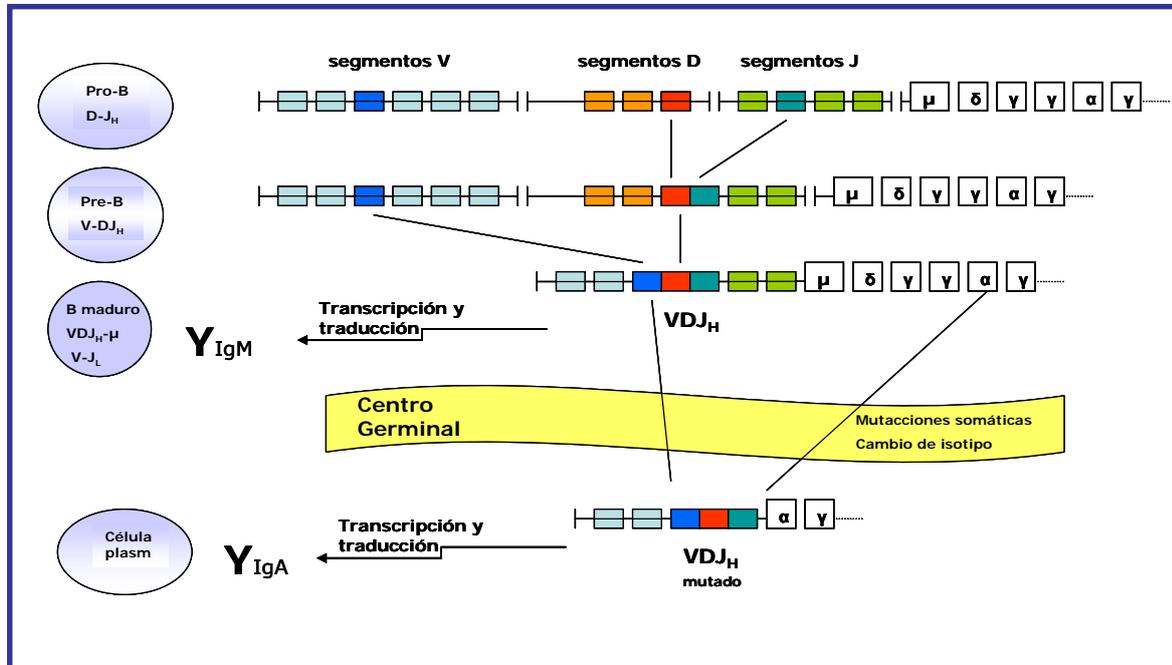
El gen de la cadena pesada *IGH* se reordena en los estadios de célula pro-B y pre-B, en la médula ósea; primero ocurre la unión entre los segmentos D-JH y luego V-DJH (figura 4). Si con el primer reordenamiento se produce un alelo VDJH funcional, continúa el proceso, si no, se reordena el segundo. Así puede darse el caso de que existan 2 reordenamientos completos VDJH pero sólo uno sea funcional, o que haya un reordenamiento completo VDJH funcional y el otro haya quedado en el paso anterior como reordenamiento incompleto DJH.

Como se mencionó anteriormente, cada segmento V, D y J está flanqueado por unas secuencias RSS, cuya diferencia entre ellas consiste en la longitud del espaciador entre el heptámero y el nonámero. Los espaciadores que flanquean los genes V y los genes J son de 23pb, los de los genes D son de 12pb. La recombinación sólo ocurre entre genes flanqueados por espaciadores de distinto tamaño (regla conocida como 12/23), con lo que se asegura que no haya uniones V-V, D-D o J-J y que se utilicen los segmentos D para aumentar la diversidad del repertorio inmune⁸⁹.

Figura 4. Proceso secuencial del reordenamiento génico de la cadena pesada de la Ig

Se representa el reordenamiento del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*)

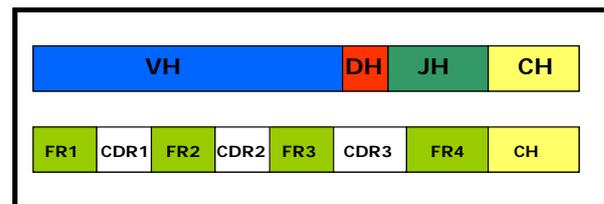
Los pasos anteriores al centro germinal constituyen la maduración independiente del antígeno, mientras que en el centro germinal ocurren las mutaciones somáticas y el cambio de isotipo de la Ig, considerados como procesos dependientes de antígeno



Una vez reordenado el dominio variable, se pueden diferenciar en él tres zonas hipervariables (CDR) encargadas de la afinidad de la Ig por un antígeno determinado⁹⁰, que están rodeadas por otras regiones relativamente conservadas (FR o *framework*) (figura 5).

Figura 5. Regiones hipervariables del gen de la cadena pesada de la Ig

De las tres regiones CDR, las dos primeras, CDR1 y CDR2, están formadas por secuencias de los genes V, pero la región CDR3 es la que contiene la unión VDJ



En el momento en el que se consigue un alelo funcional, se inicia la producción de cadenas pesadas μ (también pueden producirse cadenas δ por *splicing* alternativo), que se acumulan en el citoplasma. La detección de cadenas pesadas en el citoplasma de la célula es un marcador tradicional de la célula B, que además define su estadio, en este momento todavía pre-B. Aunque aún no se han producido cadenas ligeras y por tanto no existe la molécula de Ig completa para expresarse en superficie como receptor de célula B (BCR), se sabe que se forma un receptor inmaduro (pre-BCR) que es capaz de anclarse

también a la molécula de membrana CD79 y que juega un papel clave en el mantenimiento de la jerarquía de todo este proceso.

Estudios realizados en células B precursoras de ratones identificaron este receptor inmaduro, que consiste en las 2 cadenas pesadas μ ya constituídas, asociadas de forma covalente a unas pseudo cadenas ligeras; estas pseudo cadenas ligeras están formadas por dos proteínas, $\lambda 5$ y VpreB, homólogas a las cadenas ligeras, pero cuyos genes no han sufrido el proceso de reordenamiento⁹¹⁻⁹⁴. Parece que la expresión de este receptor inmaduro o pre-BCR en la membrana celular, es necesario para dos eventos importantes: por un lado, para bloquear el reordenamiento de los genes de la cadena pesada del cromosoma homólogo (conocido éste como mecanismo de exclusión alélica) y por otro lado, para activar el reordenamiento secuencial de las cadenas ligeras.

Por tanto, de no constituirse este complejo sería porque no se ha conseguido un alelo funcional en el primer cromosoma, por lo tanto no hay señal para bloquear al cromosoma homólogo, que intentará reordenar el segundo alelo; si éste también fracasara, nunca se expresará el complejo pre-BCR en la superficie celular y no se recibirán señales para continuar la diferenciación linfocítica, con lo que la célula entraría en apoptosis⁹⁵.

El reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras se activa, como ya se ha mencionado, una vez que se ha conseguido un alelo funcional de la cadena pesada. Para las cadenas ligeras existe también un orden específico. Se empieza reordenando el locus de Kappa, reordenamiento de los segmentos $V\kappa$ - $J\kappa$. Si se produce el alelo funcional, se transcriben y sintetizan las cadenas ligeras kappa que se unen a las pesadas μ o δ , formando la Ig completa, que al expresarse en la superficie celular bloquea el reordenamiento de los genes lambda.

Si ninguno de los alelos kappa resultó funcional, se procede al reordenamiento del gen lambda⁹⁶. Esto suele acompañarse de una delección del reordenamiento improductivo kappa, mediante el reordenamiento con el fragmento Kde^{87,97}; este elemento distal puede reordenarse tanto con un segmento V ($V\kappa$ -Kde), como con una secuencia intrónica (intrón-Kde)⁹⁷⁻⁹⁹, conduciendo cualquiera de ellos a la inactivación del alelo. Así se evita la competencia entre la cadena aberrante kappa y la cadena lambda que sería la funcional.

Finalmente, la molécula de Ig completa, se une al heterodímero CD79 para anclarse en la membrana y transmitir señales al interior de la célula.

Ahora bien, para que estos reordenamientos se lleven a cabo, se han de expresar ciertas proteínas reguladoras del proceso, como son:

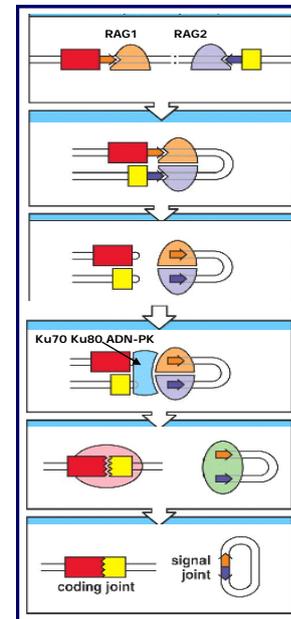
- Proteínas codificadas por los genes activadores de la recombinación (RAG), RAG1 y RAG2.
- Proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK).

- Complejo heterodimérico formado por las proteínas de unión al ADN denominadas Ku-70 y Ku-80.
- Enzima Transferasa deoxinucleotidil-terminal o Tdt.

El proceso comienza con la unión de RAG1 y RAG2 a las secuencias señal de la recombinación RSS. Se resume en la figura 6.

Figura 6. Regulación del proceso de reordenamiento

El primer paso que acontece es la unión de RAG1 y RAG2 a las RSS, adoptando una conformación de horquilla^{100,101} y produciéndose luego el corte de las cadenas. En los extremos del ADN que han quedado libres se unen la ADN-PK y las proteínas Ku-70 y Ku-80¹⁰²⁻¹⁰⁵; así se estimula el ensamblaje de los extremos codificantes por un lado y de los extremos señal por otro. En este momento, la enzima Tdt inserta nucleótidos al azar¹⁰⁶, las nucleasas eliminan el exceso de ADN y las polimerasas rellenan los huecos. Finalmente los extremos se unen por la acción de la ADN-ligasas



Hasta aquí se considera que el proceso de maduración es independiente del antígeno. Tenemos ahora un linfocito B precoz, inmaduro pero inmunocompetente, que ya es capaz de reconocer antígenos. Llegados a este punto, entre la diversidad combinatoria de los genes V(D)J y las deleciones e inserciones aleatorias de nucleótidos que se producen durante el proceso, se ha conseguido ya incrementar hasta 10^6 la variabilidad de las regiones de unión.

A partir de ahora, la maduración estará encaminada a aumentar la afinidad por el antígeno, estimándose que al final de este proceso el repertorio primario de Igs o anticuerpos alcanzará un valor de 10^{12} .

Maduración dependiente del antígeno

Tiene lugar en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios, donde el linfocito B se encuentra con el estímulo antigénico. Jerne y Burnet fueron los primeros en proponer la idea de la selección clonal, esto es, que cada linfocito produce una Ig y que el antígeno selecciona y estimula sólo a los linfocitos que tengan una determinada Ig^{107,108}.

Ocurren así dos fenómenos claves para aumentar la variabilidad de la respuesta inmune, la hipermutación somática de los genes reordenados V(D)J que codifican la región variable de la Ig y la posterior selección positiva de clones mutados cuyos genes V expresan mayor afinidad por el antígeno que desencadenó el estímulo¹⁰⁹.

Finalmente, el cambio de isotipo, también en el centro germinal, contribuye a la maduración y variabilidad de la respuesta inmune (figura 4).

HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA

Puede llegar a aumentar la afinidad de la Ig por el antígeno entre 10 y 100 veces¹¹⁰. La región que se ve afectada por este proceso abarca desde el promotor de VDJ hasta el intrón J_H-C_μ¹¹¹.

Las mutaciones somáticas suelen ser puntuales, pero se han descrito también inserciones y deleciones¹¹²; pueden provocar un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína (mutaciones reemplazantes) o pueden ser silentes. Las mutaciones reemplazantes son más frecuentes en las regiones CDRs que en las regiones FRs^{109,113}.

En células no linfoides, la frecuencia de mutaciones somáticas es mucho menor (entre 5-6 logaritmos menos) que en los linfocitos, donde se ha calculado que la frecuencia de que ocurra una mutación es en una base de cada 1000 (10^{-3}) en cada célula y generación^{114,115}.

CAMBIO DE ISOTIPO (SWITCHING)

Es el proceso por el cual se reordenan los genes que codifican las regiones constantes de la cadena pesada de las Igs. Se produce por la recombinación entre secuencias repetitivas (secuencias de *switch*), localizadas en el extremo 5' de cada uno de los genes de las regiones constantes^{116,117}.

A partir de la activación inducida por el antígeno, se producirán Igs de distinto isotipo (IgA, IgG, IgE), aunque con igual afinidad antigénica^{118,119}.

Las inmunoglobulinas y sus genes en el Mieloma Múltiple

Centrándonos ya en la patología, en la tabla 5 se resumen las frecuencias de reordenamientos clonales en los Síndromes Linfoproliferativos (SLP) maduros en general y en el MM en particular. Mediante análisis de *Southern Blot*, se ha visto la presencia de reordenamientos clonales en cerca del 100% de pacientes con neoplasias B maduras, con casi un 80% de reordenamientos en los dos alelos¹²⁰.

En el MM, las células plasmáticas malignas segregan Igs codificadas por el reordenamiento funcional VDJ; el otro alelo puede encontrarse en configuración germinal, tener un reordenamiento incompleto DJH, o incluso tener otro reordenamiento completo VDJH no funcional. Se ha visto por PCR en una larga serie de pacientes con

MM, que hasta en un 60% de los casos puede haber un reordenamiento incompleto del alelo no productivo¹²¹. En cuanto a los reordenamientos de las cadenas ligeras, los MM kappa tendrían un reordenamiento VJk funcional y el gen lambda en configuración germinal en la mayoría de los casos y los MM lambda tendrían un reordenamiento VJ_λ funcional y reordenamientos del segmento Kde en uno o los dos alelos kappa. Esto es debido a que los reordenamientos de Kde reflejan la fase final de una recombinación que no ha sido exitosa en el locus kappa, anterior al reordenamiento lambda¹²².

No obstante, y a pesar del mecanismo de exclusión alélica, se han encontrado algunos casos de mieloma con más reordenamientos de los esperados tras todo lo expuesto anteriormente, por lo que se ha asumido la existencia de mielomas biclonales^{123,124}, aunque son muy raros (1-2%)^{24,125}.

Tabla 5. Frecuencia de reordenamientos clonales de los genes de las Igs en los SLP maduros y en el MM

SLP MADUROS	MM (González y cols ¹²⁶ y Hadzidimitriou y cols ¹²⁷)
VDJH: 95% DJH: 60%	VDJH: 84% DJH: 60%
SLP kappa 100% al menos un KVJ 30% Kde 95% lambda germinal	MM kappa 100% al menos un KVJ 40% Kde
SLP lambda 100% LVJ Casi todos Kde	MM lambda 100% LVJ 71% Kde 40% KVJ

En cuanto a la preferencia de utilización de ciertos segmentos en los reordenamientos, se han publicado varios trabajos tanto en linfocitos B normales como en el MM¹²⁶⁻¹³⁰. Uno de los hallazgos más interesantes es la ausencia del segmento VH4-34 en el repertorio funcional de las células plasmáticas¹³⁰⁻¹³², aunque si está presente en los alelos no funcionales o muy mutados de los MM¹²⁶. Esto podría ser la explicación de la baja incidencia de fenómenos autoinmunes en el MM, puesto que se sabe que el segmento VH4-34 codifica anticuerpos que son autorreactivos¹³⁰. También este hallazgo refuerza la idea de que el mieloma se origine tras el paso por el centro germinal, donde la célula ha descartado ya las Igs reactivas, ha sufrido la hipermutación somática y a partir de ahí no presenta variaciones intraclonales¹³³⁻¹³⁶.

Del resto de las familias de segmentos VH, la familia VH3 es la más representada y en concreto el segmento VH3-5 no se ha visto en células B normales ni en otras neoplasias B salvo en el mieloma y la familia VH1 es la menos representada¹²⁶.

En cuanto a los segmentos DH, las familias más representadas tanto en reordenamientos completos VDJH como incompletos DJH, son la DH2 y DH3^{126,127,133}; la familia DH1 está poco representada, con algunas variaciones en la utilización de algunos segmentos de esta familia entre los reordenamientos completos e incompletos, por ejemplo, DH1-01 sólo se ha visto en los completos, DH1-07 sólo en los incompletos y DH1-14 y DH1-20 están ausentes en ambos^{126,127}.

Por último, de las familias JH, la JH4 es la más frecuentemente empleada en ambos tipos de reordenamientos y las familias JH1 y JH2 las menos¹²⁶.

Lo que sugiere todo esto, es que algunos segmentos pueden sufrir selección positiva o negativa después de la recombinación de las células precursoras. Esto haría pensar en el posible papel etiológico que pueden jugar los antígenos ambientales.

Para terminar el repaso de los genes de las Igs en el MM, falta destacar la frecuencia de mutaciones somáticas en las regiones variables VDHJ, mayor que en cualquier otra neoplasia B, con una media del 7.8%-9%, llegando a veces hasta el 23% de nucleótidos diferentes respecto a la secuencia germinal^{121,126,132,134,136}.

Los reordenamientos incompletos DHJ se caracterizan, sin embargo, por la relativa ausencia de mutaciones¹²¹, aunque hasta un 10% de estos reordenamientos pueden llevar algunas, que suelen ser mutaciones puntuales más que deleciones e inserciones^{137,138}.

Precisamente la baja frecuencia de mutaciones encontradas en los reordenamientos DJH, los van a convertir en una alternativa muy útil para el diagnóstico de clonalidad y para el seguimiento de la enfermedad por técnicas de PCR^{139,140}, como revisaremos inmediatamente.

Respecto a la presencia de mutaciones somáticas en los genes de las cadenas ligeras, existen diversos trabajos que lo confirman, aunque el grado es muy variable^{136,141-145}.

Por último, y para complicarlo todo un poco más, hay que decir que a pesar de esta estructurada jerarquía del reordenamiento génico expuesta hasta ahora, es posible la existencia de segundos reordenamientos, a pesar de haber conseguido previamente una Ig funcional. Este proceso se denomina "edición del receptor", ocurre en los linfocitos maduros en la MO y es un recurso fisiológico del sistema inmune para mantener la tolerancia frente a los antígenos propios. Así, una Ig autorreactiva sufre selección negativa, produciéndose nuevos reordenamientos secundarios que dan lugar a una nueva Ig sin autorreactividad¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Pues bien, datos recientes indican que este fenómeno puede ocurrir en la periferia, en los centros germinales, donde también se encontraba expresión de las proteínas de la maquinaria del reordenamiento (RAG1 y RAG2)¹⁴⁹ y se ha propuesto que contribuye a la maduración de la afinidad de las Igs; por ejemplo, en aquellas que adquirieron mutaciones somáticas deletéreas o residuos que disminuyen significativamente la afinidad por el antígeno, se pueden producir nuevos reordenamientos y someterse de nuevo al proceso de mutación somática. En este caso, en lugar de "edición del receptor", se emplea el término "revisión del receptor"^{150,151}.

El hallazgo de reordenamientos productivos, hipermutados, en el locus kappa (VJ κ) en pacientes con MM lambda, avalaría esta teoría. Esto también explicaría la existencia de más reordenamientos de los esperados, atendiendo exclusivamente al proceso clásico de la recombinación y de la exclusión alélica^{152,153}.

De cualquier modo, parece que en los casos en que pueden encontrarse dos reordenamientos funcionales (un 10% aproximadamente) se puede mantener la expresión de una única Ig por mecanismos de regulación a nivel protéico¹⁵³.

3. Evaluación de la respuesta al tratamiento Enfermedad Mínima Residual

Técnicas moleculares para el diagnóstico de clonalidad

Aunque todavía se pueda especular acerca del origen exacto y de los factores que influyen en la transformación maligna de la célula tumoral en el MM, lo que es indudable es que la neoplasia se origina por transformación de una célula de la cuál derivan las demás (expansión clonal) y por lo tanto todas ellas van a mostrar el mismo patrón de reordenamiento de los genes de las Igs¹⁵⁴. La técnica de referencia para el diagnóstico de clonalidad ha sido durante años la técnica de *Southern blot*. Se basa en la diversidad combinatoria de los diferentes segmentos génicos; permite detectar deleciones y reordenamientos mediante las diferentes distancias entre los puntos de corte que se originan al tratar al ADN con ciertas enzimas de restricción o endonucleasas^{120,155}. Es un método relativamente sensible (límite de detección 5-10%) y aunque es muy fiable y específico, cuenta con ciertos inconvenientes para su aplicación de forma rutinaria: es una técnica cara, laboriosa y necesita ADN de buena calidad. Por estos motivos, en los años 90, la técnica de **reacción en cadena de la polimerasa o PCR** de la región de unión VDJH del gen *IGH*, fue reemplazando al *Southern blot* en el diagnóstico de clonalidad B.

La técnica de PCR detecta los fragmentos genéticos reordenados y el diagnóstico de clonalidad se basa en la diversidad de la región de unión de dichos fragmentos. Es una técnica sencilla, rápida, requiere cantidades pequeñas de ADN y no necesariamente de alta calidad, puede aplicarse a pequeñas biopsias y tejidos en parafina y puede detectar una célula B monoclonal entre un fondo de 10^2 - 10^3 células policlonales.

Detección de clonalidad mediante PCR

Generalmente las técnicas de PCR para el estudio de clonalidad B están diseñadas para amplificar las regiones hipervariables de los genes de las Igs (regiones CDR). Emplean oligonucleótidos o *primers* consenso que flanquean las regiones V y J. Cuando existe un reordenamiento clonal, éste se amplifica y se puede visualizar por diferentes métodos posteriormente.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE PCR

- El método tradicional consiste en someter al producto amplificado en la PCR a una electroforesis en un gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio. Si existe una proliferación clonal, el producto migrará en el gel como una banda única, mientras que si no existe clonalidad o la población clonal es <1%, el resultado será una mancha o *smear* sin bandas definidas, originadas por los múltiples reordenamientos policlonales.
- El resultado de la PCR también se puede visualizar por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (DGGE), análisis de polimorfismos en la conformación de cadena simple (SSCP) y análisis

de heterodúplex, basados en la conformación que adopta el ADN tras desnaturalización y renaturalización^{156,157}.

- Desde la aparición de los secuenciadores automáticos, se ha añadido a este repertorio de técnicas el análisis de fragmentos mediante PCR fluorescente, referida como *genescan*. Para esta técnica uno de los *primers* utilizados en la PCR ha de ser fluorescente, ya que el análisis se realiza en el secuenciador automático equipado de un láser que detecta fluorescencia. Si existe producto clonal aparecerá un pico claramente predominante de alta intensidad de fluorescencia, mientras que los fragmentos policlonales se visualizarán como múltiples picos con una distribución gaussiana^{157,158}. Además se incluye otro marcador fluorescente de peso molecular que nos va a permitir conocer el tamaño exacto del producto de PCR, lo que también es útil a la hora del seguimiento de distintas muestras del mismo paciente.

Uno de los principales problemas de la PCR del gen *IGH* es la frecuencia de falsos negativos. Como ya hemos repasado anteriormente, el gen se caracteriza por presentar una gran variabilidad de reordenamientos que dificultan el diseño de *primers* consenso, así como mutaciones somáticas que impiden la correcta hibridación de los *primers* y por tanto la amplificación adecuada. Esto se ha ido mejorando con el diseño de PCRs que incluyen en la misma reacción diferentes oligonucleótidos frente a las distintas familias V_H ¹⁵⁷.

Otro problema importante es la dificultad para discriminar los productos policlonales de los monoclonales. En este sentido, el análisis de fragmentos por *genescan* ha conseguido mejorar la sensibilidad, ya que la presencia de linfocitos policlonales no condiciona tanto el análisis de clonalidad en esta técnica.

En el año 2003 se publicó el protocolo BIOMED-2, realizado por un grupo de estudio corporativo europeo en el que participaron 48 laboratorios. En este trabajo se diseñaron los *primers* y se optimizaron las condiciones de PCR para el estudio de los genes de las Igs, los genes de los receptores de los linfocitos T y otros reordenamientos presentes en los síndromes linfoproliferativos. Para el estudio de las Igs se diseñaron distintas PCRs con múltiples *primers* en la misma mezcla (que se detallan en el apartado de material y métodos) y que constituyen, hasta la fecha, el protocolo más completo para el estudio de estos genes¹⁵⁷.

Técnicas de seguimiento de la enfermedad residual

Con el estudio del reordenamiento de los genes de las Igs también podemos ver el impacto del tratamiento sobre el clon maligno.

La remisión completa en las enfermedades hematológicas se ha definido clásicamente como la ausencia de detección de células tumorales mediante técnicas citomorfológicas

(sensibilidad del 5%). En el mieloma, además, se tiene en cuenta la desaparición de la proteína monoclonal en la inmunofijación. Sin embargo, a pesar de que con los tratamientos actuales muchos pacientes van a alcanzar remisión completa por estos criterios, la mayoría de ellos acaban recayendo, debido a la existencia de un pequeño número de células malignas que no son detectadas por la metodología convencional, lo que se denomina enfermedad mínima residual (EMR). La monitorización de la EMR se ha reconocido como una importante herramienta para definir la calidad de la respuesta al tratamiento y el riesgo de recaídas¹⁵⁹.

Las técnicas para medir la EMR han de alcanzar una alta sensibilidad, esto es, detectar al menos una célula tumoral entre 10^4 - 10^6 células normales. Las dos más utilizadas en la actualidad son las técnicas de inmunofenotipo por citometría de flujo y la PCR.

Las estrategias de PCR que mejoran la sensibilidad frente a la PCR convencional, son la PCR alelo-específica y la PCR cuantitativa en tiempo real.

PCR ALELO-ESPECÍFICA O ASO-PCR

Se trata de una PCR en la que se utilizan oligonucleótidos específicos del clon tumoral, diseñados en la región hipervariable del reordenamiento de cada paciente. En un primer paso se realiza una PCR convencional con *primers* consenso para detectar el reordenamiento clonal, posteriormente se secuencian la región CDR y se diseña el oligonucleótido específico para ese paciente, que puede ser uno de los *primers* o una sonda.

Esta estrategia permite discriminar una célula tumoral entre 10^5 células normales y aunque sigue siendo un resultado cualitativo, es la base de los diseños cuantitativos^{160,161}.

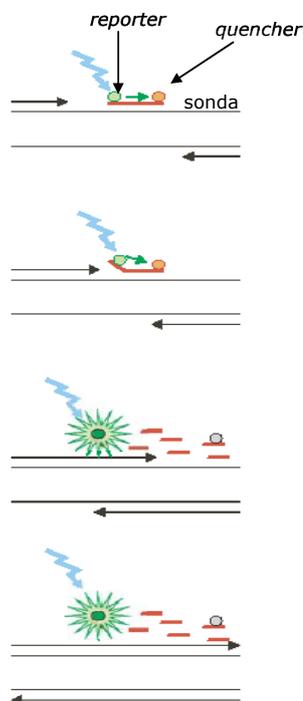
PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Se basa en los mismos principios que la ASO-PCR, es decir, emplea un oligonucleótido específico del reordenamiento del clon tumoral, pero incorpora además una molécula fluorescente que nos permite monitorizar la amplificación del producto de PCR en tiempo real. Para este fin existen diferentes técnicas, como las sondas lineales de hidrólisis (sondas TaqMan), las sondas de hibridación, oligonucleótidos auto-hibridantes (*self-quenched primers*)¹⁶², sondas específicas con estructura de horquilla (*molecular beacons*)¹⁶³, moléculas que se unen de forma inespecífica al ADN (*SYBRGreen*)¹⁶⁴ y otros. El método más difundido es el de las sondas TaqMan. La sonda TaqMan es un oligonucleótido diseñado para hibridar en una parte de la secuencia diana acotada por los *primers*. La sonda lleva unida una molécula fluorescente (*reporter*) en el extremo 5' y una molécula que amortigua la emisión de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'. Cuando la enzima Taq polimerasa empieza a actuar, además de sintetizar el nuevo ADN,

va a ejercer su actividad 5' exonucleasa y, cuando se encuentre con la sonda, va a provocar la hidrólisis de la misma. Cuando la sonda se hidroliza, el fluoróforo se separa del amortiguador y se emite fluorescencia. Esto va a ocurrir en cada ciclo de la PCR y sólo en las sondas que estaban unidas a la secuencia diana, por tanto, la intensidad de la fluorescencia va a incrementarse exponencialmente en cada ciclo y será proporcional a la cantidad de producto acumulado, que a su vez se relaciona con la cantidad de células que tienen la secuencia diana en la muestra de partida. La fluorescencia tiene que alcanzar una intensidad mínima para ser detectada, que suele establecerse en 10 veces la desviación estándar del valor de la señal de fluorescencia basal y es lo que conocemos como ciclo umbral, C_T o *cycle threshold*.

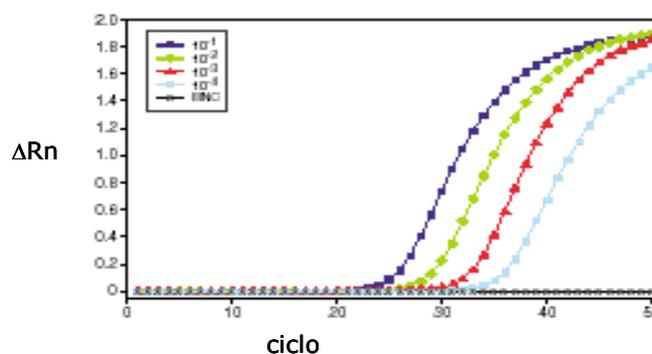
Para el cálculo del número de copias de la muestra problema, trasladamos el C_T obtenido en el experimento a una recta patrón. La recta patrón se calcula a partir de diluciones de una muestra control que contiene el mismo producto de PCR en una cantidad conocida. Al comparar el C_T de la muestra problema con los de la recta patrón, podemos cuantificar el número de copias iniciales (figura 7). Como además hay que tener en cuenta la cantidad y la calidad del ADN analizado, así como las diferencias de la eficiencia de la PCR en cada experimento, se tiene que utilizar un gen control que esté presente en todas las células y que permita compensar estas diferencias.

Figura 7. PCR en tiempo real. Esquemas tomados de van der Velden VH ¹⁶⁵



PCR en tiempo real con sonda de hidrólisis. La sonda de hidrólisis se conjuga con dos fluoróforos: un fluoróforo emisor (*reporter*) y un fluoróforo que absorbe la fluorescencia (*quencher*) mientras la sonda está intacta. Cuando hay amplificación de la secuencia diana, la sonda es desplazada e hidrolizada por la polimerasa; esto provoca que el *reporter* se separe del *quencher* y emita así fluorescencia que puede detectarse en tiempo real. Durante cada ciclo de PCR la fluorescencia va aumentando de forma exponencial por la acumulación progresiva de los fluoróforos.

ΔRn : diferencia en el incremento de fluorescencia



Esta tecnología se ha utilizado extensamente para la detección de la EMR en el caso de reordenamientos clonales de los genes de las Igs, de los receptores de los linfocitos T y de distintas traslocaciones cromosómicas¹⁶⁶⁻¹⁷⁰.

La Enfermedad Residual en el Mieloma Múltiple

Como se mencionó al hablar de los genes de las Igs, la hipermutación del gen *IGH* dificulta las técnicas de PCR al impedir que los *primers* hibriden correctamente; también complica el diseño de una PCR cuantitativa en tiempo real¹⁷¹. En los últimos años, con el estudio exhaustivo de los genes de las Igs, se ha visto que los reordenamientos incompletos DJH presentan un menor número de mutaciones somáticas, lo que incrementa la tasa de detección de clonalidad¹²¹ y los hace adecuados para diseñar la PCR de seguimiento de la EMR¹⁴⁰.

No obstante, puesto que el reordenamiento clonal del gen *IGH* es la mejor marca molecular del mieloma, encontramos numerosos trabajos de PCR en mieloma que se resumen en la tabla 6.

Mientras que para el diagnóstico de clonalidad resulta adecuada la PCR cualitativa, para el seguimiento de la enfermedad se necesitan técnicas cuantitativas. Este enfoque se empieza a utilizar en el mieloma a finales de los 90, principios de los 2000 y es entonces cuando cobra fuerza la hipótesis de que la cinética tumoral así medida es un parámetro que puede predecir la evolución clínica¹⁷². Es más, se encuentra incluso un valor de EMR que alcanza significado pronóstico¹⁷³, que se reproduce en otros trabajos^{140,174}.

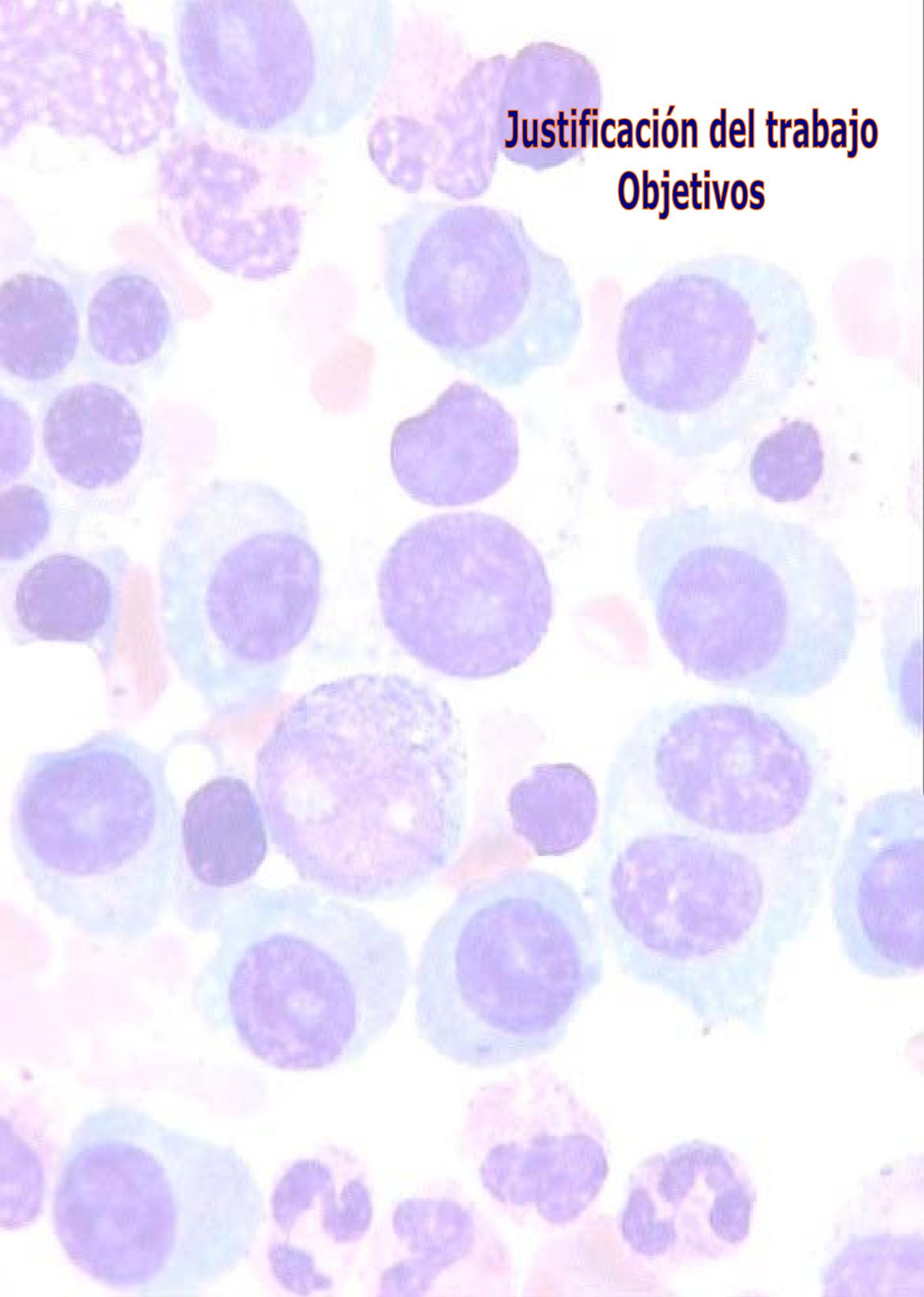
Puesto que la PCR cuantitativa alelo-específica es una técnica laboriosa y complicada, hay trabajos que intentan realizar el seguimiento de la enfermedad con otras técnicas más sencillas, como la PCR fluorescente. Sin embargo, aunque la PCR fluorescente ha aportado ventajas frente a la PCR convencional en cuanto a sensibilidad y especificidad^{158,175-177}, no ha podido, de momento, establecer un valor pronóstico¹⁷⁸.

Por otro lado, aunque la PCR cuantitativa alelo-específica sea en la actualidad una técnica muy sensible y específica para el seguimiento de la EMR en pacientes con mieloma, lo cierto es que teniendo en cuenta la complejidad, la imposibilidad de aplicación en todos los casos y el coste global, no parece razonable instaurarla como prueba rutinaria, ya que para este fin se dispone del inmunofenotipo por citometría de flujo, que es una técnica bien estandarizada, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de la enfermedad y se puede aplicar en más del 90% de los pacientes^{140,179-183}.

Tabla 6. Resumen de los trabajos de PCR y EMR

Autor	Año	Técnica	Nº de casos	Resumen
Billadeau y cols ¹⁶⁰	1992	ASO-PCR del gen <i>IGH</i>	14	Detecta células circulantes en sangre periférica en todos los enfermos
Bird y cols ¹⁸⁴	1993	<i>IGH</i> "Fingerprinting"	5	El trasplante alogénico induce remisiones moleculares
Bjorkstrand y cols ¹⁸⁵	1995	PCR <i>IGH</i> con primers radiomarcados	15	El doble trasplante autólogo induce PCR negativa en 4 de 15 casos
Corradini y cols ¹⁶¹	1995	ASO-PCR del gen <i>IGH</i>	15	PCR positiva tras altas dosis de quimioterapia secuencial en todos los enfermos
Swedin y cols ¹⁸⁶	1998	ASO-PCR del gen <i>IGH</i>	25	No se observa relación entre los resultados de la PCR y la evolución clínica
Gerard y cols ¹⁶⁷	1998	PCR en tiempo real	4	Desarrollo de un método de PCR en tiempo real con sondas "TaqMan"
Corradini y cols ¹⁸⁷	1999	PCR del gen <i>IGH</i>	29 en RC	Los enfermos a los que se les realiza alotrasplante tienen mayor posibilidad de alcanzar remisión molecular
Mitterer y cols ¹⁸⁸	1999	<i>Genescan</i>	39	La presencia de una población clonal en la aféresis se relaciona con una recaída temprana o con una pobre respuesta al trasplante
Martinelli y cols ¹⁸⁹	1999	ASO-PCR	10	La selección positiva de células CD34 para trasplante reduce la contaminación tumoral, pero no la elimina totalmente
Martinelli y cols ¹⁹⁰	2000	ASO-PCR	50 en RC	Los enfermos con PCR negativa tras trasplante tienen mayor supervivencia
Ladetto y cols ¹⁷¹	2000	PCR en tiempo real	29	Valida los estudios de PCR en tiempo real en enfermos con mieloma múltiple
Cremer y cols ¹⁷²	2000	ASO-PCR	20	Estudia la disminución de la masa tumoral tras el empleo de altas dosis de quimioterapia secuencial
Willems y cols ¹⁹¹	2000	PCR en tiempo real		Comparación de varios métodos de cuantificación entre diferentes laboratorios
Lopez-Perez y cols ¹⁹²	2000	PCR heteroduplex	31	Viven más aquellos pacientes sometidos a TAPH, con aféresis no clonales
Gleissner y cols ¹⁷⁶	2001	PCR- <i>IGH</i> en gel vs <i>genescan</i>	135	El <i>genescan</i> mejora la detección de clonalidad
Davies y cols ¹⁷⁸	2001	<i>Genescan</i> del gen <i>IGH</i>	68	La PCR no tiene valor pronóstico
Novella y cols ¹⁷⁷	2002	PCR fluorescente + ASO-PCR	36	La PCR fluorescente mejora en 1log la detección de EMR frente a la <i>nested-PCR</i>
Fenk y cols ¹⁷⁴	2004	ASO-PCR	11	Los niveles de EMR antes del trasplante y la monitorización secuencial posterior, pueden predecir la recaída
Bakkus y cols ¹⁷³	2004	ASO-RQ-PCR	67	La PCR fue un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de progresión post-trasplante (nivel que definió pronóstico: 0.015%)
Galimberti y cols ¹⁹³	2005	PCR fluorescente	20	La erradicación de la EMR tuvo un impacto favorable en la supervivencia global de 2 años
Sarasquete y cols ¹⁴⁰	2005	ASO-RQ-PCR vs CMF	24	La ASO-RQ-PCR y la CMF tienen el mismo valor pronóstico, pero la CMF es más fácil de aplicar de rutina

RC: remisión completa

The background of the slide is a microscopic image of various cells. There are numerous large, round cells with prominent, dark purple nuclei and light blue cytoplasm, characteristic of lymphocytes. Interspersed among these are smaller, pinkish-red cells, likely erythrocytes. The overall appearance is that of a stained blood smear or a similar biological specimen.

Justificación del trabajo

Objetivos

Justificación para la elección del tema

Aunque el Mieloma Múltiple sigue siendo una enfermedad incurable en nuestros días, el panorama sin duda está cambiando. La identificación de mecanismos patogénicos y de nuevas dianas terapéuticas permite el diseño de nuevos fármacos que han de ser evaluados dentro de ensayos clínicos.

El criterio empleado actualmente para definir la respuesta al tratamiento es la inmunofijación (IF) de proteínas. Sin embargo esta técnica no logra en muchos casos predecir adecuadamente la evolución de los pacientes. Si como parece lógico, la curación de la enfermedad pasa primero por la obtención de una respuesta por debajo del dintel de enfermedad detectado por la IF, se impone la necesidad de métodos de seguimiento más sensibles, que sean a la vez lo suficientemente sencillos para poder aplicarlos de forma rutinaria y que tengan además importancia pronóstica. Es necesario por tanto definir mejor la calidad de la respuesta, seguir la cinética tumoral y poder detectar precozmente las recidivas; en definitiva, encontrar parámetros que nos ayuden a establecer una terapia dirigida.

En el momento actual, los dos métodos que pueden cubrir esta necesidad son la cuantificación de las células tumorales por su inmunofenotipo mediante citometría de flujo y la PCR alelo-específica del reordenamiento del gen *IGH*. Esta última es una técnica que ha demostrado una gran sensibilidad, pero que es muy laboriosa y complicada en muchos casos. Este hecho ocurre especialmente en el Mieloma Múltiple, donde existen un número elevado de mutaciones somáticas en las secuencias de los genes de las inmunoglobulinas, que dificultan la aplicación de la técnica de forma rutinaria.

En un reciente trabajo sobre la aplicación de la PCR cuantitativa alelo-específica en el estudio del Mieloma, y su comparación con la citometría de flujo¹⁴⁰, se demuestra que si bien ambas técnicas son semejantes en cuanto a sensibilidad y valor pronóstico, la citometría de flujo es un método mucho más sencillo para la aplicación clínica rutinaria. A la vista de estos resultados decidimos trabajar con la intención de simplificar las técnicas moleculares empleadas con este fin.

Por tanto, pretendemos establecer un método molecular para el estudio de la EMR en el MM que sea sensible, específico y a la vez sencillo, para poder emplearlo en la práctica clínica diaria.

Objetivos

Objetivo general

Establecer el valor pronóstico de la enfermedad mínima residual por métodos moleculares en el Mieloma Múltiple

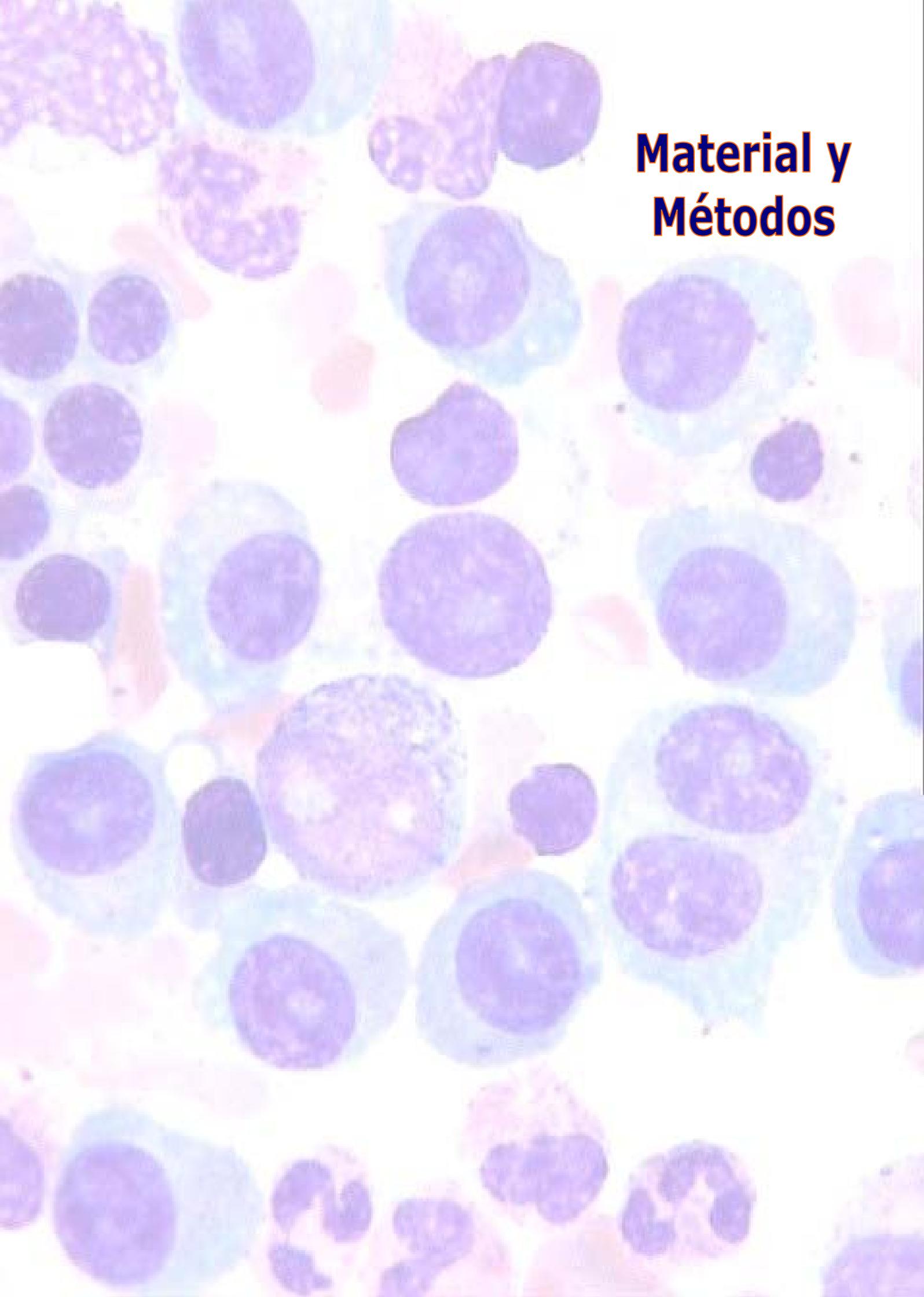
Objetivos específicos

1.- Detectar la población tumoral clonal en la mayoría de los enfermos con mieloma mediante el estudio de los genes de las inmunoglobulinas.

2.- Estudiar el inmunogenotipo de las cadenas ligeras de las Igs en pacientes con MM y establecer su aportación al diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

3.- Desarrollar y optimizar métodos más sencillos de PCR cuantitativa en tiempo real para el estudio del gen *IGH*.

4.- Establecer un método molecular de seguimiento de enfermedad residual que sea aplicable de forma rutinaria en clínica y que tenga valor pronóstico.

A microscopic image showing a field of cells. The cells have large, dark purple nuclei and a lighter purple or pinkish cytoplasm. Some cells are larger and more rounded, while others are smaller and more irregular. The background is a light, pale pink color, suggesting an extracellular matrix or a specific staining technique. The overall appearance is that of a tissue section or a cell culture preparation.

Material y Métodos

1. Pacientes y muestras

Se han estudiado 88 pacientes diagnosticados de MM entre 1999 y 2004. 82 de estos pacientes estaban incluidos en el protocolo de tratamiento asistencial **Mieloma 2000**. Los datos clínicos y analíticos de los pacientes se han consultado en la base de datos del GEM. Todos los enfermos fueron diagnosticados empleando los criterios de *SWOG*¹⁹⁴.

El **protocolo Mieloma 2000** consistió en un tratamiento de QT intensiva con seis ciclos alternantes (VBMCP/VBAD), con un intervalo entre los ciclos de cinco semanas. Entre el 4º y 5º ciclo se realizó movilización de progenitores hematopoyéticos para posterior TAPH y tras completar dos ciclos más de QT, se realizó el trasplante acondicionado con Melfalán a dosis de 200mg/m². Finalmente, los pacientes que alcanzaron remisión completa con electroforesis negativa pasaron a tratamiento de mantenimiento con Interferón 3MU tres días por semana hasta la recaída y Prednisona 50mg a días alternos durante dos años.

VBMCP

- Vincristina 0,03 mg/kg (máximo 2 mg) i.v. día 1.
- BCNU 0,5 mg /kg i.v. día 1.
- Ciclofosfamida 10 mg/kg i.v. día 1
- Melfalán 0,25 mg/kg v.o. días 1-4
- Prednisona 1 mg/kg v.o. días 1-4, 0,5 mg/kg días 5-8, y 0,25 mg/kg días 9-12.

VBAD

- Vincristina 1 mg i.v. día 1
- BCNU 30 mg/m² i.v. día 1
- Adriamicina 40 mg/m² i.v. día 1
- Dexametasona 40 mg v.o. días 1-4, 9-12 y 17-20.

La movilización de CPSP se efectúa con dosis elevadas de G-CSF o alternativamente con ciclofosfamida (1,5 g/m²) más G-CSF (10 µg/kg/día).

Las muestras estudiadas procedían de aspirado de MO que se obtuvo en todos los casos al diagnóstico y, en algunos de ellos, en el momento en que alcanzaron la mejor respuesta al tratamiento. En el estudio de EMR sólo se pudieron incluir aquellos pacientes de los cuáles se disponía de muestra de seguimiento.

Los hospitales que enviaron muestras se recogen en la tabla 7.

Tabla 7. Hospitales de procedencia de las muestras

12 de Octubre (Madrid)	Hospital Gral de Alicante
Severo Ochoa (Leganés, Madrid)	H. Universitario de Canarias
Getafe (Madrid)	Verge del Toro (Menorca)
La Princesa (Madrid)	H. de Cruces (Bilbao)
Ramón y Cajal (Madrid)	Virgen de la Victoria (Málaga)
H. Clínico de San Carlos (Madrid)	Son Dureta (Palma de Mallorca)
Complejo Hospitalario de C.Real	Nª Sª del Rosell (Cartagena)
H. Clínico de Valencia	Juan XXIII (Tarragona)
H. Gral de Elda	Dr. Negrín (Gran Canaria)
H. Gral de Guadalajara	H. de Hellín
Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares)	H. Gral de Requena
Nª Sª del Prado (Talavera de la Reina)	Vall D´Hebron (Barcelona)

CRITERIOS DE RESPUESTA¹⁹⁵

Remisión Completa (RC)

- Desaparición del componente M sérico y urinario por electroforesis (RC/EEF o RC2) o por inmunofijación (RC/Ix o RC1) demostrado en dos determinaciones, separadas por un mínimo de 6 semanas.
- Presencia de menos de un 5% de células plasmáticas en médula ósea.
- Ausencia de nuevas lesiones osteolíticas o no incremento de las ya existentes.
- Ausencia de plasmocitomas extramedulares.

Respuesta Parcial (RP) (todos los criterios siguientes)

- Disminución del componente M sérico > 50% (en dos determinaciones, separadas al menos 6 semanas).
- Disminución de la proteinuria de cadenas ligeras > 90% o a menos de 200 mg/24 horas (en dos determinaciones, separadas al menos 4 semanas).
- Disminución > 50% en el tamaño de los plasmocitomas extramedulares (radiología o exploración física).
- Ausencia de nuevas lesiones líticas o no aumento de las ya existentes.
- En los pacientes con mieloma no secretor se requerirá la disminución de la proporción de las células plasmáticas en más del 50%.

Respuesta Mínima (RM) (todos los criterios siguientes)

- Disminución del componente M sérico entre un 25% y un 49%.
- Disminución de la proteinuria de cadenas ligeras entre un 50 y un 89%, pero aún superior a 200 mg/24 horas.
- No aumento en el número o tamaño de las lesiones osteolíticas y disminución de los plasmocitomas entre el 25 y el 49%.
- En los pacientes con mieloma no secretor se requerirá una disminución de la infiltración medular entre el 25 y el 49% respecto al valor inicial.

Enfermedad Estable o "No Cambio" (EE)

- No se cumplen los criterios de respuesta mínima, pero tampoco los de progresión.

Progresión (al menos uno de los criterios siguientes)

- Aumento superior al 25% del componente M comprobado en dos determinaciones (se requerirá un incremento mínimo de 5 g/L).
- Aumento superior al 25% en la eliminación de cadenas ligeras comprobada en dos determinaciones (se requerirá un incremento mínimo de 200 mg).

- Aumento en el número o tamaño de las lesiones osteolíticas o aumento en el tamaño de los plasmocitomas.
- Aumento superior al 25% en la proporción de células plasmáticas en médula ósea (se requerirá un aumento absoluto de al menos un 10%).
- Aparición de hipercalcemia, anemia o insuficiencia renal atribuida al MM.
- Aparición o aumento de sintomatología atribuible al mieloma.

Recaída (aplicable a pacientes en RC) (al menos uno de los criterios siguientes)

- Reparación del componente M sérico y/o urinario por electroforesis o por inmunofijación, comprobado en dos determinaciones.
- Presencia de más de un 5% de células plasmáticas en médula ósea.
- Aparición de nuevas lesiones osteolíticas, plasmocitomas extramedulares, hipercalcemia, anemia o insuficiencia renal atribuible a MM.

CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE

De los 88 casos estudiados por PCR, 82 estaban registrados en la base de datos del GEM. Puesto que se intentaba determinar el valor de la enfermedad residual, la serie representada aquí es una serie seleccionada, donde la mayoría de los pacientes incluidos en el estudio se eligieron por haber obtenido buena respuesta al tratamiento. Las principales características y parámetros analíticos se resumen en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Parámetros analíticos

Parámetros	Media	Mediana	Rango
Hb	10.7g/dl	11	6-15
Leucocitos	6200/ μ l	5700	2400-13500
Plaquetas	218000/ μ l	215000	40000-475000
Creatinina	1.6mg/dl	1.1	0.4-7.4
Calcio	10.1mg/dl	9.6	8.3-18
Albúmina	3.6g/l	3.7	1.6-5.97
Infiltración MO (citología)	48%	44%	4-100%
Infiltración MO (CMF)	18.3%	13.8%	0-64%

Tabla 9. Tablas de características de la serie

Edad media:58.6 mediana: 60.6 rango: 33-71	Nº de casos	%
<65 años	64	78
>65 años	18	22

ECOG	Nº de casos	%
0	14	17.3
1	36	44.4
2	24	29.6
3	6	7.4
4	1	1.2

LDH	Nº de casos	%
Normal	73	89
Elevada	9	11

Durie-Salmon	Nº de casos	%
I	10	12.2
II	24	29.3
III	48	58.5

Tipo de Ig	Nº de casos	%
IgG	44	53.7
IgA	20	24.4
Bence-Jones	16	19.5
No secretor	2	2.4

Lesiones óseas	Nº de casos	%
Normal	12	14.6
Osteoporosis	6	7.3
Líticas menores	24	29.3
Líticas mayores	40	48.8

Genética	Nº de casos	%
Normal	24	52.2
Del 13 / -13	5	10.9
Alt. Cromos 11	2	4.3
Otras	13	28.3
No se obtienen metafases	2	4.3

Sexo	Nº de casos	%
varón	43	52.4
mujer	39	47.6

IPI	Nº de casos	%
1	46	56.8
2	34	42
3	1	1.2

1: $\beta 2M < 3.5 \text{mg/L}$ y Albúmina $> 3.5 \text{g/dl}$
 2: no criterios de estadio 1 ó 3
 3: $\beta 2M > 5.5 \text{mg/L}$

$\beta 2M$	Nº de casos	%
$< 3.5 \text{mg/L}$	48	62.3
$\geq 3.5 \text{mg/L}$	29	37.7

Estadio	Nº de casos	%
A (creat $< 2 \text{mg/dl}$)	63	76.8
B (creat $\geq 2 \text{mg/dl}$)	19	23.2

Cadena ligera	Nº de casos	%
Kappa	42	51.2
Lambda	38	46.3
No secretor	1	1.2
No conocido	1	1.2

Respuesta al TAPH	Nº de casos	%
RC por inmunofijación	44	53.7
RC por EEF	22	26.8
RC histórica	2	2.4
Respuesta Parcial	10	12.2
Enfermedad estable	2	2.4
No evaluado	2	2.4

2. Métodos

2.1. Extracción de ADN

A partir de aproximadamente 2ml de aspirado de MO, se extrajo ADN genómico mediante extracción automática basada en tecnología de bolas magnéticas (Magpure, de Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

2.2. PCR cualitativa

En este trabajo, el protocolo de PCR empleado fue el optimizado durante la Acción Concertada del grupo europeo BIOMED-2¹⁵⁷. Los cebadores o *primers* propuestos en este estudio se aplicaron tanto para estudiar el gen de la cadena pesada de las Igs (*IGH*), como para estudiar los genes de las cadenas ligeras (*IGK* e *IGL*). Las condiciones de PCR fueron algo diferentes, adaptadas en nuestro laboratorio.

Condiciones de las reacciones:

15µl de volumen final con 10µl de agua
1µl de ADN (≈ 100ng)
10pmol de cada *primer*
MgCl₂ a una concentración final de 0.8mM
1.5 µl de Polimerasa que incluye el buffer y los dNTPs: Fast Start Light Cycler TM DNA Master. (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

Programa:

Desnaturalización inicial: 95°C, 10min
Hibridación o *annealing*: 60°C, 30seg
Extensión: 72°C, 30seg
Nº de ciclos: 35

Para el gen *IGH* se estudiaron las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3. En esta última se localiza la unión VDJH o DJH, según se trate de reordenamiento completo o incompleto. Este estudio incluye cuatro PCRs diferentes: FR1, FR2, FR3 y DH (figura 8). Puesto que ya se sabía que la mayor tasa de positivos era esperable en la región CDR1, las PCRs para FR1 Y DH se realizaron en todos los pacientes. La PCR para FR2 se realizó en 66 casos y para FR3 en 39 casos.

Para el estudio de las cadenas ligeras se realizaron tres PCRs por cada muestra: lambda, kappaVJ (KVJ) y kappa *deleting element* (Kde). Los esquemas y *primers* se muestran en la figura 9.

Figura 8. PCRs para el estudio del gen de la cadena pesada de la Ig

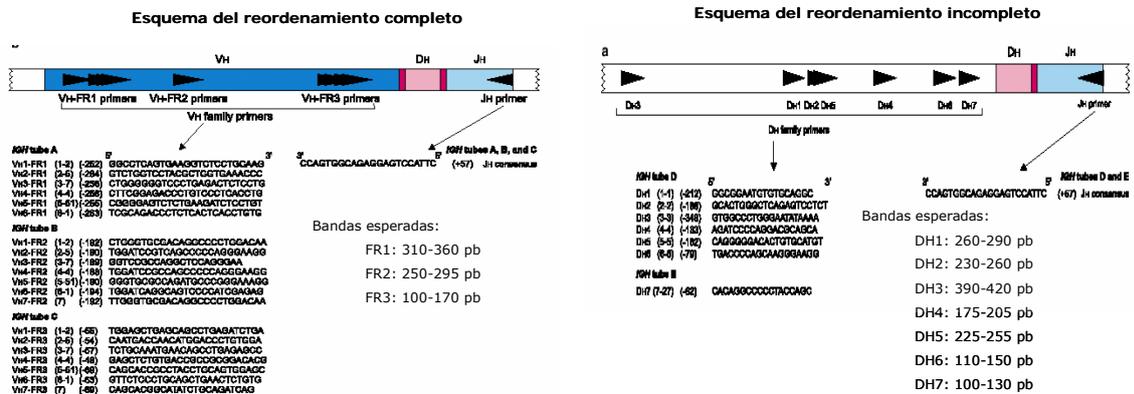


Figura 9. PCRs para los genes de las cadenas ligeras de la Ig

Bandas esperadas:

REORDENAMIENTOS DEL GEN LAMBDA

Ig Lambda: 140-165 pb

REORDENAMIENTOS DEL GEN KAPPA

Ig KVJ:

V1, V6, V7: 120-160 pb

V3: 190-200 pb

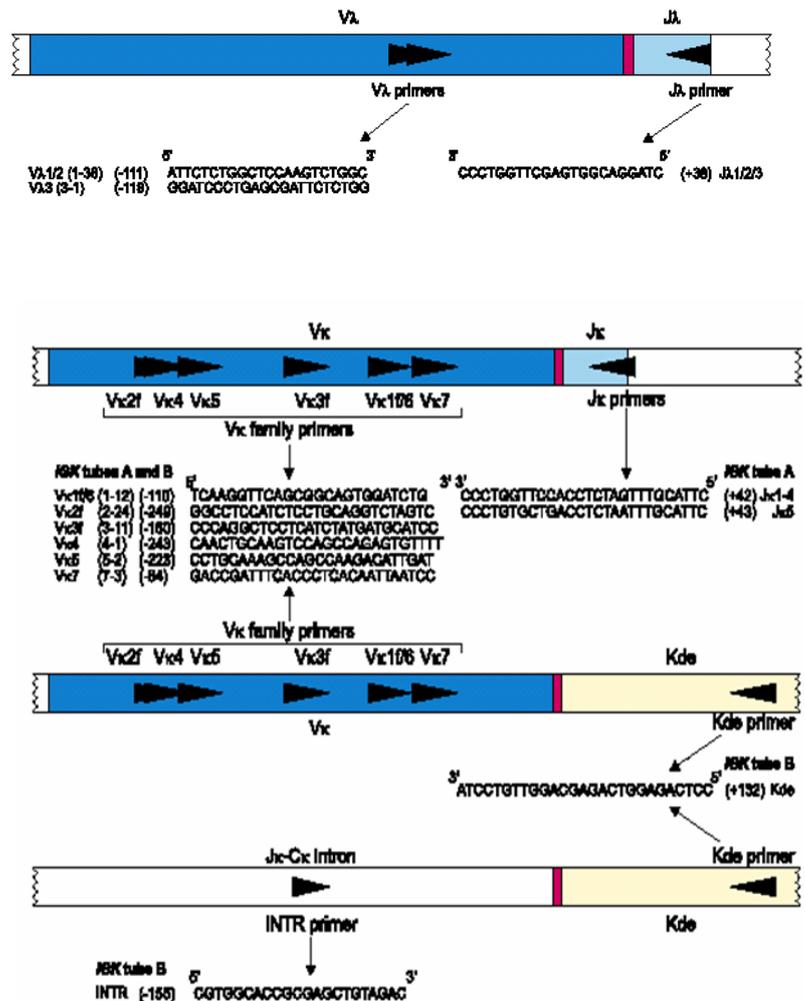
V2, V4, V5: 260-300 pb

Ig Kde:

V1, V6, V7/Kde: 210-250 pb

V3/Kde, INT/Kde: 270-300 pb

V2, V4, V5/Kde: 350-390 pb

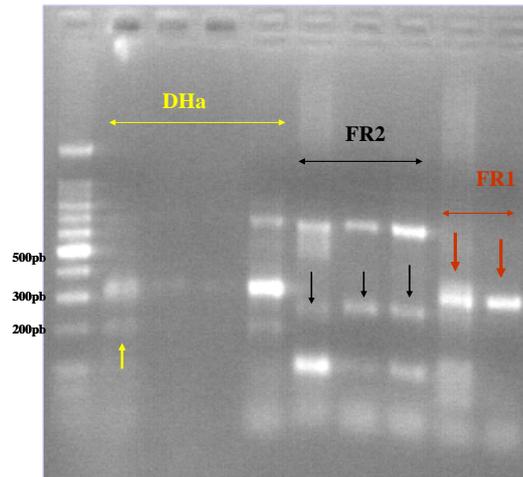


esquemas tomados de van Dongen y cols ¹⁵⁷

En los primeros 53 pacientes los resultados de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Con este método se pueden visualizar varias bandas, sobre todo en el caso de reordenamientos incompletos DHJ, que pueden corresponder a amplificaciones inespecíficas (figura 10).

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa

Las bandas específicas están señaladas con una flecha. Se puede observar que en ocasiones las bandas más intensas no son las bandas esperadas, sino que son fragmentos inespecíficos



Por tanto, cuando se dispuso en el laboratorio del secuenciador de ácidos nucleicos, se decidió continuar el estudio con PCR fluorescente y análisis de fragmentos por *genescan*. Los 53 casos previamente estudiados en gel de agarosa se repitieron mediante PCR fluorescente.

2.3. PCR cualitativa fluorescente

El primer paso de amplificación del ADN es igual que la PCR cualitativa convencional, salvo en que el *primer* consenso utilizado en la región 3' de la secuencia a amplificar (*primer* reverso), lleva un marcador fluorescente en su extremo 5', que es 6-FAM.

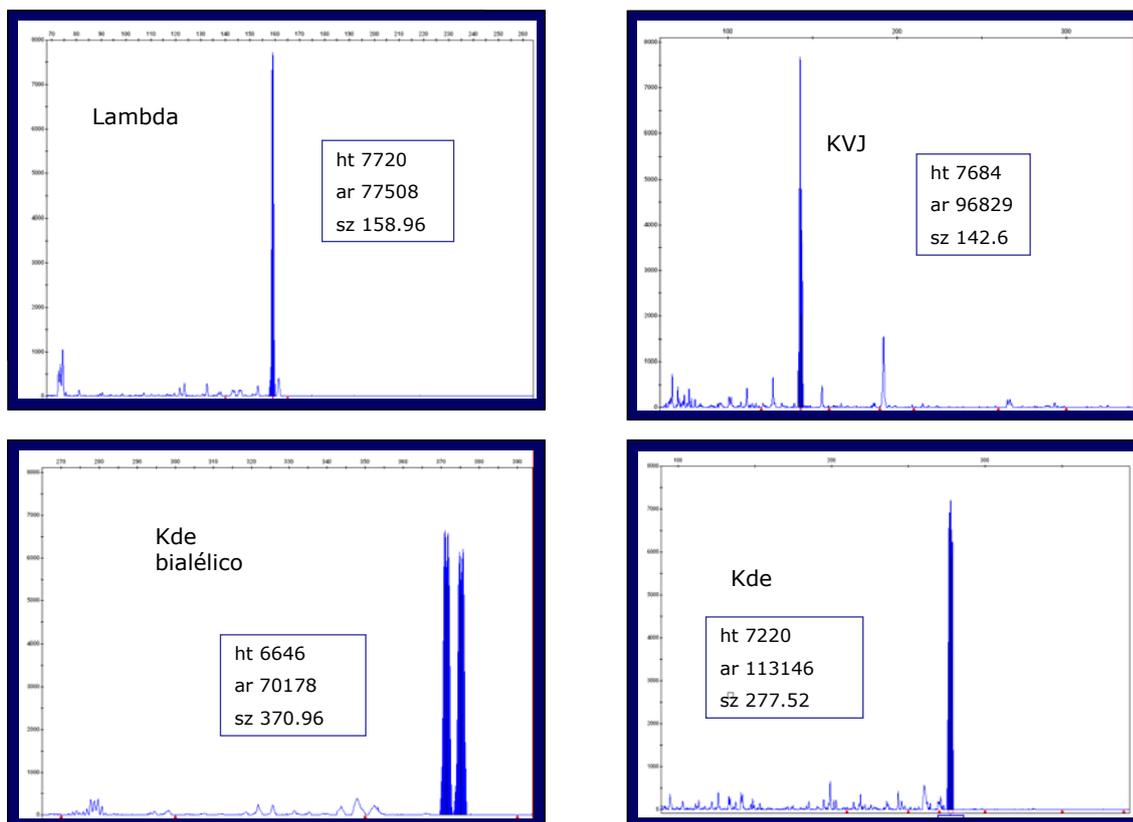
El segundo paso de visualización varía respecto a la PCR convencional. Los productos amplificados por PCR son sometidos a una electroforesis capilar en un secuenciador automático de ácidos nucleicos (ABI PRISM 3.100-Avant), aplicando el software de análisis de fragmentos *Genemapper* versión 3.5. El resultado es una gráfica en la que vemos una distribución gaussiana de múltiples picos en caso de policlonalidad, o un único pico, o un pico claramente predominante, en el caso de existir una población monoclonal (figura 11). Los criterios que se aplicaron para dar un resultado como positivo fueron los descritos previamente por Novella y cols¹⁷⁷: presencia de un único pico con fluorescencia de al menos 250 unidades de absorbancia o presencia de un pico predominante al menos

2.5 veces más alto que el fondo policlonal. El tamaño del fragmento se interpretó según los protocolos de BIOMED-2¹⁵⁷.

PROTOCOLO:

- 1.- El producto de PCR se diluyó 10 veces en agua.
- 2.- Mezcla: 1 μ l del producto de PCR diluido + 9.5 μ l de formamida (Hi-Di) + 0.5 μ l de estándar interno o peso molecular ROX-400.
- 3.- Desnaturalización a 95°C durante 5 minutos y enfriamiento posterior en hielo durante 10 a 15 minutos.
- 4.- El sistema se rellenó de polímero POP4 y de Buffer con EDTA.
- 5.- Se programó la electroforesis, que en el caso de capilares de 36cm, se realizó en 45min.

Figura 11. Ejemplos de reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras, analizados por *genescan*



PCR cualitativa fluorescente para el estudio de EMR

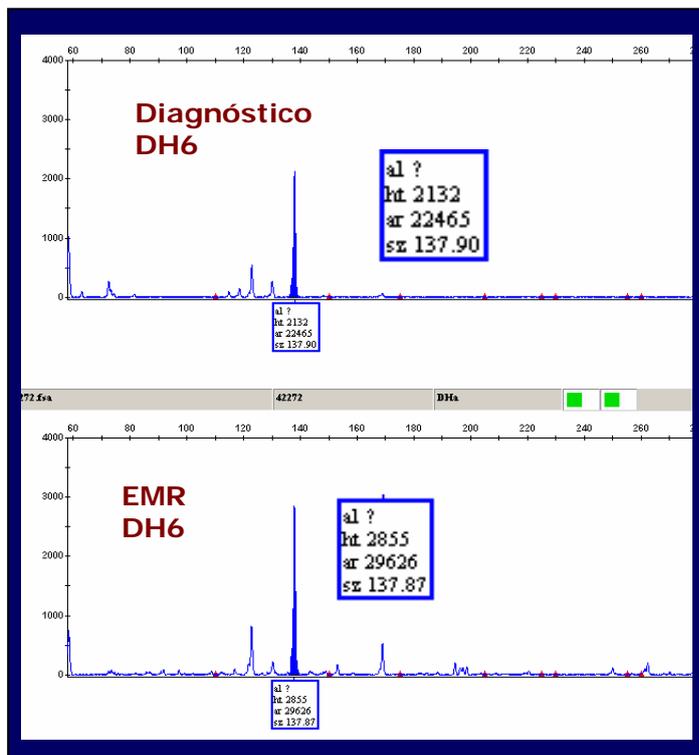
Para estudiar las muestras de seguimiento se establecieron algunas modificaciones respecto al *screening* realizado al diagnóstico, con el objetivo de aumentar la sensibilidad.

Se estudiaron 51 pacientes que presentaban un reordenamiento incompleto DHJ o algún reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras.

En el caso de reordenamientos DHJ, se definió la familia DH atendiendo al tamaño del fragmento amplificado al diagnóstico. Para estudiar las muestras de EMR se utilizó el primer específico de la familia DH reordenada. En los reordenamientos de las cadenas ligeras, las muestras de seguimiento se estudiaron con los mismos *primers* que al diagnóstico. La sensibilidad de ambas PCRs se había establecido por estudios previos en el laboratorio en el rango de 10^{-3} .

Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta lo siguiente: en los reordenamientos DHJ, que por lo general presentaron un único pico fácilmente reconocible, la detección de un pico en la muestra de EMR de igual tamaño que en la muestra del diagnóstico, se consideró como signo de persistencia del clon patológico (figura 12); sin embargo, los reordenamientos de las cadenas ligeras son menos variables y lo habitual es encontrar un fondo policlonal mucho más difícil de interpretar, ya que el tamaño del fragmento clonal está siempre dentro de la curva gaussiana de distribución de los distintos reordenamientos amplificados de los linfocitos policlonales. En estos casos sólo se consideró positivo cuando el tamaño del pico del clon patológico esperado era al menos dos veces y medio el de cualquier otro pico detectado.

Figura 12. EMR detectada por PCR fluorescente del reordenamiento DHJ



2.4. Secuenciación y análisis de secuencias

Los reordenamientos en los que se realizó la secuenciación se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida. El producto de partida para la secuenciación fue la banda separada y visualizada en poliacrilamida. Tras cortar la banda del gel se centrifugó en columna (Montage, DNA Gel Extraction Kit, Millipore) y con el ADN eluido se realizó la PCR de secuenciación empleando el método de los dideoxinucleótidos terminadores Big-Dye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Tras la PCR de secuenciación, se purificó el producto por centrifugación en otras columnas (AutoSeq™ G-50, Amersham Biosciences) para retirar los restos de terminadores. Los productos obtenidos se analizaron en el secuenciador automático ABI 3100 Avant. Para cada muestra se realizaron dos PCRs de secuenciación, una en cada dirección de la cadena. Para la primera se utilizó el *primer* consenso de la región JH y posteriormente, una vez identificado el extremo VH/DH de la secuencia, se secuenció empleando el *primer* de la región 5'. Ambas secuencias se compararon y fusionaron para evitar la pérdida de algún nucleótido debida a errores en la Taq polimerasa.

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias germinales de los segmentos VH, DH y JH para establecer la homología existente. Los reordenamientos completos VDJH se identificaron comparando con las bases de datos V Base23 (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT) y con IGMT (International ImMunoGeneTics Information System <http://imgt.cines.fr>) utilizando el software DNAPLOT on-line (MRC Center for Protein Engineering). Los reordenamientos incompletos DJH se identificaron mediante búsqueda en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en el locus de la secuencia germinal con nº de acceso EMB/X97051 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

2.5. PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica con sondas TaqMan

A. PCR en tiempo real

El primer paso fue diseñar un *primer* alelo-específico del clon tumoral (ASO *primer*), complementario a la región CDR y en el sentido 5' de la secuencia (*sense*), coincidiendo con el lugar de unión VDJH o DJH. Se aplicó el programa de diseño de *primers* Oligo 6 (W. Rychlik, Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA <http://www.oligo.net>). Los criterios de selección fueron los siguientes: que la temperatura de unión fuera similar (menos de 2°C de diferencia) a la del *primer* del otro lado, previamente definida; que no se favoreciera ni la formación de dímeros con el otro *primer* ni la autohibridación y que se respetara el perfil de estabilidad termodinámica adecuado según el programa.

Los *primers* para la región 3' y las sondas TaqMan empleados fueron los diseñados previamente por Verhagen¹⁹⁶. Las secuencias de dichos oligonucleótidos se muestran en la tabla 10. Son oligonucleótidos consenso, diseñados en regiones germinales altamente

conservadas o en las regiones intrónicas, como en el caso de los *primers* reversos. Las sondas TaqMan estaban marcadas con 6-FAM como *reporter* y con TAMRA como *quencher*. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μ l, con 500ng de ADN genómico, 300nM de cada *primer*, 200nM de la sonda y 4mM de ClMg₂.

Condiciones de PCR: las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Light Cycler (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) usando como polimerasa *Fast Start Light Cycler TM DNAMaster*. Programa: 1) desnaturalización 10' a 95°C; 2) amplificación en 45 ciclos de 0" a 95°C y 30" a 60°C.

Tabla 10. Oligonucleótidos consenso para la PCR en tiempo real con sondas TaqMan

Sondas consenso	Posición 5'	Secuencia 5-3'
JH 1,2,4,5,	+31/32/27/30	CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG
JH3	+20	CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
JH6	+43	CACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA
<i>Primers intrónicos</i>		
JH1 intrónico	+25	CGCTATCCCCAGACAGCAGA
JH2 intrónico	+47	GGTGCCTGGACAGAGAAGACT
JH3 intrónico	+23	AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC
JH4 intrónico	+36	CAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGT
JH5 intrónico	+24	AGAGAGGGGGTGGTGAGGACT
JH6 intrónico	+35	GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT

B. Cuantificación

Para determinar la sensibilidad y la eficiencia de la PCR, se construyó una curva estándar en cada paciente, a partir de diluciones del ADN del diagnóstico en ADN policlonal (disminuciones de 1 logaritmo hasta 10⁻⁵). El ADN policlonal se obtuvo de un *pool* de ADN de sangre periférica de individuos sanos. Se analizaron las muestras y las diluciones siempre por duplicado. La sensibilidad la definió la última dilución en la cuál al menos uno de los duplicados emitió señal positiva de amplificación, con un valor máximo de C_T de 40 ciclos. Este C_T tuvo que ser al menos 3 ciclos por debajo del C_T encontrado en caso de amplificaciones inespecíficas del ADN policlonal. Como controles negativos se utilizó agua y ADN policlonal. Se consideraron válidas aquellas curvas cuyo Coeficiente de Correlación (R) fue al menos de 0.98 y en las que se alcanzó una sensibilidad mayor de 10⁻³.

El cálculo del número de copias equivalente a un nivel de sensibilidad dado, se basó en la presunción de que una célula tiene 6.25pg de ADN y se utilizaron 0.5 μ g de ADN en cada prueba.

La reproducibilidad intra e inter-ensayo se calculó tras repetir cinco veces el experimento con una misma muestra.

La cuantificación de la enfermedad residual se calculó en relación al diagnóstico y se empleó la siguiente fórmula, en la que también se incluye el resultado de la amplificación del gen control para normalizar los resultados ¹⁹⁷.

$$\text{IgH}_{\text{EMR}} = (E_{\text{IgH}})^{\Delta\text{CT}_{\text{IgH}}(\text{Diag-EMR})} / (E_{\text{control}})^{\Delta\text{CT}_{\text{control}}(\text{Diagn-EMR})}$$

C. Normalización de resultados

Para evitar influencias en el resultado debidas a la calidad de las muestras, se amplificó un gen control que expresan todas las células. Como gen control se utilizó β -actina.

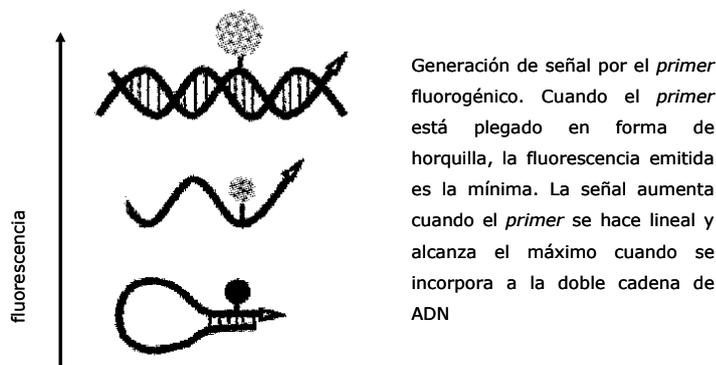
2.6. PCR cuantitativa en tiempo real alelo-específica con *primer* JH consenso autohibridante (*Self-quenched primer*)

En este caso, se utilizó el mismo ASO *primer* diseñado en la región CDR3, pero las sondas TaqMan y los *primers* intrónicos para la región JH fueron sustituidos por un único oligonucleótido fluorescente.

A. Diseño del *primer* autohibridante

Partiendo de la secuencia del *primer* consenso de la región JH que se había utilizado para la PCR cualitativa (JH57), se diseñó un *primer self-quenched* siguiendo las instrucciones descritas por Nazarenko¹⁶². Brevemente, las condiciones fueron las siguientes: presencia de guanina (G) o citosina (C) como nucleótido 3' terminal; adición de un fluoróforo en la última timina (T) del extremo 3' (en nuestro caso 6-FAM); adición de una pequeña secuencia en el extremo 5', complementaria al extremo 3' para que se forme una horquilla. Los valores de ΔG (incremento de energía libre) en el tallo de la horquilla han de oscilar entre -1.6 y -5.8 Kcal/mol (figura 13). La secuencia final del *primer* fue GGTCACTTACCTGAGGAGACGGTGACC (la secuencia primitiva del JH57 está subrayada, el extremo añadido en la posición 5' está en letra cursiva y la timina donde se unió el fluoróforo se señala en negrita). La ΔG en el tallo de la horquilla fue de - 3.4 Kcal/mol.

Figura 13. *Primer* auto-hibridante



Como gen control de estas PCRs se eligió el gen del tromboxano A (TXA). El motivo por el que se seleccionó TXA fue porque uno de los *primers* diseñados previamente para esta PCR, se adaptaba bien a las condiciones necesarias para el diseño de un *primer self-quenched*. Por tanto, este *primer* fue modificado de acuerdo con las reglas anteriormente descritas para convertirlo en auto-hibridante. La ΔG en el tallo de la horquilla fue de -1.9 Kcal/mol. Las secuencias finales de los *primers* del TXA fueron:

TXA *sense*: 5´-GGACTGCCCGACATTCTGCAAGTCC-3´

TXA *antisense*: 5´-GGTGTGCGCGGAAGGGT-3´.

B. PCR en tiempo real

Para optimizar la PCR fue necesario variar las concentraciones de los *primers* en cada caso, entre 200nM y 1000nM. La concentración óptima fue 300nM en siete casos, 500nM en dos casos y 250nM en un caso. Para la PCR del gen control, la concentración óptima de los *primers* fue de 500nM.

Programa de PCR: 1) desnaturalización 10´ a 95°C; 2) amplificación en 45 ciclos de 0" a 95°C y 30" a 60°C -en dos casos de muestras de pacientes y en el caso del TXA, la temperatura de hibridación que mejor funcionó fue la de 65°C-; 3) un ciclo final o curva de disociación o *melting* pasando de 95°C a 70°C con una rampa de 0.2°C/segundo, con monitorización continua de la fluorescencia con el fin de establecer la temperatura de disociación del fragmento amplificado (T_m).

La sensibilidad, reproducibilidad y cuantificación de la enfermedad residual se calcularon igual que con la metodología TaqMan.

Cuando la sensibilidad de un ensayo fue inferior a 5×10^{-4} o la pendiente de la curva estándar fue ≥ 4 , se consideró que ese ensayo no había funcionado. En estos casos se amplificó y secuenció un fragmento mayor al original, utilizando el *primer* JH intrónico de la región JH inmediatamente posterior, con el fin de identificar el nº de mutaciones somáticas presentes en las zonas de hibridación de los oligonucleótidos empleados, los cambios en la ΔT_m producidos por dichas mutaciones y su influencia en la eficiencia de la PCR según el programa MeltCalt¹⁹⁸.

El resumen de todas las técnicas moleculares se muestra en la figura 14.

2.7. Estudio del inmunofenotipo por CMF

La CMF se realizó al diagnóstico en todos los casos y cuando se obtuvo la mejor respuesta al tratamiento, siempre que el paciente presentara un inmunofenotipo aberrante al diagnóstico. Este estudio se realizó en las mismas muestras que los estudios moleculares.

PROTOCOLO:

Se tiñeron un total de 2×10^6 células del aspirado de MO. Se lisaron los hematíes y se incubaron durante 15 minutos con 10 μ L de cada Ac a temperatura ambiente; posteriormente se realizaron dos lavados para eliminar el exceso de Ac. Se emplearon cuatro combinaciones diferentes de anticuerpos:

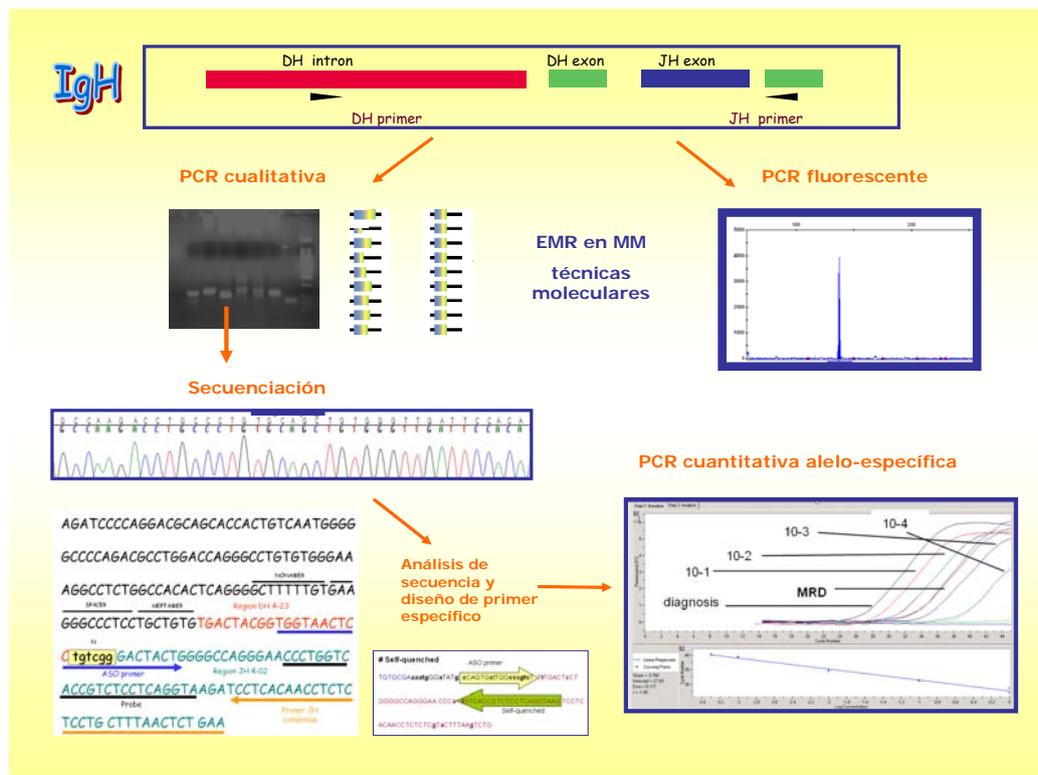
- CD38, CD138 y CD20 en Isocianato de fluoresceína (FITC)
- CD56, CD28 y CD117 en Ficoeritrina (PE)
- CD19, CD33 y CD138 en Pteridin chlorophyll protein-cyanin-5 (PE/Cy5)
- CD45, CD38 en Allophycocyanin (APC)

Para definir el dintel de positividad se incluyó en cada ensayo un control negativo que llevaba sólo CD38 en APC, que marcaba el nivel natural de autofluorescencia de las células plasmáticas.

En cada ensayo se analizaron entre 50,000 y 500,000 células y se realizó la adquisición en dos pasos para incrementar el nivel de sensibilidad, en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur con software de análisis CELLQuest v4.1 (BD Biosciences).

La evaluación del perfil antigénico se basó en las siguientes variables: (1) presencia o ausencia de expresión antigénica; (2) patrón de expresión homogéneo versus heterogéneo y (3) porcentaje de células plasmáticas con expresión positiva para cada antígeno.

Figura 14. Esquema de las técnicas moleculares empleadas



2.8. Análisis estadístico

Las diferentes variables se recogieron en una base de datos realizada en Access 2003 (Microsoft Corporation, USA).

Todo el análisis se hizo con el programa estadístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows versión 11.0.

Para analizar posibles asociaciones entre variables numéricas discretas y categóricas se utilizaron tablas de contingencia, considerando el test χ^2 para la significación estadística. Para comparar medias entre variables continuas se aplicó el test T-student.

Sólo se consideraron estadísticamente significativos los valores con una p inferior a 0.05.

Para identificar las variables capaces de influir en nuestra variable a estudio, que fue la EMR detectada por PCR fluorescente, se utilizó un procedimiento de regresión logística paso a paso ("*forward stepwise*").

Análisis de supervivencia

Estudio univariable: se analizó la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes según diversas variables, mediante las curvas de Kaplan-Meier; para la comparación se empleó el test de *log-rank*.

Estudio multivariable: se analizaron igualmente la SG y la SLP utilizando modelos de riesgo proporcional de Cox, ajustando la selección con un método paso a paso ("*forward stepwise*").

Sólo se incluyeron en estos estudios los casos con todos los datos requeridos para el análisis. Así, con los datos de los pacientes al diagnóstico, los análisis univariados incluyeron 82 casos y los multivariados 68 casos; con los datos de EMR se pudieron incluir 51 pacientes en los análisis univariados y 43 en los multivariados.

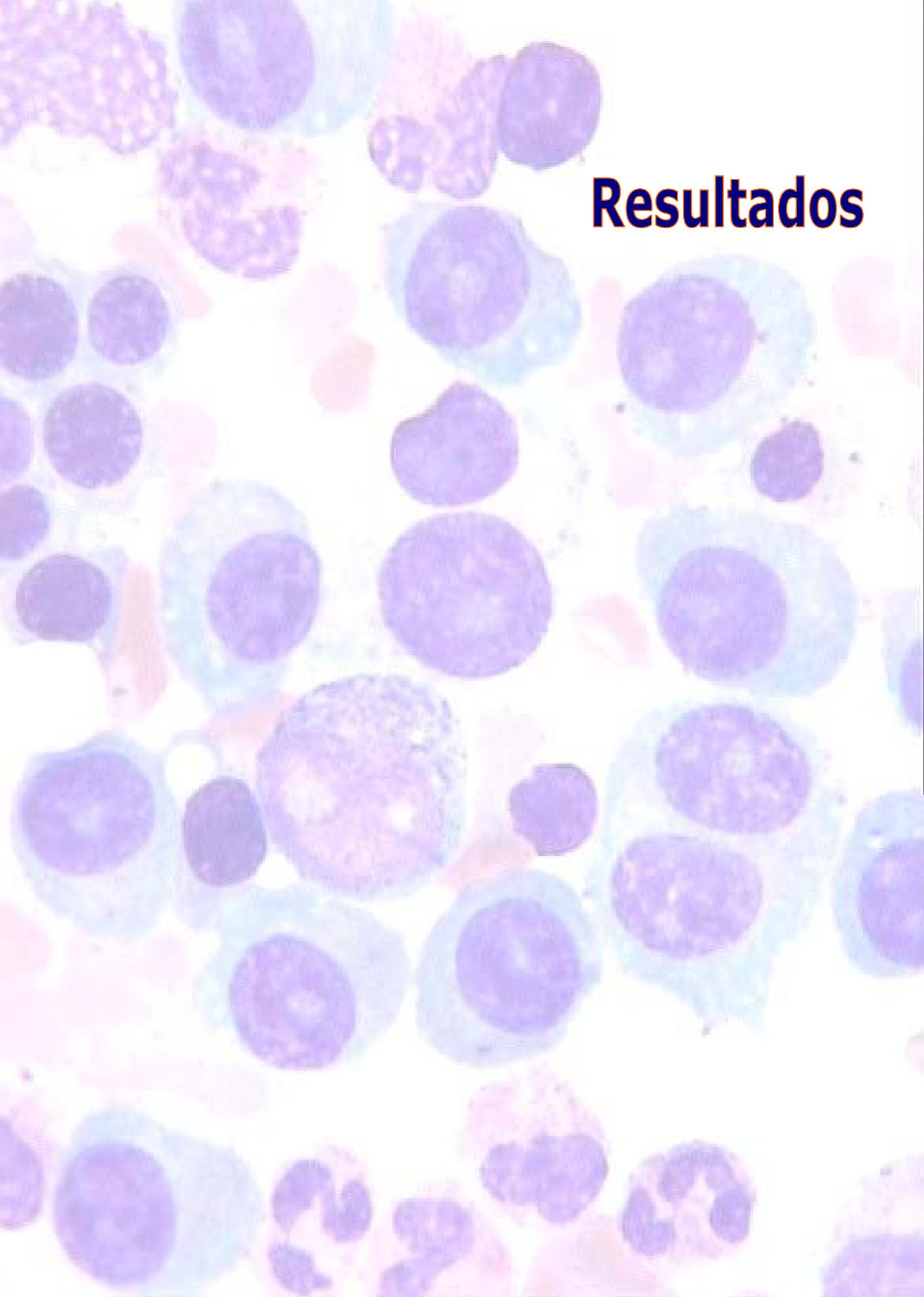
Las variables continuas fueron: edad, cifra de Hb, leucocitos, plaquetas, creatinina, calcio, albúmina, pico M en suero, pico M en orina, porcentaje de infiltración en MO por citología, porcentaje de plasmáticas en MO con fenotipo patológico por CMF, todo ello en el momento del diagnóstico.

Las variables categóricas analizadas fueron: sexo, presencia o no de reordenamientos completos VDHJ, presencia o no de reordenamientos incompletos DHJ, tipo de Ig, tipo de cadena ligera, estadio de Durie-Salmon, estadio A o B, ECOG, alteraciones genéticas, lesiones óseas e IPI.

El resto de variables estudiadas se categorizaron de la siguiente forma:

- grupo de respuesta al trasplante: RC por inmunofijación / resto de posibles respuestas.
- LDH al diagnóstico: normal / elevada.
- β_2 microglobulina: ≤ 3 / > 3 .
- EMR medida por CMF: plasmáticas patológicas en MO $\leq 0.01\%$ / $> 0.01\%$.
- EMR medida por PCR fluorescente: negativa / positiva.

Resultados



Capítulo I
Estudio de los genes de las Inmunoglobulinas en el Mieloma Múltiple

Para el estudio de clonalidad se analizaron 88 muestras de MO de pacientes al diagnóstico. En 11 casos no se detectó ningún reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas, pero nueve de ellos se consideraron muestras no adecuadas para el análisis por los siguientes motivos: cuatro tenían una infiltración de células plasmáticas por citometría de flujo inferior a 0.5%; otras cinco muestras tenían una infiltración superior al 5% pero al analizar el gen control no se detectó amplificación por mala calidad de la muestra.

De los 79 casos válidos, en 77 de ellos se pudo demostrar clonalidad, lo que supone un 97.4% (tabla 11).

Estudio del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas

Para estudiar los reordenamientos completos VDHJ se realizaron 3 PCR: FR1, FR2 y FR3. Para los reordenamientos incompletos se realizó una PCR: DHJ. FR1 y DHJ se estudiaron en todos los casos (88 casos). FR2 se estudió en 75 y FR3 se estudió en 48 casos.

En los primeros 51 casos, la PCR se visualizó en gel de agarosa al 2% y posteriormente se realizó PCR fluorescente con análisis de fragmentos o *genescan*. Las discrepancias encontradas entre ambos métodos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Discrepancias entre los resultados en gel de agarosa y *genescan*

	Positivos en gel de agarosa 2%	Positivos en <i>genescan</i>
FR1	28	28
FR2	23	26
FR3	8	7
DHJ	30	25

La diferencia más importante la encontramos en el estudio de DHJ, donde observamos que el gel de agarosa ofrecía un 9.8% de falsos positivos (5 de 51 casos).

Entre los casos que se pudieron valorar, un 58.2% fueron positivos para FR1, un 45.45% para FR2 y un 25.64% para FR3. Esto supone una frecuencia global de 65.8% de reordenamientos completos VDHJ. En cuanto a reordenamientos incompletos DHJ, la frecuencia fue de un 45.5%. En conjunto, un 32.9% de casos sólo presentaron reordenamientos completos, un 12.6% de casos sólo presentaron reordenamientos incompletos y otro 32.9% de casos presentaron ambos reordenamientos.

La frecuencia final de clonalidad analizando el gen de la cadena pesada de la Ig fue del 78.28% (tabla 12).

En los reordenamientos incompletos se pudo determinar el segmento DH utilizado, en base al tamaño del fragmento amplificado. En los casos en los que los tamaños pueden solaparse, como DH2 y DH5, se realizó la PCR con cada uno de los *primers* por separado. La frecuencia de las diferentes familias encontradas se resume en esta tabla

familia	frecuencia
DH1	19.4%
DH2	13.9%
DH3	5.6%
DH4	8.3%
DH5	22.2%
DH6	30.6%

Estudio de los genes de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas

Para estudiar los genes de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, se realizaron 3 PCRs en todos los casos: Lambda VJ, Kappa KVJ y Kde. En todas se hizo PCR fluorescente con análisis de fragmentos (*genescan*).

De los 79 casos analizables, en 68 se pudo encontrar algún reordenamiento clonal (86.1%): Lambda VJ: 34.1%; Kappa KVJ: 48.1%; Kde: 58.2% (resumen en tabla 13).

Tabla 12. Resultados del análisis de clonalidad

Gen	Reordenamiento	%
<i>IGH</i> (cadena pesada)	FR1	58.2
	FR2	45.4
	FR3	25.6
	VDJ	65.8
	DHJ	45.5
	Algún <i>IGH</i>	78.28
<i>IGL</i> o <i>IGK</i> (cadena ligera)	Lambda VJ	34.1
	KVJ	48.1
	Kde	58.2
	Algún <i>IGL</i> o <i>IGK</i>	86.1
Clonalidad genes de las inmunoglobulinas		97.4

Posteriormente se analizaron las frecuencias de los distintos reordenamientos, agrupando a las muestras por el tipo de cadena pesada y ligera que expresaba el clon tumoral.

MM IgG: 44 casos (43 de ellos con muestra adecuada).

Reordenamientos completos VDHJ: 76.7%.

Reordenamientos incompletos DHJ: 41.8%.

MM IgA: 20 casos.

Reordenamientos completos VDHJ: 75%.

Reordenamientos incompletos DHJ: 60%.

MM Bence-Jones: 16 casos (11 válidos).

En un caso no se encontró ningún reordenamiento. En los otros diez se encontraron reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras. Dos de ellos reordenaron cadenas ligeras y DHJ y otros dos casos reordenaron cadenas ligeras, DHJ y VDHJ.

MM Kappa: 42 casos (39 válidos).

Reordenamientos Lambda: 5.1%.

Reordenamientos KVJ: 66.6%.

Reordenamientos Kde: 35.9%.

En 8 casos (20.5%) no se pudo demostrar clonalidad para cadenas ligeras.

Se encontraron distintas combinaciones de reordenamientos:

- un único reordenamiento KVJ en el 35.9% de casos,
- dos reordenamientos KVJ en el 5.1%,
- un reordenamiento KVJ + un reordenamiento Kde en el 12.8%,
- dos reordenamientos KVJ + un reordenamiento Kde en el 5.1%,
- tres reordenamientos KVJ + un reordenamiento Kde en el 2.5%,
- un único reordenamiento Kde en el 12.8%,
- dos casos presentaron reordenamientos lambda (5.1%), pero ninguno de forma aislada; uno de ellos tenía dos reordenamientos lambda junto con un KVJ y el otro tenía un lambda, un KVJ y un Kde.

MM Lambda: 38 casos (35 con muestra adecuada).

Reordenamientos Lambda: 74.3%.

Reordenamientos KVJ: 28.6%.

Reordenamientos Kde: 88.5%.

En todos los casos de MM lambda se pudo demostrar clonalidad mediante el estudio de las cadenas ligeras. Se encontraron distintas combinaciones de reordenamientos pero lo más frecuente fue la coexistencia de reordenamientos lambda y Kde (62.8%). Reordenamientos aislados de lambda se encontraron en un 11.4% de las muestras, mientras que Kde sin lambda se encontró en un 25.7% de pacientes.

Tabla 13. Resumen de reordenamientos de los genes *IGK* e *IGL*

	MM	
	Kappa	Lambda
reordenamientos KVJ	66.6%	28.6%
reordenamientos Kde	35.9%	88.5%
reordenamientos λ	5.1%	74.3%

Al analizar los casos agrupados según el tipo de cadena pesada, se observó que en más de la mitad de los mielomas IgA se había detectado un reordenamiento incompleto DHJ (12 de 20). Se analizó mediante el test de χ^2 la posible relación entre tener un mieloma IgA y presentar reordenamientos incompletos, pero la asociación entre ambas variables no resultó estadísticamente significativa.

También se analizó si la presencia de reordenamientos incompletos podría estar relacionada con alguna alteración citogenética de las estudiadas, pero no se encontraron asociaciones con significación estadística: de los 46 casos con reordenamientos DHJ en los que se dispuso también del dato citogenético, 20 presentaron alguna alteración cromosómica, 24 tenían un cariotipo normal y en 2 casos no se obtuvieron metafases.

Estudios de supervivencia

ANÁLISIS UNIVARIABLES

Se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para las siguientes variables recogidas en el momento del diagnóstico: presencia o no de reordenamientos completos VDHJ, presencia o no de reordenamientos incompletos DHJ, tipo de Ig, tipo de cadena ligera, estadio Durie-Salmon, estadio A o B, LDH, β_2 microglobulina, calcio sérico, presencia o no de alteraciones en el cromosoma 13. También se estudió la supervivencia en relación al tipo de respuesta obtenida tras el trasplante.

Las variables que influyeron de forma estadísticamente significativa en la SG fueron: el tipo de respuesta obtenida tras el trasplante, el calcio sérico, el estadio A o B definido por la función renal y la β_2 microglobulina. Los resultados se resumen en la tabla 14.

En la SLP influyeron de forma estadísticamente significativa el tipo de respuesta tras el trasplante y el calcio sérico (tabla 15).

Tabla 14. Análisis univariantes de SG

Variable	Nº de casos	Mediana de SG (meses)	SG	P
Grupo de respuesta tras el trasplante	RC/IX: 44 Otras: 38	no alcanzada no alcanzada	88.64% 71.05%	0.026
Calcio sérico (mg/100ml)	≤ 10.5 : 62 < 10.5 : 20	no alcanzada 41.25	88.71% 53.55%	0.0003
Creatinina (mg/dl)	< 2 : 63 ≥ 2 : 19	no alcanzada 52.79	87.3% 57.89%	0.010
β_2 microglobulina (mg/dl)	< 3.5 : 48 ≥ 3.5 : 27	no alcanzada no alcanzada	91.67% 66.67%	0.011

Tabla 15. Análisis univariantes de SLP

Variable	Nº de casos	Mediana de SLP(meses)	SLP	P
Grupo de respuesta tras el trasplante	RC/IX: 44 Otras: 38	50.72 31.54	65.91% 44.74%	0.026
Calcio sérico (mg/100ml)	≤10.5: 62 <10.5: 20	50.72 27.67	62.9% 35%	0.0002
Creatinina (mg/dl)	<2: 63 ≥2: 19	44.10 30.39	60.32% 42.11%	no significativo
B ₂ microglobulina (mg/dl)	<3.5: 48 ≥3.5: 27	43.77 30.39	60.42% 51.85%	no significativo

El haberse detectado o no un reordenamiento completo VDJH no influyó en la supervivencia SG ni en la SLP. La comparación entre los casos con reordenamientos completos ± incompletos, frente a los casos que sólo tenían reordenamiento incompleto, no mostró diferencias significativas ni en el tipo de respuesta obtenida tras el trasplante, ni en la supervivencia.

Sin embargo, agrupando los casos en los que se detectaron reordenamientos incompletos DHJ, (independientemente de que se hubiera detectado también el completo), la SLP fue menor en este grupo que en aquellos pacientes que no tenían DHJ (figura 14). En los 48 casos en los que no se detectó reordenamiento DJH, con una media de seguimiento para la SLP de de 44 meses, 16 casos recidivaron, lo que supone una SLP del 66.67%. Entre los 34 casos que presentaron reordenamiento DHJ se detectaron 20 recidivas, con una media de seguimiento de 37 meses, siendo la SLP de 41.18%. La diferencia entre la SLP en ambos grupos alcanzó el límite de la significación estadística ($p=0.059$). Para la supervivencia global no hubo sin embargo diferencias.

También se analizó si el tipo de Ig influía en la SG y en la SLP. Para la supervivencia global no se encontró ningún dato relevante. Respecto a la SLP, de los 44 casos de mielomas IgG, recidivaron 16 (33.4%) y de los 20 casos de mieloma IgA recidivaron 12 (60%). Aunque la frecuencia de recidivas fue casi el doble en los MM IgA, la diferencia no resultó significativa en nuestra serie (figura 15).

ANÁLISIS MULTIVARIABLES

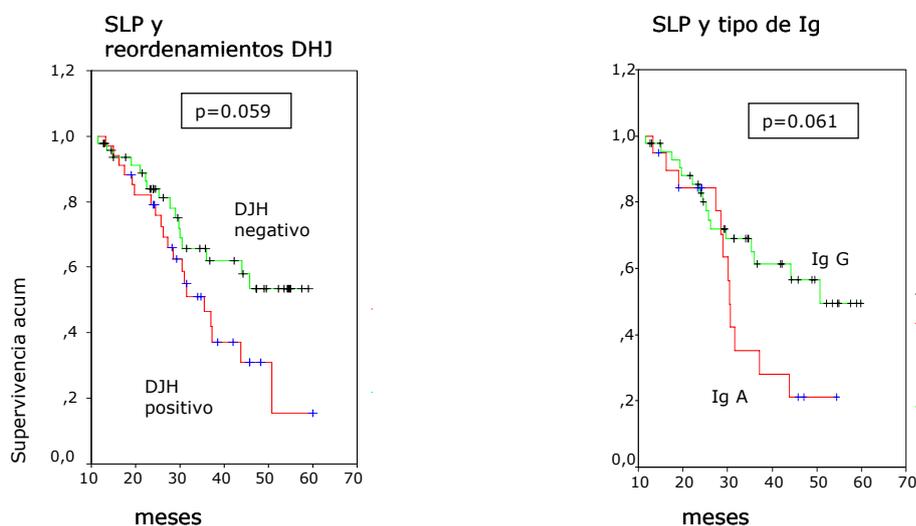
El análisis multivariable de supervivencia (Regresión de Cox) incluyó las siguientes variables: presencia de reordenamiento completo VDHJ, presencia de reordenamiento incompleto DHJ, presencia de algún reordenamiento de *IGH*, presencia de algún reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras, tipo de Ig, tipo de cadena ligera, tipo de respuesta al trasplante, sexo, ECOG, nivel de Hb, leucocitos, plaquetas, calcio, creatinina, albúmina, LDH y β_2 microglobulina al diagnóstico, pico M sérico, pico M en orina,

estadio de Durie-Salmon, estadio A o B, lesiones óseas y porcentaje de infiltración de la MO por citología. Se dispuso de todas estas variables en 68 casos.

Para la SG, las únicas variables con valor significativo en el pronóstico fueron el tipo de respuesta obtenida tras el trasplante: $p=0.01$ y Razón de Predominio (Odds Ratio) de 10.125 (1.743-58.829) y el calcio sérico al diagnóstico (como variable continua): $p=0,003$ y Razón de Predominio (Odds Ratio) de 1,49 (1.145-1.938).

Para la SLP, las variables con valor significativo en el pronóstico resultaron las mismas que para la SG. El tipo de respuesta obtenida tras el trasplante: $p=0.015$ y Razón de Predominio (Odds Ratio) de 2.659 (1.207-5.858) y el calcio sérico al diagnóstico (como variable continua): $p=0,0012$ y Razón de Predominio (Odds Ratio) de 1,245 (1.05-1.476).

Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier para la SLP según la presencia de reordenamientos incompletos y el tipo de Ig

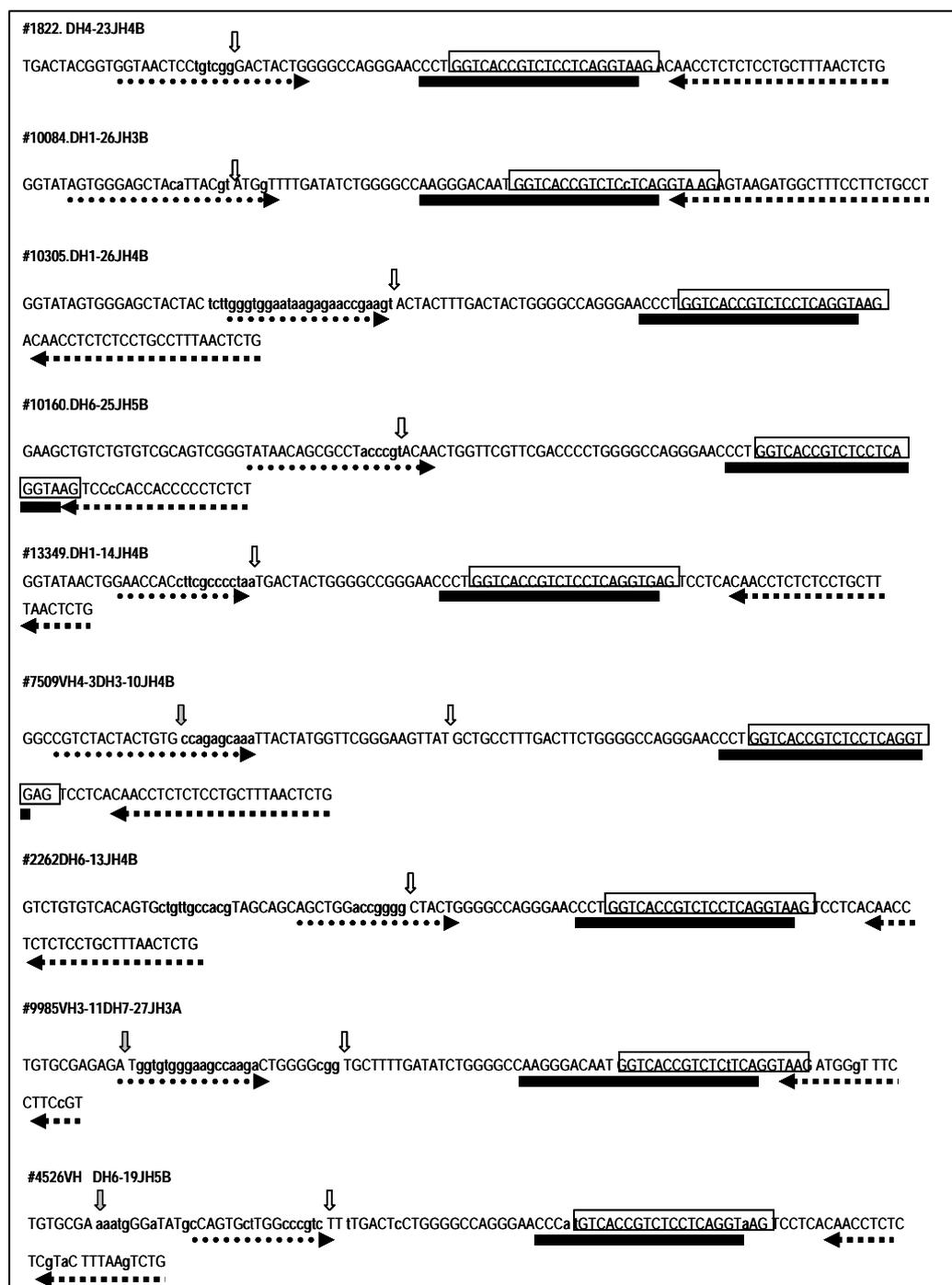


Capítulo II
Diseño de un método de PCR
cuantitativa alelo-específica con oligonucleótido
consenso fluorescente y comparación con el método estándar

La PCR cuantitativa alelo-específica del reordenamiento tumoral, tanto con sondas TaqMan como con *primer* auto-hibridante, se realizó en 9 casos.

El diseño de cada PCR se muestra en la figura 16.

Figura 16. PCRs alelo-específicas. Reordenamientos y secuencias de los oligonucleótidos



Las regiones de unión VDHJ y DHJ se señalan con flechas verticales; las inserciones de nucleótidos y las mutaciones somáticas están en letras minúsculas. Los *primers* alelo-específicos y los *primers* JH intrónicos están subrayados con líneas discontinuas y las secuencias de las sondas TaqMan con líneas negras; la secuencia del *primer* auto-hibridante va dentro de los rectángulos

Todos los casos se secuenciaron utilizando el primer consenso JH. Los casos 10160, 9985 y 4526 (casos en los que la PCR en tiempo real no funcionó adecuadamente), se secuenciaron también utilizando el primer consenso JH de la siguiente región en sentido 5'-3', esto es, se secuenció un fragmento mayor, con el fin de investigar la existencia de mutaciones somáticas en los lugares de unión de los oligonucleótidos.

En 6 de los 9 pacientes, la EMR se pudo calcular por ambos métodos usando curvas estándares en cada PCR. Los parámetros de las curvas y los resultados se recogen en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados de la EMR calculada por los dos métodos, sondas TaqMan y primer consenso auto-hibridante (*Self-quenched primer*)

Muestra	Eficiencia	Slope	Sensibilidad	R	EMR	Copias
1822 TaqMan	2.14	-3.03	5×10^{-5}	-0.98	2.8×10^{-4}	4
1822 Self-q	1.92	-3.54	5×10^{-5}	-1.00	3.8×10^{-4}	4
10084 TaqMan	1.74	-4.14	5×10^{-4}	-0.99	1.2×10^{-2}	16
10084 Self-q	2.12	-3.07	10^{-4}	-0.99	5.6×10^{-2}	8
10305 TaqMan	1.99	-3.35	5×10^{-5}	-1.00	6.6×10^{-2}	4
10305 Self-q	1.71	-4.29	10^{-4}	-0.99	2.7×10^{-2}	8
10160 TaqMan	1.95	-3.45	10^{-3}	-0.99	X	-
10160 Self-q	1.59	-4.97	10^{-2}	-0.98	X	-
13349 TaqMan	2.88	-2.18	10^{-4}	-0.98	1.3×10^{-2}	8
13349 Self-q	1.89	-3.63	5×10^{-4}	-0.99	1.8×10^{-2}	16
7509 TaqMan	2.26	-2.82	10^{-4}	-0.99	2.2×10^{-4}	8
7509 Self-q	2.01	-3.3	5×10^{-4}	-0.98	1.9×10^{-4}	16
2262 TaqMan	2.13	-3.04	5×10^{-4}	-0.99	7.5×10^{-1}	16
2262 Self-q	2.05	-3.21	5×10^{-4}	-0.99	7.1×10^{-1}	16
9985 TaqMan				-0.96	N.R	-
9985 Self-q	2.14	-3.03	10^{-4}	-1.00	N.R	8
4526 TaqMan				-0.88	X	-
4526 Self-q					X	-

R: coeficiente de correlación; N.R: sin resultado por no disponer de muestra de seguimiento;

X: sin resultado porque la técnica no funcionó

PCR con *primer* auto-hibridante

Este diseño funcionó en 7 casos. La sensibilidad de las curvas estándares varió entre 5×10^{-4} , ó 16 copias del gen diana, y 5×10^{-5} , ó 4 copias del gen diana. La eficiencia de las PCRs varió entre 1.71 y 2.14. La reproducibilidad intra-ensayo, calculada para el valor de 8,800 copias tuvo una media y desviación estándar de 31.72 ± 0.13 , lo que refleja un coeficiente de variación (CV) de 0.43%. La reproducibilidad inter-ensayo calculada para el mismo número de copias tuvo una media y desviación estándar de 31.86 ± 0.41 , con un CV de 1.3%. Se programó una curva de disociación al finalizar los ciclos de amplificación para comprobar la

especificidad de los productos amplificados. La temperatura de hibridación (T_m) de los productos específicos varió entre 76 y 83°C. Esta estrategia permitió diferenciar productos inespecíficos o dímeros de *primers* por la presencia de picos a diferente temperatura que los productos específicos (figura 17).

El gen control que se utilizó en esta técnica fue el gen del Tromboxano A (TXA), modificando también uno de los *primers* para hacerlo auto-hibridante, como se ha descrito en el apartado material y métodos. La eficiencia de la PCR del gen TXA fue de 1.87, la pendiente de la curva o *slope* fue -3.67 y el coeficiente de correlación fue 1 (figura 18). La media y la desviación estándar de la reproducibilidad intra-ensayo calculada para 16,600 copias, fueron 26.67 ± 0.38 , con un CV de 1.45%. La reproducibilidad inter-ensayo para el mismo número de copias tuvo una media y desviación estándar de 28.26 ± 0.56 , con un CV de 2%.

PCR con sondas TaqMan

Este diseño funcionó en 6 de los 9 casos.

La sensibilidad de las curvas estándares varió entre 5×10^{-4} , ó 16 copias del gen diana, y 5×10^{-5} , ó 4 copias del gen diana. La eficiencia de las PCRs varió entre 1.74 y 2.88. La reproducibilidad intra-ensayo, calculada para el valor de 8,800 copias tuvo una media y desviación estándar de 29.10 ± 0.31 , lo que refleja un coeficiente de variación (CV) de 1.05%. La reproducibilidad inter-ensayo calculada para el mismo número de copias tuvo una media y desviación estándar de 29.79 ± 0.8 , con un CV de 2.8%.

El gen control que se utilizó en esta técnica fue β -actina. Los *primers* para este gen se usaron a una concentración de 300nM y la temperatura de unión o de *annealing* fue 60°C. La eficiencia de la PCR fue de 1.96, la pendiente de la curva fue -3.41 y el coeficiente de correlación fue 1 (figura 18). La media y la desviación estándar de la reproducibilidad intra-ensayo calculada para 16,600 copias, fueron 24.82 ± 0.08 , con un CV de 0.35%. La reproducibilidad inter-ensayo para el mismo número de copias tuvo una media y desviación estándar de 23.52 ± 0.27 , con un CV de 1.16%.

Comparación entre los dos métodos

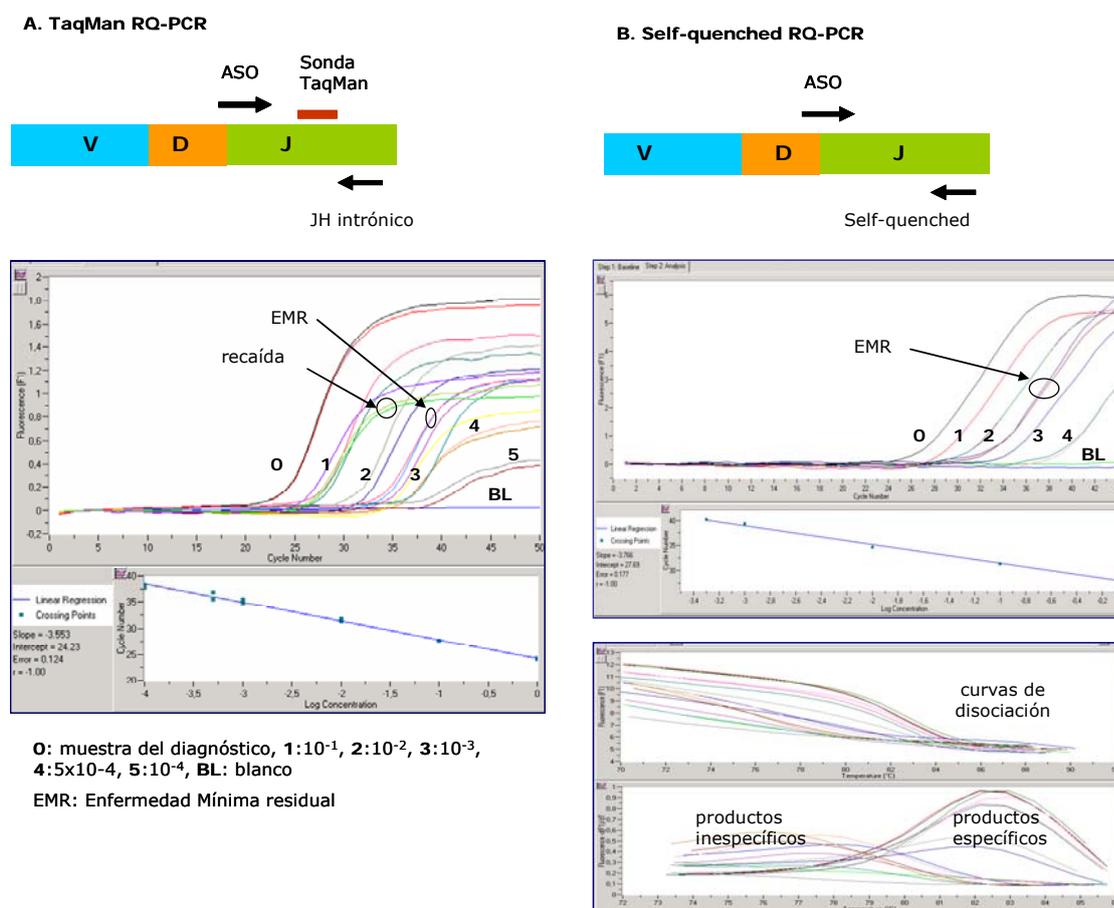
El rango de sensibilidades fue el mismo en los dos casos, entre 5×10^{-4} y 5×10^{-5} . Las sondas TaqMan alcanzaron mayor sensibilidad en 3 casos y el *primer* auto-hibridante fue más sensible en otro caso. La eficiencia de las PCRs osciló entre 1.71 y 2.14 con el *primer* auto-hibridante y entre 1.74 y 2.88 con las sondas Taíman.

En un caso en el que no había funcionado la sonda TaqMan, el ensayo con *primer* auto-hibridante funcionó correctamente, mientras que en otros 2 casos la eficiencia o la sensibilidad fueron inadecuadas con ambos.

La EMR se pudo medir por ambos métodos en 6 de los 9 casos, obteniéndose resultados similares en todos ellos (tabla 16).

Las curvas estándares de los genes que se usaron como control, tuvieron parámetros similares (figura 18).

Figura 17. Esquema y ejemplos de curvas estándares de los dos métodos de PCR cuantitativa



Causas de fracaso de las PCRs

Como se ha dicho previamente, la eficiencia y la sensibilidad no fueron adecuadas en 3 casos. Esto se debió a la presencia de mutaciones somáticas en los lugares de unión de alguno de los oligonucleótidos utilizados (figura 16).

Caso 9985. La PCR con *primer* auto-hibridante arrojó un resultado adecuado, pero no funcionó con sonda TaqMan. El análisis de la secuencia de la región VDJH reveló que en la zona de unión del *primer* JH intrónico, el empleado en la TaqMan PCR, existían 2 mutaciones que producían un incremento en la temperatura de unión de 9.8°C ($\Delta T_m = 9.8^{\circ}\text{C}$). Aunque también existía una mutación en la región de unión del *primer* auto-

hibridante, en este caso el ΔT_m producido era sólo de 3.6°C , lo que no impidió que funcionara correctamente.

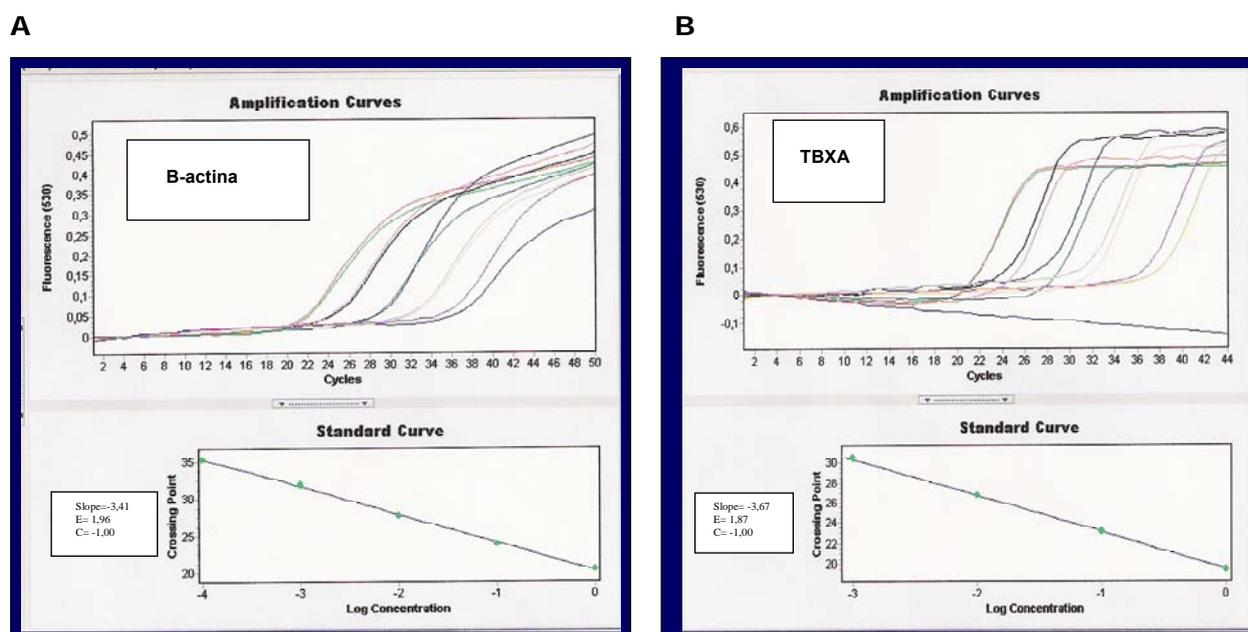
Caso 4526. El diseño TaqMan tenía un total de 6 mutaciones, 3 en el sitio de unión de la sonda y 3 en el del *primer* intrónico, provocando un ΔT_m de 14.9°C . En el lugar de unión del *primer* auto-hibridante había una mutación que producía un ΔT_m de 3.4°C , aparentemente insuficiente para provocar el fracaso de la técnica; sin embargo, la mutación coincidía justamente con el extremo 3' del *primer*, el más determinante en la unión a la secuencia diana.

Caso 10160. Finalmente, este caso tenía una mutación en el lugar de unión del *primer* intrónico con un ΔT_m de 8.5°C , que explicaba la baja sensibilidad del ensayo TaqMan. En el sitio de unión del *primer* auto-hibridante había una sola mutación con un ΔT_m de 5°C , teóricamente insuficiente para el fracaso de la técnica, pero no se pudo encontrar otra explicación tras descartarse también la formación de dímeros de *primer*.

Figura 18. Curvas estándares de los genes de control

A: β -actina en la TaqMan PCR

B: TXA en la *Self-quenched* PCR



Capítulo III
Enfermedad Mínima Residual mediante
PCR cualitativa fluorescente.
Significado pronóstico

En el estudio de EMR se incluyeron 51 casos que cumplían los siguientes requisitos:

- Tener al diagnóstico un reordenamiento incompleto de *IGH* o algún reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras de la Ig, ya que estas PCRs conseguían aumentar la sensibilidad en al menos un logaritmo respecto a la sensibilidad de los reordenamientos completos VDHJ.
- Tener muestra de seguimiento con una calidad adecuada de ADN, comprobado mediante la amplificación del gen control.
- Haber obtenido buena respuesta con el tratamiento, preferiblemente RC/Ix o RC/EEF, aunque se incluyeron también algunos casos con otro tipo de respuesta.

A continuación se resumen las características del grupo estudiado.

Sexo. 27 varones, 24 mujeres.

Edad. Media: 59.9 años; mediana: 62 años; rango: 33-71 años; 36 de los 51 pacientes (70.6%) tenían menos de 65 años al diagnóstico y 15 de 51 (29.4%) más de 65.

ECOG. 0: 17.6%; 1: 43.1%; 2: 29.4%; 3: 9.8%.

Tipo de Ig. IgG: 47.1%; IgA: 31.4%; Bence-Jones: 19.6%; no secretor: 2%.

Tipo de cadena ligera. Kappa: 51%; Lambda: 47%.

Estadio

Durie-Salmon. I: 9.8%; II: 25.5%; III: 64.7%.

Estadio A (creatinina <2mg/dl) 84.3%; Estadio B (creatinina ≥2mg/dl) 15.7%.

IPI. Estadio I: 51%; estadio II: 30.6%; estadio III: 18.4%.

LDH. Normal: 90.2%; elevada: 9.8%.

Parámetros analíticos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
M sérico	48	,00	11,00	3,3792	2,65352
M orina	50	,000	39,000	2,64564	6,367929
B2M dg	49	,50	29,20	4,2431	4,67540
HB dg	51	6,0	15,0	10,853	2,1564
Leucos dg	51	2,40	11,10	6,1759	2,13061
Plaq dg	51	40	475	212,20	79,326
Creat dg	51	,40	7,40	1,4071	1,25846
Ca++ dg	51	8,40	16,10	10,0559	1,65478
Albúmina dg	51	1,80	5,97	3,6541	,73872
Infiltración dg	51	10,0	100,0	48,578	28,5160
PCR dg	38	,01	8,00	1,4582	1,96260

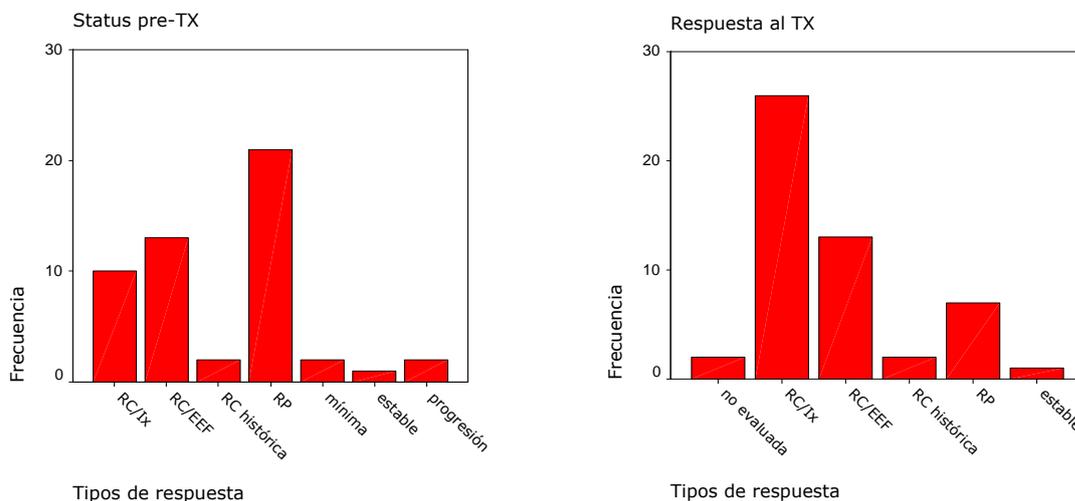
(N= número de pacientes con el dato disponible; dg= al diagnóstico)

Lesiones óseas. Normal: 11.8%; osteoporosis: 7.8%; líticas menores: 29.4%; líticas mayores: 51%.

Citogenética (se dispuso de datos en 26 pacientes). Normal: 50%; delección 13q o monosomía 13: 15.4%; alteración de 11q: 7.7%; otras: 26.9%

La respuesta al tratamiento con quimioterapia, la situación previa al trasplante y la respuesta obtenida con el trasplante, se resumen en la figura 19.

Figura 19. Gráficos de la frecuencia de los diferentes tipos de respuesta obtenidos con QT y con trasplante



Antes del trasplante, 10 pacientes (19.6%) estaban en RC con inmunofijación negativa (RC/Ix); 13 (25.5%) estaban en RC con electroforesis negativa pero con inmunofijación positiva (RC/EEF); 2 (3.9%) tenían RC definida por criterios clínicos, pero no se disponía del dato protéico (RC histórica); 21 (41.2%) estaban en respuesta parcial (RP); 2 (3.9%) habían tenido una respuesta mínima a la quimioterapia; 1 (2%) permanecía con enfermedad estable y 2 (3.9%) estaban en progresión.

Después del trasplante, 26 de los 51 pacientes (51%) alcanzaron RC/Ix, 13 (25.5%) RC/EEF, 2 (3.9%) RC/histórica, 7 (13.7%) quedaron con RP y 1 (2%) con enfermedad estable (figura 19).

El seguimiento medio para la SG fue de 35 meses (entre 13 y 47) y la mediana de seguimiento se situó en 34.1 meses. Para la SLP la media de seguimiento fue de 31.5 meses (entre 13 y 60) y la mediana 29.6 meses. La SG en este periodo fue del 86.3% y la SLP del 56.9%. De los siete pacientes que fallecieron durante el seguimiento, cinco casos (71.4%) estaban en recaída o progresión, uno falleció por causas relacionadas con el mieloma o el trasplante y otro por una causa no relacionada.

Estudio de la EMR por PCR fluorescente

La EMR se estudió por PCR fluorescente y por CMF en la misma muestra. Las muestras se tomaron en el momento en que se alcanzó la mejor respuesta después del trasplante: un 68% de los casos entre los 3 y 6 meses post-trasplante y un 22% de los casos después de 6

meses. En un 10% de los casos no se dispuso de muestra post-trasplante y se estudió la extraída antes de la realización del mismo.

Como ya se ha adelantado previamente, para el seguimiento de la enfermedad se utilizaron los reordenamientos incompletos DHJ y los reordenamientos de las cadenas ligeras. De los 51 pacientes estudiados, en 16 se había detectado un sólo reordenamiento al diagnóstico, en 22 se habían detectado dos reordenamientos diferentes, en 11 casos tres reordenamientos y en dos casos hasta cuatro reordenamientos distintos. La PCR para la detección de EMR se realizó para todos los reordenamientos detectados al diagnóstico y se dio como positiva si cualquiera de ellos permanecía positivo, aunque alguno hubiera dejado de detectarse.

En 26 de 51 casos no se detectó clonalidad en la muestra de seguimiento, lo que supone un 51% de casos negativos, mientras que 25 casos (49%) permanecieron positivos.

Comparación de los resultados de PCR con los resultados de Inmunofijación

En la tabla 17 se comparan los resultados de la PCR con los de la respuesta medida por los métodos convencionales de electroforesis e inmunofijación. Se han excluido dos casos de los 51 estudiados por PCR, porque no estaba evaluada la respuesta.

Tabla 17. Resultados de la respuesta al trasplante frente a la EMR por PCR fluorescente

	RC/Ix	RC/EEF	RC histórica	RP	estable	Total
PCR negativa	18	6	0	0	1	25
PCR positiva	8	7	2	7	0	24
Total	26	13	2	7	1	49

Aunque hay una buena correlación entre los resultados, puesto que la mayoría de los pacientes que obtuvieron RC con inmunofijación negativa también tuvieron PCR negativa, se observan algunas discrepancias.

Hay ocho casos que, aunque obtuvieron RC/Ix, mantuvieron la PCR positiva; de éstos, seis recidivaron durante el seguimiento; los dos casos que no lo hicieron tienen un seguimiento corto, de 26 y 15 meses respectivamente.

Por otro lado, también se observan pacientes en la situación contraria, es decir, que a pesar de tener la inmunofijación positiva, tuvieron negativa la PCR. En este grupo se incluyen seis casos, de los cuales cuatro estaban vivos y libres de enfermedad en el momento del análisis.

El resto de los casos con inmunofijación positiva (la minoría como ya se explicó al describir los criterios de selección de los pacientes para este estudio), repartidos en diferentes grupos de respuesta, tuvieron también PCR positiva. Sólo hay un caso que con enfermedad claramente presente, no se pudo detectar por PCR durante el seguimiento.

Comparación de los resultados de PCR con los resultados de CMF

En los estudios de CMF se incluyeron los pacientes que presentaron un fenotipo aberrante al diagnóstico; esto permitió el seguimiento del 92% de los casos en general y del 98% (50 de 51) de los casos que se siguieron por PCR fluorescente. La comparación de los resultados se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados de EMR por CMF frente a la PCR fluorescente

	EMR por CMF ≤ 0.01%*	EMR por CMF > 0.01%	Total
PCR negativa	15	11	26
PCR positiva	1	23	24
Total	16	34	50

*punto de corte tomado como referencia por haberse demostrado su valor pronóstico¹⁴⁰

De 50 casos analizados por CMF, 16 tuvieron una EMR ≤ 0.01% y 34 una EMR > 0.01%.

De los 16 casos con baja EMR, 15 tuvieron la PCR fluorescente negativa y hubo sólo un caso que se detectó por PCR; este paciente recidivó durante el seguimiento.

De los 34 casos con alta EMR por CMF, 23 de ellos presentaron también el reordenamiento por PCR (67.6%), pero en 11 casos la PCR no detectó la enfermedad; de estos 11 casos, ocho estaban vivos y libres de progresión en el momento del análisis, dos habían recidivado y uno había fallecido por causa no relacionada con el mieloma.

Al poner el punto de corte un logaritmo más alto, es decir, EMR por CMF ≤/ > 0.1%, los resultados son los siguientes: de los 30 casos que tuvieron una EMR por CMF ≤ 0.1%, 24 tuvieron PCR negativa y seis PCR positiva; de los 20 casos que tuvieron EMR por CMF superior a ese valor, fueron detectados 18 (90%) por PCR.

Se analizó la posible relación entre nuestra variable a estudio (EMR por PCR) y todas las demás mediante el procedimiento de regresión logística (análisis paso a paso o "forward stepwise"). La única variable con la que se asoció de forma significativa fue con la EMR medida por CMF: p < 0.001; Odds Ratio = 24.28; (2.6-227.2).

Estudios de supervivencia

ANÁLISIS UNIVARIABLES

En este análisis realizamos curvas de Kaplan-Meier para las dos nuevas variables obtenidas con el seguimiento: EMR por PCR fluorescente (positiva o negativa) y EMR por CMF (células plasmáticas patológicas en MO ≤ 0.01% ó > 0.01%). También se analizó de nuevo, en este grupo más reducido de casos, la supervivencia en función del tipo de respuesta obtenida tras el trasplante.

No hubo ninguna variable que influyera de manera estadísticamente significativa en la SG durante una mediana de seguimiento de 34.1 meses.

Sin embargo, la SLP durante una mediana de seguimiento de 29.6 meses, se vio afectada por tres variables (figura 20):

1.- Tipo de respuesta obtenida con el trasplante.

De los 26 casos que obtuvieron RC con inmunofijación negativa, recidivaron ocho, mientras que de los 25 casos que obtuvieron cualquier otra respuesta lo hicieron 14, lo que supone una SLP del 69.23% y 44% respectivamente, con una $p=0.02$.

2.- Nivel de infiltración en la MO medida por CMF.

Aunque en este caso no se alcanzó la significación estadística ($p=0.15$), de los 11 pacientes que presentaban menos del 0.01% de infiltración recidivaron tres y de los 29 que presentaban más del 0.01% recidivaron 18, lo que supone una SLP del 72.73% frente a 37.93%.

3.- Resultado de la PCR fluorescente.

De los 26 casos con EMR negativa por PCR recidivaron cinco, mientras que de los 25 casos con EMR positiva por PCR recidivaron 17. La SLP fue de 80.77% y 32% respectivamente, con una $p=0.0014$.

ANÁLISIS MULTIVARIABLES

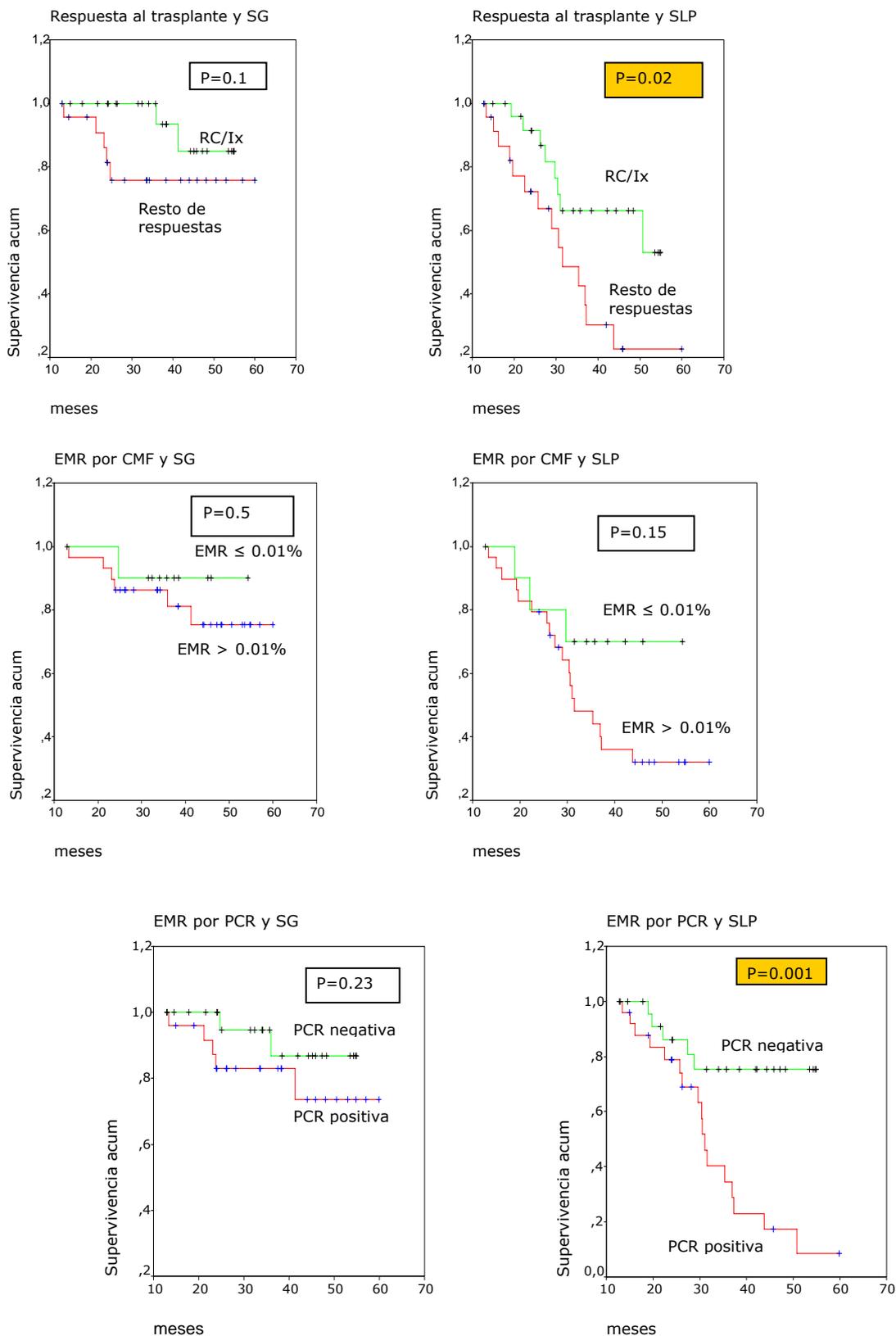
Para el análisis multivariable de supervivencia, se aplicó el modelo de riesgo proporcional de Cox ajustando la selección con un método paso a paso ("*forward stepwise*").

Se incluyeron las siguientes variables: sexo, tipo de Ig, tipo de cadena ligera, estadio de Durie-Salmon, estadio A o B, ECOG, pico M en suero, pico M en orina, valor de distintas variables al diagnóstico (β_2 microglobulina, Hb, leucocitos, plaquetas, creatinina, calcio, albúmina y LDH), porcentaje de infiltración en MO por citología al diagnóstico, existencia de lesiones óseas, alteraciones citogenéticas, porcentaje de células plasmáticas patológicas por CMF al diagnóstico, EMR por CMF, EMR por PCR, IPI y tipo de respuesta tras el trasplante. Se categorizaron algunas de las variables (ver material y métodos). La presencia de todas estas variables estuvo disponible en 20 casos. Se realizó un segundo análisis, excluyendo la variable alteraciones genéticas, disponiendo de 42 casos analizables.

Para la SG, no hubo ninguna variable con valor significativo en el pronóstico; aunque el modelo estadístico eligió la variable tipo de respuesta tras el trasplante como la única con capacidad de discriminación, la p fue de 0.348 (en el análisis de 20 casos) y de 0.232 en el análisis de 42 casos.

Para la SLP, en el análisis de 20 casos, la única variable con valor significativo en el pronóstico fue el tipo de respuesta tras el trasplante: p 0.004 y Razón de Predominio (Odds Ratio) de 57.811 (3.571-935.991). En el análisis de 42 casos, la única variable con valor significativo en el pronóstico fue el resultado de la PCR fluorescente: p 0.003 y Razón de Predominio (Odds Ratio) de 5.477 (1.81-16.574).

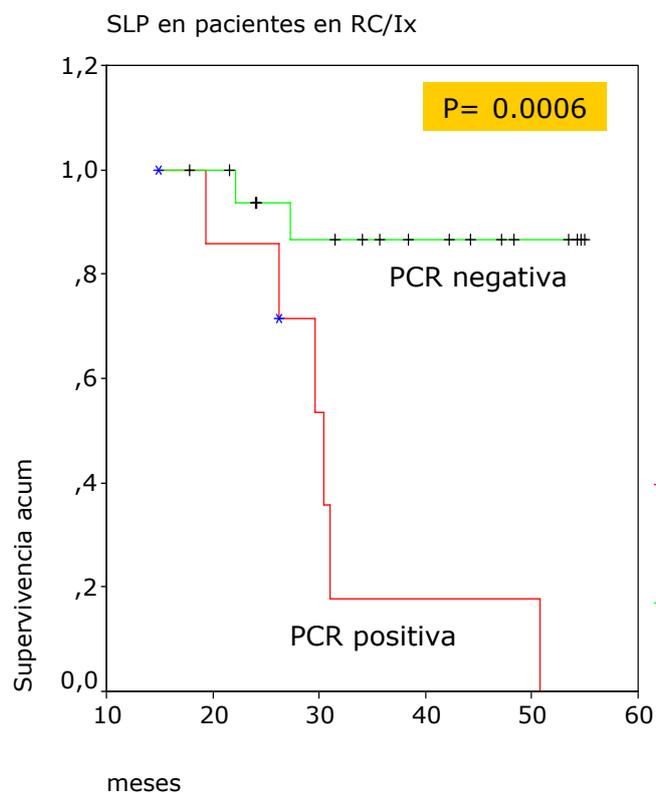
Figura 20. Curvas de supervivencia para las variables respuesta al trasplante, EMR por CMF y EMR por PCR



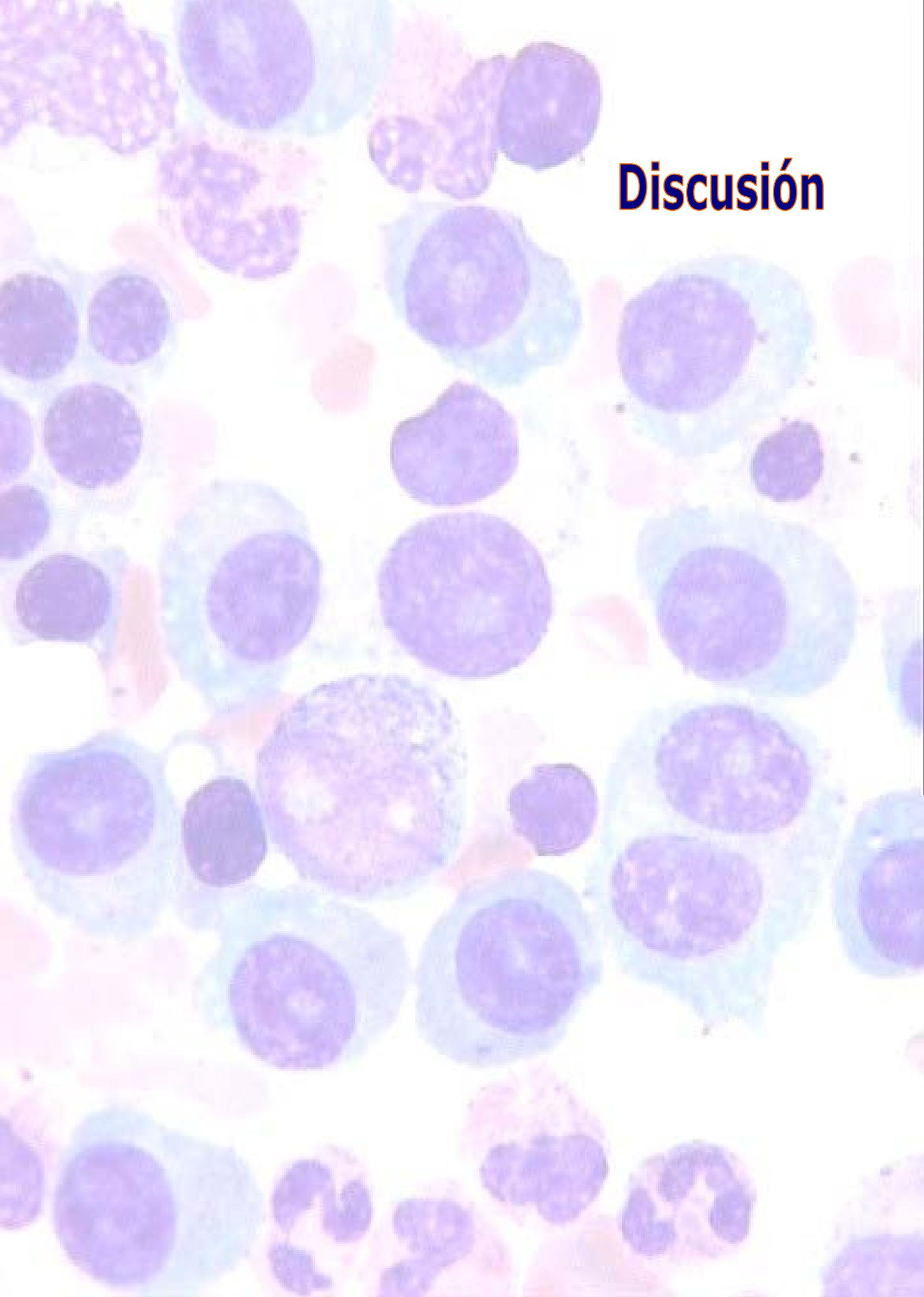
ANÁLISIS DE PACIENTES EN RC POR INMUNOFIJACIÓN

Por último, se seleccionó el grupo de pacientes que habían obtenido RC/Ix tras el trasplante y se analizó la SLP introduciendo como variable la EMR por PCR. De los 26 pacientes que estaban en RC/Ix tras el trasplante, 18 tenían PCR negativa y ocho seguían con PCR positiva. Entre los 18 casos negativos se detectaron dos recidivas, mientras que de los ocho casos positivos recidivaron seis, durante una mediana de seguimiento de 30.39 meses. La SLP fue del 88.89% y 25% respectivamente, con una $p=0.0006$ (figura 21).

Figura 21. SLP en pacientes en RC/Ix en relación a la EMR por PCR



Discusión



En ausencia de una característica citogenética o molecular específica, el reordenamiento de los genes de las Igs, único en cada paciente y estable durante la enfermedad, esto es, que no presenta variación intraclonal¹³², sigue constituyendo la huella a seguir durante el curso evolutivo y la respuesta al tratamiento.

El principal objetivo de este trabajo consistía en encontrar técnicas moleculares sencillas para poder utilizarlas de forma rutinaria en el seguimiento de los pacientes con MM, puesto que la mejor técnica molecular hasta el momento, la ASO-PCR cuantitativa del reordenamiento del clon tumoral, era demasiado laboriosa y no se podía aplicar en todos los casos.

El primer paso fue el estudio exhaustivo de todos los reordenamientos de los genes de las Igs por PCR cualitativa fluorescente, con el fin de definir las mejores dianas para el seguimiento posterior de la enfermedad residual (capítulo 1).

Simultáneamente se diseñó un nuevo método de PCR cuantitativa alelo-específica, con el objetivo de mejorarla y simplificarla, adaptando al estudio del gen de la cadena pesada de las Igs un diseño descrito previamente para otros genes (capítulo 2).

Finalmente, se empleó la PCR fluorescente de los reordenamientos incompletos del gen *IGH* y de los reordenamientos de los genes de *IGK* e *IGL* para estandarizar nuestro propio método de seguimiento de la enfermedad, a la vez que analizamos su significado pronóstico (capítulo 3).

1. Estudio de los genes de las inmunoglobulinas

Se estudiaron los genes de las Igs mediante PCR en 88 pacientes con MM en el momento del diagnóstico. La frecuencia de detección de reordenamientos del gen *IGH* (completos o incompletos) encontrados en nuestra serie, ha sido inferior a lo referido en otros trabajos publicados^{127,199}: 65.8% con VDHJ, 45.5% con DHJ y 78.3% global (tabla 19). Sin embargo, añadiendo el estudio de los genes de las cadenas ligeras, se ha conseguido detectar clonalidad en el 97.4% de los pacientes.

La baja frecuencia de detección de reordenamientos completos, hace pensar que en nuestra serie la incidencia de mutaciones somáticas en el gen *IGH* es muy elevada, aumentando así la frecuencia de falsos negativos, puesto que en la mayoría de esos casos se pudo detectar clonalidad al estudiar los genes de las cadenas ligeras. No obstante, este hecho también puede deberse a una peor optimización de la técnica en nuestro laboratorio.

Tabla 19. Comparación de resultados de clonalidad con *IGH* con publicaciones previas

	MM (González y cols ¹⁹⁹)	MM
reord VDHJ	84%	65.8%
reord DHJ	60%	45.5%
global	94%	78.3%

En relación a los segmentos utilizados en los reordenamientos incompletos de *IGH*, se pudieron determinar las frecuencias de las diferentes familias D_H atendiendo al tamaño del fragmento amplificado, pero no se determinó el segmento específico, al no secuenciarse todos los reordenamientos. En esta serie, las familias encontradas con más frecuencia han sido DH6 y DH5, lo que difiere de otras comunicaciones previas¹⁹⁹.

Respecto a la frecuencia de reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras de las Igs, nuestros resultados son semejantes a los de otros autores, aunque la detección de reordenamientos del locus kappa V-J ha sido menor de la esperada (tabla 20)¹²⁷.

Tabla 20. Comparación de resultados de clonalidad de reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras de la Ig en el MM

	(Hadzidimitriou y cols ¹²⁷)		Kappa	Lambda
	Kappa	Lambda		
reordenamientos KVJ	100%	40.5%	66.6%	28.6%
reordenamientos Kde	39.%	71.4%	35.9%	88.5%
reordenamientos λ	11.6%	78.2%	5.1%	74.3%

Por todo lo que se ha explicado en este trabajo sobre los genes de las Igs y la jerarquía de los reordenamientos, no es sorprendente que se puedan detectar varios reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras en un mismo paciente, si estamos estudiando ADN genómico, ya que se pueden detectar tanto los funcionales como los no funcionales. Asumiendo todas las combinaciones posibles en el caso de que estemos detectando alelos no funcionales, en nuestra serie hemos encontrado tres casos con un número inesperado de reordenamientos.

Un caso fue un MM IgA kappa que presentó tres reordenamientos del locus kappa V-J. Sin embargo, es complicado asegurar que los tres picos fueran específicos, puesto que se trataba de un paciente en el que por citología se habían visto un 14% de células plasmáticas en MO, pero que en el aspirado enviado al laboratorio no se pudieron detectar plasmáticas patológicas por CMF, por lo que la población celular estudiada era en su mayoría población B policlonal. Los otros dos casos fueron un MM IgG lambda y un MM IgA lambda, que presentaron tres reordenamientos del segmento Kde. Si esto se explicara por la existencia de dos clones tumorales diferentes, en nuestra serie la frecuencia de MM biclonal sería del 2.5% (2 casos de 79 muestras). Pero este hallazgo podría ser también un falso positivo, o explicarse por alguno de los fenómenos revisados en la introducción de "edición del receptor" o "revisión del receptor".

Respecto a la evolución de estos dos casos, ambos pacientes obtuvieron respuesta parcial tras el trasplante; uno falleció a los seis meses del mismo y el otro estaba vivo a los 60 meses de seguimiento.

Un dato interesante y que hasta ahora no está publicado, ha sido encontrar que los pacientes en los que se detectaron reordenamientos incompletos DHJ presentaron una peor SLP. Se analizó si el presentar reordenamientos DHJ se asociaba a alguna otra variable, pero no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa. En concreto se revisaron los casos en los que, presentando reordenamiento DHJ, no se había detectado reordenamiento completo VDHJ. Esta característica puede hacer pensar en que uno de los alelos del cromosoma 14 podía haberse traslocado a otro cromosoma al pasar por el centro germinal, momento en el que suceden las traslocaciones de *IGH*. Pues bien, de los ocho casos que presentaron esta característica, tres de ellos tenían un cariotipo normal, en otros tres casos no se dispuso del dato de citogenética y en los dos restantes se encontró delección del cromosoma 13, pero no se encontraron alteraciones del cromosoma 14.

En cualquier caso, este dato de una peor SLP es sólo una tendencia, ya que la asociación encontrada está en el límite de la significación estadística y debe de ser confirmado en una serie más larga de casos y en un grupo no seleccionado por el tipo de respuesta.

2. Diseño de un método de PCR cuantitativa alelo-específica con oligonucleótido consenso fluorescente (*Self-quenched PCR*)

Con este estudio se ha establecido y optimizado una nueva metodología para la evaluación de la EMR mediante PCR cuantitativa en tiempo real, que aporta algunas ventajas respecto al método más aceptado actualmente, la PCR alelo-específica con sondas TaqMan (TaqMan PCR)^{139,140,167,200}.

La PCR cuantitativa del gen *IGH* ha demostrado su utilidad para la evaluación de la respuesta al tratamiento en neoplasias linfoides, sobre todo en las de origen pre-folicular que no presentan mutaciones somáticas^{168,201,202}; sin embargo, en el caso del MM, la elevada frecuencia de mutaciones que portan los genes de las Igs hace fracasar la técnica en muchos casos, a pesar de que uno de los *primers* sea alelo-específico^{139,168,171,201}. Varios autores han sugerido que la presencia de una mutación en el sitio de unión de la sonda o del *primer* JH que modifique la temperatura de hibridación (ΔT_m) en más de 6°C, o la presencia de más de tres mutaciones, conlleva siempre al fracaso en la PCR^{139,200}. Además, el diseño de la TaqMan PCR con un *primer* alelo-específico, varios *primers* JH intrónicos y varias sondas consenso, la convierten en una técnica metodológicamente complicada.

En un intento de superar estos problemas y simplificar el método, se ha diseñado un único *primer* consenso en la región JH, que se puede utilizar en todos los pacientes independientemente del fragmento JH que tengan reordenado. A la secuencia consenso del

primer utilizado en la PCR cualitativa de rutina para el diagnóstico de clonalidad, se le han introducido algunas modificaciones, incluida la adición de una molécula fluorescente; se ha conseguido así un único oligonucleótido (llamado auto-hibridante o *self-quenched*) que funciona como primer y como sonda al mismo tiempo.

Este diseño, original de Nazarenko y cols¹⁶², ya había sido utilizado por otros autores para la cuantificación de otros genes^{203,204}, pero nunca hasta ahora se había empleado para la cuantificación del gen *IGH*.

Hemos estudiado nueve casos mediante esta nueva metodología y hemos comparado los resultados con los de la PCR cuantitativa con sondas TaqMan.

Por un lado, la PCR cuantitativa con *primer* auto-hibridante ha mostrado la misma sensibilidad y reproducibilidad que la TaqMan PCR: en los seis casos en los que funcionaron ambas técnicas, la EMR fue prácticamente igual por ambos métodos.

Por otro lado, con esta estrategia se pueden resolver algunos de los problemas inherentes al estudio por PCR del gen *IGH*, como son las mutaciones somáticas. Al utilizar un oligonucleótido en lugar de dos, se reducen las probabilidades de que la secuencia con la que tiene que hibridar esté mutada. Un ejemplo lo podemos ver en el caso del paciente 9985: la región JH3 de este reordenamiento se encontraba significativamente mutada y la PCR con el *primer* JH intrónico y la sonda TaqMan no funcionó, mientras que sí se consiguió una curva adecuada con el *primer self-quenched*, aunque al no disponerse de muestra seguimiento no se pudo calcular la EMR.

Para completar el diseño de esta nueva PCR cuantitativa en tiempo real, se diseñó también un *primer* auto-hibridante para la PCR de un gen control. Aunque la normalización de los resultados de EMR se podía realizar amplificando un gen control con sondas TaqMan (técnica habitual en el laboratorio), parecía interesante aplicar este nuevo *primer* también para la PCR del gen control. Los resultados obtenidos en la cuantificación de la EMR utilizando *primers self-quenched* para *IGH* y para el gen control, fueron equivalentes en todos los casos a los obtenidos con la TaqMan PCR.

Otra ventaja de este método es que reduce el coste. Con este diseño sólo se necesita el *primer* alelo-específico (igual que el de la TaqMan PCR) y el *primer* fluorescente auto-hibridante, que es el mismo para todos los casos. Por el contrario, para la TaqMan PCR se necesitan tres sondas diferentes (sondas consenso) y seis *primers* intrónicos específicos. Según nuestra estimación esto reduce el gasto en un 20-25%.

En resumen, el *primer* consenso auto-hibridante es adecuado para el diseño de la PCR cuantitativa alelo-específica y es un método sensible y reproducible para evaluar la EMR en pacientes con MM que alcanzan RC con altas dosis de QT; obtiene resultados comparables a la TaqMan PCR, reduce el gasto y puede incluso superar algunos inconvenientes de ésta en los casos en los que el gen presenta frecuentes mutaciones somáticas.

3. Enfermedad Mínima Residual mediante PCR cualitativa fluorescente. Significado pronóstico

La PCR cualitativa del gen *IGH* es el método molecular empleado de rutina para el diagnóstico de clonalidad en el Mieloma Múltiple. Sin embargo, después del trasplante, y si se obtiene una muy buena respuesta con el mismo, los niveles de enfermedad no son detectables por esta técnica. Por ello se necesita aumentar la sensibilidad de la PCR mediante sondas y *primers* que sean específicos del reordenamiento del gen en cada paciente, además de utilizar ensayos cuantitativos^{170,171}. Así, la PCR cuantitativa alelo-específica ha demostrado alta sensibilidad y especificidad, pero estas condiciones la convierten en una técnica laboriosa; las publicaciones donde se describe su aplicación en el mieloma suelen incluir un pequeño número de casos.

Esta PCR se ha utilizado principalmente para amplificar los reordenamientos completos VDHI del gen *IGH* y, debido a la frecuencia de mutaciones somáticas en dicho gen, sólo funciona en la mitad de los casos aproximadamente¹³⁹. Incluso tras el estudio de los reordenamientos incompletos DHJ, que presentan una menor frecuencia de mutaciones y que por tanto son preferibles a la hora de diseñar la PCR¹³⁹, la aplicabilidad sigue siendo limitada, funcionando con éxito sólo en un 75% de pacientes en el mejor de los casos¹⁴⁰.

La PCR fluorescente descrita en este trabajo se puede utilizar en más del 90% de los pacientes con MM. En nuestra serie inicial de 79 casos con muestra adecuada para el análisis, 72 casos (91.13%) presentaron reordenamientos incompletos DHJ del gen *IGH*, reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras, o ambos. Esto supone que la aplicabilidad de esta técnica es comparable a la del inmunofenotipo (que en esta serie de pacientes se pudo aplicar al 92% de los casos) y muy superior a la de la PCR cuantitativa alelo-específica.

Hemos encontrado diferencias importantes en la EMR entre pacientes que estaban incluidos en el mismo grupo de respuesta medida por EEF o inmunofijación, como se discutirá más adelante. Aunque en nuestra serie sólo había dos casos de mieloma no secretor, la PCR puede emplearse también en el seguimiento de esta minoría de casos, pues estos mielomas también presentan reordenamientos de los genes de las Igs²⁰⁵.

En comparación con la CMF, la PCR tiene la misma aplicabilidad, presenta muy buena correlación en cuanto a los resultados de EMR y ofrece la ventaja de que el procesamiento de las muestras puede demorarse más allá de 24 horas. Además, al estudiar DNA total, la PCR puede detectar células clonales que no tengan la morfología o el inmunofenotipo de la célula plasmática, esto es, células B maduras clonogénicas; esto puede tener implicaciones clínicas según lo sugerido por algunos autores¹⁸⁸.

Aunque aquí se han realizado todas las PCRs posibles para la detección de clonalidad al diagnóstico, a la vista de los resultados el protocolo puede simplificarse.

Los casos de MM lambda en los que se detectaron reordenamientos del locus de kappa VJ, se acompañaron siempre de reordenamientos de Kde, lo que encaja con la teoría de que esos reordenamientos no eran funcionales y sufrieron posteriores pérdidas del locus kappa. En estos casos se puede asumir por el tamaño que presentaron, que los reordenamientos con el segmento Kde ocurrieron entre el intrón y el segmento Kde, pudiendo quedar así en el mismo alelo el reordenamiento entre V-J y entre Intrón-Kde, no siendo finalmente funcional.

Por otro lado, de los 39 casos válidos de MM kappa, sólo 2 presentaron un reordenamiento del locus lambda y en ningún caso de manera aislada, sino que presentaron también reordenamientos del locus kappa.

Así pues, para estudiar los MM kappa no haría falta estudiar el gen lambda y para estudiar los MM lambda podría realizarse solamente PCR para el reordenamiento Kde, puesto que lo presentan el 88% de los casos.

En cuanto a incluir en el estudio inicial la PCR de los reordenamientos incompletos de la cadena pesada de las Igs, parece recomendable por varias razones: por un lado, aumenta en un 5% la detección de monoclonalidad respecto a lo conseguido con el estudio de las cadenas ligeras (detección de clonalidad por cadenas ligeras del 86.1% y detección de clonalidad incluyendo DHJ del 91.1%); por otro lado, la mayor variabilidad de estos reordenamientos hace que la interpretación de los resultados sea mucho más sencilla y surjan menos dudas a la hora de diferenciarlos de las células B policlonales, sobre todo importante para interpretar la muestra de EMR, donde el clon tumoral puede ser muy pequeño y difícil de detectar. En el caso de que se confirmara que, como parece sugerir este estudio, los pacientes que presentan reordenamientos incompletos tienen una peor SLP, este dato podría ser otro factor pronóstico conocido ya desde el momento del diagnóstico.

Un problema que hemos encontrado en el estudio de los genes de las cadenas ligeras, ha sido la dificultad para la interpretación de los resultados en algunos casos, donde si bien al diagnóstico se podía diferenciar claramente un pico monoclonal en el *genescan*, en el seguimiento de la EMR era más difícil de asegurar, puesto que el tamaño del reordenamiento monoclonal estaba muchas veces incluido entre el resto de picos derivados de la población B policlonal. Hay que señalar que en este trabajo se ha estudiado ADN extraído de sangre total, por lo que cabe esperar que si se trabajara con ADN extraído tras seleccionar las células plasmáticas, se podría solventar este problema.

Pero lo más importante sin duda de este estudio, ha sido encontrar que el resultado de la PCR fluorescente tras el trasplante de MO ha mostrado significado pronóstico, discriminando un subgrupo de pacientes con una mayor SLP. Esto ha sucedido en todos los pacientes en

general, pero también en el grupo de pacientes que había obtenido RC con inmunofijación negativa.

Aunque existen publicaciones previas que no encuentran ningún valor pronóstico con esta técnica, como la de Davies y cols en el 2001¹⁷⁸, su estudio es diferente al descrito aquí. La PCR en ese caso se realizó con oligonucleótidos consenso en los reordenamientos completos de *IGH*; a pesar de comunicar una sensibilidad de la técnica de $1/10^4$, no encontraron diferencias en el pronóstico con respecto al resultado de la inmunofijación, aunque de los 96 pacientes iniciales en el estudio, sólo realizaron la comparación en 14 casos.

Sin embargo, encontramos otros trabajos que han empleado la PCR fluorescente y que sí encontraron datos interesantes: Mitterer y cols¹⁸⁸ estudian aféresis de 19 pacientes tras un primer trasplante, previamente a un segundo; los casos en los que detectaron una población monoclonal (bien en células plasmáticas o bien en precursores B) tuvieron una recaída precoz o una peor respuesta tras el segundo trasplante. Galimberti y cols han publicado también que la erradicación de la EMR medida por PCR fluorescente tras un trasplante autólogo o un trasplante alogénico no mielo-ablativo, tuvo un impacto favorable en la SG a los dos años de seguimiento en un grupo de 20 pacientes. Este grupo obtiene una sensibilidad en la técnica entre $1/10^3$ y $1/10^5$, en función de si el pico monoclonal se encuentra en el centro o en un extremo de la curva de distribución gaussiana de los reordenamientos policlonales.

Cuando hemos comparado el resultado de la PCR fluorescente con los datos de PCR cuantitativa en los pacientes en los que disponíamos de los dos resultados, la PCR fluorescente detectaba todos los casos con enfermedad superior a $1/10^3$, pero sólo alguno en el rango de $1/10^4$. Comparando con los datos de CMF, en el rango de enfermedad de $1/10^3$ se detectaban el 90% de los casos y en el rango de $1/10^4$, el 67.6%.

Esta sensibilidad se ha mostrado suficiente para identificar un grupo de pacientes con diferente pronóstico.

Teniendo en cuenta que con los nuevos tratamientos para el MM se consiguen un elevado número de respuestas completas con inmunofijación negativa y que actualmente la mayoría de los pacientes se incluyen dentro de ensayos clínicos, esta técnica puede ser muy útil para valorar las respuestas a estos nuevos fármacos. Puede que en poco tiempo, el objetivo inmediato del tratamiento deje de ser conseguir respuesta por inmunofijación y se pueda hablar de respuestas moleculares.

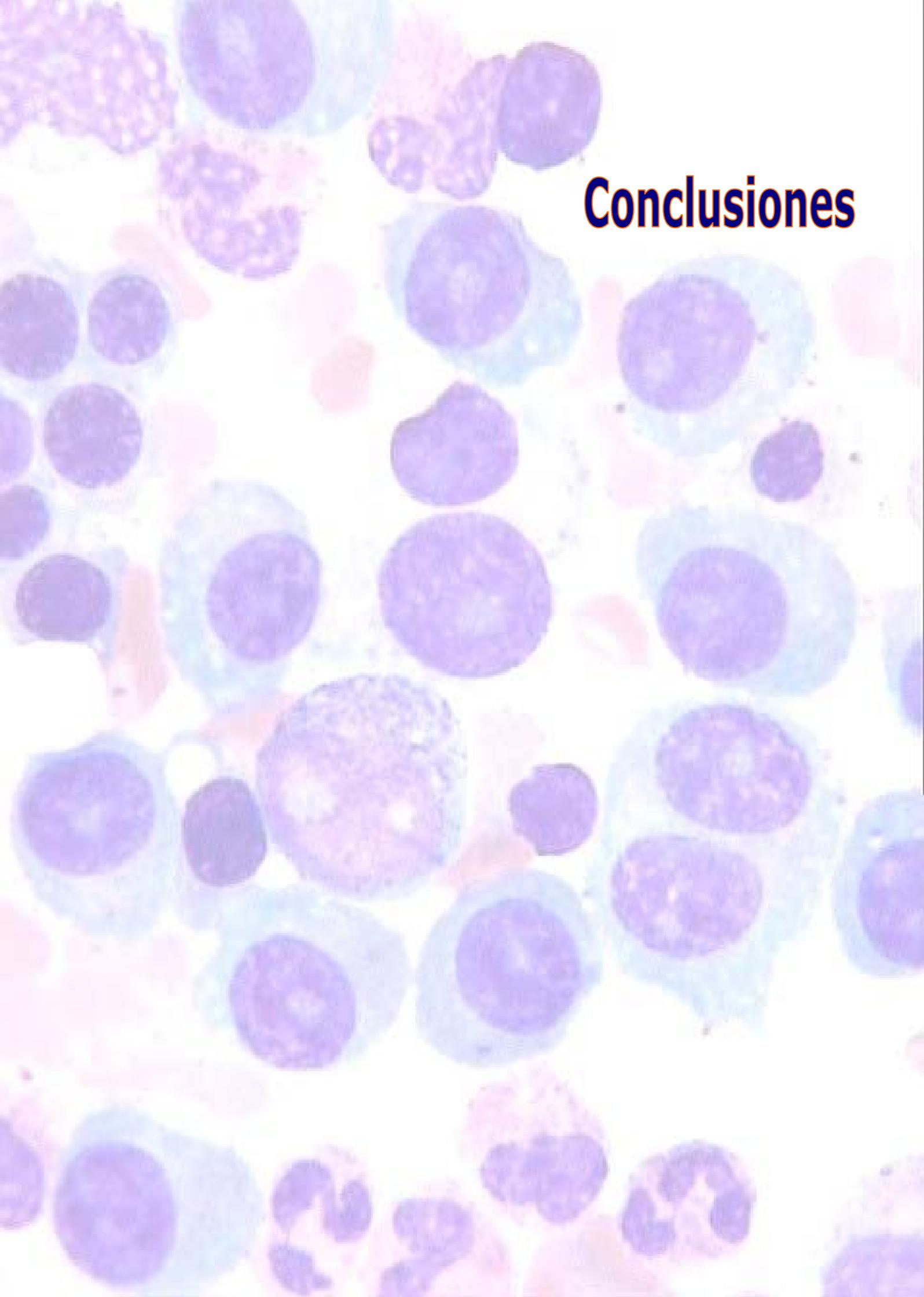
En los análisis multivariantes de supervivencia, la PCR fluorescente fue la única variable que influyó de manera estadísticamente significativa en la SLP en un grupo de 42 enfermos tratados de forma homogénea. En el análisis univariable discriminó claramente dos grupos pronóstico. Según este resultado, los pacientes cuya PCR sigue siendo positiva tras el trasplante, tienen mayor probabilidad de recaer de manera temprana. Esto es válido para todos los pacientes, pero también lo es, siendo aún más interesante, para aquellos

pacientes que alcanzan remisión completa con inmunofijación negativa. Dentro de este grupo de pacientes de "buen pronóstico", la PCR es capaz de diferenciar dos grupos con distinta SLP. Parece, por tanto, que el nivel de sensibilidad obtenido en este estudio, con los reordenamientos incompletos del gen *IGH* y los reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras de las Igs, es adecuado para discriminar un grupo de pacientes con distinta evolución.

Además de estas diferencias encontradas dentro del grupo de pacientes con respuestas completas con inmunofijación negativa, también hemos encontrado pacientes que, a pesar de presentar inmunofijación positiva, la PCR se había hecho negativa durante el seguimiento. Esto ocurrió en seis de 13 casos. Aunque es un número muy pequeño como para analizarlo por separado y sacar conclusiones, cuatro de esos seis pacientes estaban vivos y libres de progresión en el momento del análisis, que fue a los 13 (en dos casos), 41 y 43 meses de seguimiento respectivamente, por lo que parece que estos pacientes tienen un comportamiento semejante al resto de los que presentan PCR negativa, a pesar del resultado de la inmunofijación.

En resumen, la PCR fluorescente con análisis de fragmentos de los genes de las Igs es una técnica sencilla, que se puede aplicar para el diagnóstico de clonalidad en todos los pacientes, que sirve para el seguimiento de la enfermedad en más del 90% de los casos y que tiene valor pronóstico por lo que muestran los resultados de este trabajo preliminar.

Conclusiones



En el 86% de los pacientes con Mieloma Múltiple se detectan reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras de las Igs mediante PCR, lo que contribuye a establecer el diagnóstico de clonalidad en esta patología.

En los pacientes que presentan reordenamientos incompletos del gen de la cadena pesada de la Ig, DHJ, se observa una tendencia a presentar una menor supervivencia libre de progresión.

La PCR cuantitativa en tiempo real del gen *IGH* diseñada con un *primer* consenso auto-hibridante como molécula fluorescente, ofrece similares resultados en la cuantificación de la EMR que la PCR en tiempo real diseñada con sondas TaqMan.

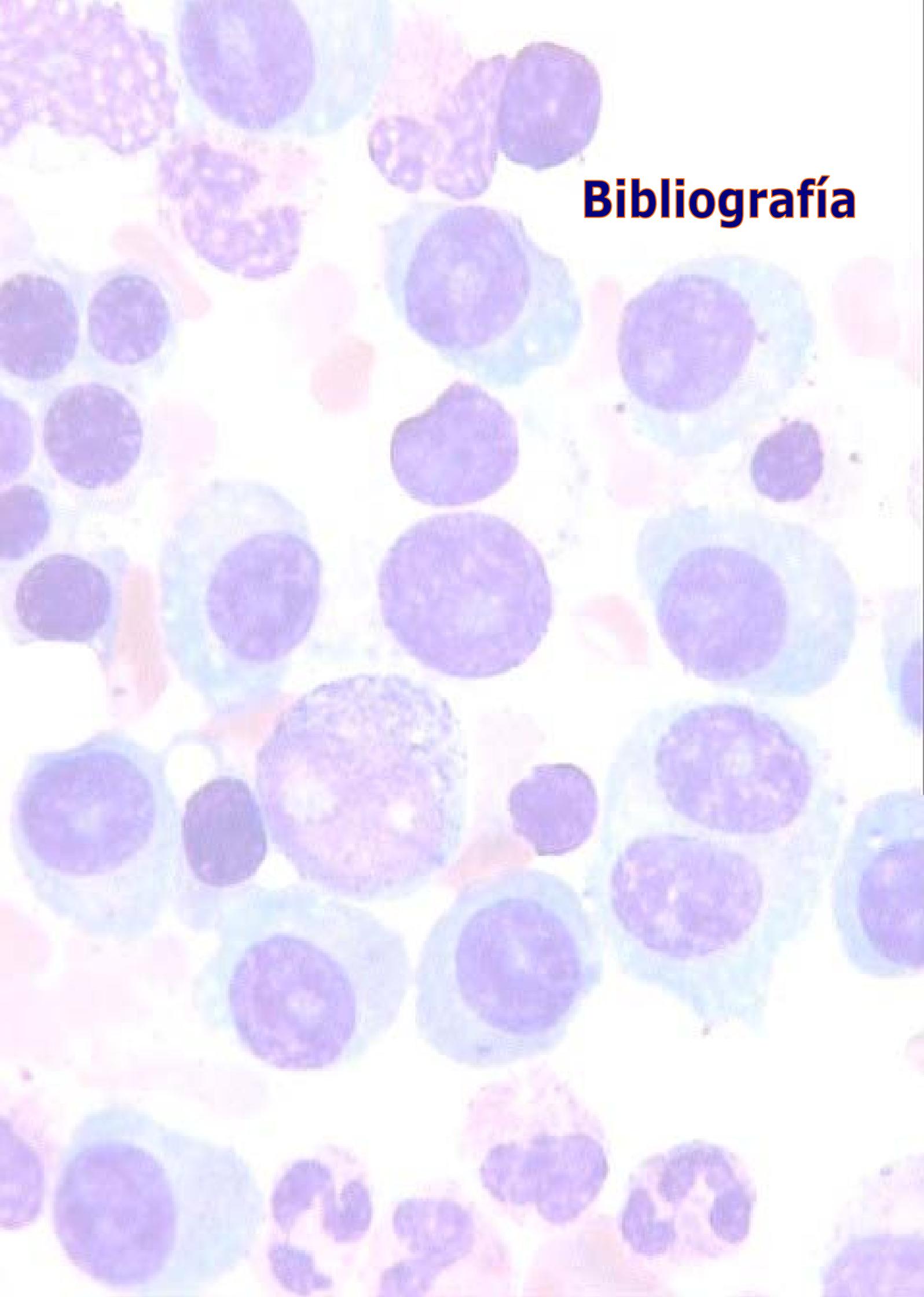
La PCR con *primer* auto-hibridante del gen *IGH* presenta algunas ventajas sobre la PCR con sondas TaqMan, como son el menor coste y la posibilidad de evitar algunos fracasos de la técnica derivados de la existencia de mutaciones somáticas en dicho gen.

La PCR fluorescente de los reordenamientos incompletos DHJ junto con la de los reordenamientos de los genes de las cadenas ligeras de las Igs se puede aplicar en el 91% de los pacientes con Mieloma Múltiple para el diagnóstico de clonalidad y para el seguimiento de la enfermedad.

La PCR fluorescente con análisis de fragmentos (*genescan*) es una técnica rápida y sencilla que permite el empleo rutinario en la clínica y que ofrece resultados similares a la CMF en el estudio de pacientes con mieloma múltiple.

El resultado de la PCR fluorescente tras el trasplante es además una variable que influye de forma significativa en la supervivencia libre de progresión.

Dentro del grupo de enfermos que alcanzan respuesta completa con inmunofijación negativa, los que mantienen la PCR positiva tienen una SLP significativamente menor, por lo que dentro de este grupo de enfermos el resultado de la PCR es capaz de discriminar dos grupos con diferente evolución clínica.

A microscopic image showing a field of cells. The cells have large, round, purple-stained nuclei and pinkish cytoplasm. Some cells are larger and more prominent than others. The background is light pinkish-purple.

Bibliografía

Bibliografía

1. Ramón y Cajal S. Estudios histológicos sobre los tumores epiteliales. *Rev trimest microgr.* 1886;1:83.
2. Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc.* 1975;50:29-40.
3. Paul G Richardson KCA. *Multiple Myeloma.* Chicago, USA: Remedica Publishing; 2004.
4. Riedel DA, Pottern LM. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992;6:225-247.
5. Schull WJ. Late radiation responses in man: current evaluation from results from Hiroshima and Nagasaki. *Adv Space Res.* 1983;3:231-239.
6. Muirhead CR, Goodill AA, Haylock RG, et al. Occupational radiation exposure and mortality: second analysis of the National Registry for Radiation Workers. *J Radiol Prot.* 1999;19:3-26.
7. Johnston JM, Grufferman S, Bourguet CC, Delzell E, DeLong ER, Cohen HJ. Socioeconomic status and risk of multiple myeloma. *J Epidemiol Community Health.* 1985;39:175-178.
8. Kristensen P, Andersen A, Irgens LM, Laake P, Bye AS. Incidence and risk factors of cancer among men and women in Norwegian agriculture. *Scand J Work Environ Health.* 1996;22:14-26.
9. Eriksson M. Rheumatoid arthritis as a risk factor for multiple myeloma: a case-control study. *Eur J Cancer.* 1993;29A:259-263.
10. Hakulinen T, Isomaki H, Knekt P. Rheumatoid arthritis and cancer studies based on linking nationwide registries in Finland. *Am J Med.* 1985;78:29-32.
11. Isomaki HA, Hakulinen T, Joutsenlahti U. Excess risk of lymphomas, leukemia and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. *J Chronic Dis.* 1978;31:691-696.
12. Katusic S, Beard CM, Kurland LT, Weis JW, Bergstralh E. Occurrence of malignant neoplasms in the Rochester, Minnesota, rheumatoid arthritis cohort. *Am J Med.* 1985;78:50-55.
13. Konrad RJ, Kricka LJ, Goodman DB, Goldman J, Silberstein LE. Brief report: myeloma-associated paraprotein directed against the HIV-1 p24 antigen in an HIV-1-seropositive patient. *N Engl J Med.* 1993;328:1817-1819.
14. Loth TS, Perrotta AL, Lima J, Whiteaker RS, Robinson A. Genetic aspects of familial multiple myeloma. *Mil Med.* 1991;156:430-433.
15. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005;23:6333-6338.
16. Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2003;4:557-564.
17. Kuehl WM, Bergsagel PL. Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2005:346-352.
18. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia.* 2006;20:193-199.
19. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003;78:21-33.
20. Abraham RS, Clark RJ, Bryant SC, et al. Correlation of serum immunoglobulin free light chain quantification with urinary Bence Jones protein in light chain myeloma. *Clin Chem.* 2002;48:655-657.
21. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem.* 2002;48:1437-1444.
22. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.* 2003;121:749-757.
23. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer.* 1975;36:842-854.

24. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23:3412-3420. Epub 2005 Apr 3414.
25. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 2004;64:1546-1558.
26. Greipp PR. Prognosis in myeloma. *Mayo Clin Proc*. 1994;69:895-902.
27. Rajkumar SV, Greipp PR. Prognostic factors in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13:1295-1314, xi.
28. Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2005;80:1371-1382.
29. Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, et al. Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. *J Clin Oncol*. 1997;15:2659-2666.
30. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood*. 2001;97:1566-1571.
31. Fassas A, Shaughnessy J, Barlogie B. Cure of myeloma: hype or reality? *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:215-224.
32. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 1998;16:3832-3842.
33. Alexanian R, Barlogie B, Tucker S. VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. *Am J Hematol*. 1990;33:86-89.
34. McElwain TJ, Powles RL. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet*. 1983;2:822-824.
35. Vesole DH, Tricot G, Jagannath S, et al. Autotransplants in multiple myeloma: what have we learned? *Blood*. 1996;88:838-847.
36. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 1996;335:91-97.
37. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003;348:1875-1883.
38. Segeren CM, Sonneveld P, van der Holt B, et al. Overall and event-free survival are not improved by the use of myeloablative therapy following intensified chemotherapy in previously untreated patients with multiple myeloma: a prospective randomized phase 3 study. *Blood*. 2003;101:2144-2151. Epub 2002 Nov 2127.
39. Lahuerta JJ, Grande C, Martinez-Lopez J, et al. Tandem transplants with different high-dose regimens improve the complete remission rates in multiple myeloma. Results of a Grupo Espanol de Síndromes Linfoproliferativos/Trasplante Autologo de Medula Osea phase II trial. *Br J Haematol*. 2003;120:296-303.
40. Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 1999;93:55-65.
41. Attal M, Harousseau JL, Facon T, et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003;349:2495-2502.
42. B. Björkstrand HS, H. Goldschmidt, P. Ljungman, J. Apperley, K. Remes, R. Marcus, T. Barbui, A. Alegre, I. Majolino, K. Carlson, M. Boogaerts, P. Coser, A. Iriando, A. Sureda, S. Lenhoff, A. de Laurenzi, J. Bladé, A. Ferrant, A.H. Goldstone, G. Gahrton. **autologous stem cell transplantation (asct) in multiple myeloma (mm) - the 1999 ebmt registry update**. *Bone Marrow Transplant*. 1999:435a (abstr;suppl 431).
43. Gahrton G, Svensson H, Cavo M, et al. Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983--93 and 1994--8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres. *Br J Haematol*. 2001;113:209-216.
44. Mehta J, Tricot G, Jagannath S, et al. Salvage autologous or allogeneic transplantation for multiple myeloma refractory to or relapsing after a first-line autograft? *Bone Marrow Transplant*. 1998;21:887-892.

45. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, et al. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. Myeloma Aredia Study Group. *J Clin Oncol.* 1998;16:593-602.
46. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. Myeloma Aredia Study Group. *N Engl J Med.* 1996;334:488-493.
47. Osterborg A, Brandberg Y, Molostova V, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human erythropoietin, epoetin Beta, in hematologic malignancies. *J Clin Oncol.* 2002;20:2486-2494.
48. Cotten A, Dewatre F, Cortet B, et al. Percutaneous vertebroplasty for osteolytic metastases and myeloma: effects of the percentage of lesion filling and the leakage of methyl methacrylate at clinical follow-up. *Radiology.* 1996;200:525-530.
49. Dudeney S, Lieberman IH, Reinhardt MK, Hussein M. Kyphoplasty in the treatment of osteolytic vertebral compression fractures as a result of multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2002;20:2382-2387.
50. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:4082-4085.
51. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1994;87:503-508.
52. Barlogie B, Desikan R, Eddlemon P, et al. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood.* 2001;98:492-494.
53. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1999;341:1565-1571.
54. Davies FE, Raje N, Hideshima T, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98:210-216.
55. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood.* 2000;96:2943-2950.
56. Richardson P, Hideshima T, Anderson K. Thalidomide: emerging role in cancer medicine. *Annu Rev Med.* 2002;53:629-657.
57. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med.* 1991;173:699-703.
58. Witzig TE. The role of adhesion receptors in the pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999;13:1127-1143.
59. Alexanian R, Weber D, Anagnostopoulos A, Delasalle K, Wang M, Rankin K. Thalidomide with or without dexamethasone for refractory or relapsing multiple myeloma. *Semin Hematol.* 2003;40:3-7.
60. Barlogie B, Zangari M, Spencer T, et al. Thalidomide in the management of multiple myeloma. *Semin Hematol.* 2001;38:250-259.
61. Rajkumar SV, Dispenzieri A, Fonseca R, et al. Thalidomide for previously untreated indolent or smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* 2001;15:1274-1276.
62. Rajkumar SV, Gertz MA, Lacy MQ, et al. Thalidomide as initial therapy for early-stage myeloma. *Leukemia.* 2003;17:775-779.
63. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, et al. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood.* 2002;100:3063-3067.
64. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science.* 1996;274:1652-1659.
65. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999;59:2615-2622.
66. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood.* 2003;101:1530-1534. Epub 2002 Sep 1526.

67. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:14374-14379. Epub 2002 Oct 14321.
68. Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2002;20:4420-4427.
69. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 2003;348:2609-2617.
70. Grabar P. [Origin and role of serum antibodies and globulins.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1950;79:640-653.
71. Carreras Pico J, Santos Luengo C, Hueto JM. [Proteins and antibodies.]. *Rev Clin Esp*. 1950;38:421-425.
72. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:97-121.
73. Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. *Science*. 1973;180:713-716.
74. Van Noesel CJ, Brouns GS, van Schijndel GM, et al. Comparison of human B cell antigen receptor complexes: membrane-expressed forms of immunoglobulin (Ig)M, IgD, and IgG are associated with structurally related heterodimers. *J Exp Med*. 1992;175:1511-1519.
75. Storb U. Quantitation of immunoglobulin genes by nucleic acid hybridization with RNA from myeloma and spleen microsomes. *J Immunol*. 1972;108:755-764.
76. Storb U. Evidence for multiple immunoglobulin genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974;57:31-38.
77. Dunnick W. Joining immunoglobulin genes. *Nature*. 1979;281:253-254.
78. Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73:3628-3632.
79. Wilson R, Miller J, Storb U. Rearrangement of immunoglobulin genes. *Biochemistry*. 1979;18:5013-5021.
80. Ruiz M, Pallares N, Contet V, Barbi V, Lefranc MP. The human immunoglobulin heavy diversity (IGHD) and joining (IGHJ) segments. *Exp Clin Immunogenet*. 1999;16:173-184.
81. Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:307-310.
82. Sleckman BP, Gorman JR, Alt FW. Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:459-481.
83. Dunnick W, Hertz GZ, Scappino L, Gritzmacher C. DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:365-372.
84. Barbie V, Lefranc MP. The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments. *Exp Clin Immunogenet*. 1998;15:171-183.
85. Schable KF, Zachau HG. The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1993;374:1001-1022.
86. Weichhold GM, Ohnheiser R, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics*. 1993;16:503-511.
87. Graninger WB, Goldman PL, Morton CC, O'Brien SJ, Korsmeyer SJ. The kappa-deleting element. Germline and rearranged, duplicated and dispersed forms. *J Exp Med*. 1988;167:488-501.
88. Fripiat JP, Williams SC, Tomlinson IM, et al. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet*. 1995;4:983-991.
89. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*. 2002;109:S45-55.
90. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302:575-581.
91. Melchers F, Karasuyama H, Haasner D, et al. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today*. 1993;14:60-68.
92. Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:578-584.
93. Lanig H, Bradl H, Jack HM. Three-dimensional modeling of a pre-B-cell receptor. *Mol Immunol*. 2004;40:1263-1272.

94. Sabbattini P, Dillon N. The lambda5-VpreB1 locus--a model system for studying gene regulation during early B cell development. *Semin Immunol.* 2005;17:121-127.
95. Wang LD, Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology.* 2003;110:411-420.
96. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *Embo J.* 1984;3:1209-1219.
97. Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature.* 1985;316:260-262.
98. Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, van Dongen JJ. Detection of immunoglobulin kappa light-chain gene rearrangement patterns by Southern blot analysis. *Leukemia.* 1994;8:2228-2236; discussion 2237-2229.
99. Langerak AW, van Dongen JJ. Recombination in the human IGK locus. *Crit Rev Immunol.* 2006;26:23-42.
100. Hiom K, Gellert M. A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. *Cell.* 1997;88:65-72.
101. McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, et al. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell.* 1995;83:387-395.
102. Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell.* 1993;72:131-142.
103. Grawunder U, West RB, Lieber MR. Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:172-180.
104. Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:8076-8081.
105. Nussenzweig A, Chen C, da Costa Soares V, et al. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature.* 1996;382:551-555.
106. Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol.* 1994;56:27-150.
107. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* 1976;26:119-121.
108. Jerne NK. The generative grammar of the immune system. *Science.* 1985;229:1057-1059.
109. Franklin A, Blanden RV. On the molecular mechanism of somatic hypermutation of rearranged immunoglobulin genes. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:557-567.
110. Stamatopoulos K, Belessi C, Papadaki T, et al. Somatic hypermutation patterns in germinal center B cell malignancies. *Hematology.* 2003;8:319-328.
111. Lebecque SG, Gearhart PJ. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med.* 1990;172:1717-1727.
112. Goossens T, Klein U, Kuppers R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:2463-2468.
113. Chui YL, Lozano F, Jarvis JM, Pannell R, Milstein C. A reporter gene to analyse the hypermutation of immunoglobulin genes. *J Mol Biol.* 1995;249:555-563.
114. McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:3180-3184.
115. Neuberger MS, Milstein C. Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:248-254.
116. Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:199-205.
117. Stavnezer J. Antibody class switching. *Adv Immunol.* 1996;61:79-146.
118. Esser C, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:717-735.
119. Iwasato T, Shimizu A, Honjo T, Yamagishi H. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell.* 1990;62:143-149.

120. Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, Breit TM, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia*. 1993;7:2045-2053.
121. Gonzalez D, Balanzategui A, Garcia-Sanz R, et al. Incomplete DJH rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: immunobiological characteristics and clinical implications. *Leukemia*. 2003;17:1398-1403.
122. Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, Langerak AW, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica*. 1999;84:328-335.
123. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1996;23:33-41.
124. Smith L, Barlogie B, Alexanian R. Biclonal and hypodiploid multiple myeloma. *Am J Med*. 1986;80:841-843.
125. Osterborg A, Mellstedt H. Monoclonal and biclonal immunoglobulin-producing disorders. *Eur J Haematol Suppl*. 1989;51:11-18.
126. Gonzalez D, Garcia-Sanz R. Incomplete DJH rearrangements. *Methods Mol Med*. 2005;113:165-173.
127. Hadzidimitriou A, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Immunoglobulin genes in multiple myeloma: expressed and non-expressed repertoires, heavy and light chain pairings and somatic mutation patterns in a series of 101 cases. *Haematologica*. 2006;91:781-787.
128. Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol*. 1995;155:190-202.
129. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest*. 1997;99:2488-2501.
130. Rettig MB, Vescio RA, Cao J, et al. VH gene usage in multiple myeloma: complete absence of the VH4.21 (VH4-34) gene. *Blood*. 1996;87:2846-2852.
131. Pugh-Bernard AE, Silverman GJ, Cappione AJ, et al. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. *J Clin Invest*. 2001;108:1061-1070.
132. Vescio RA, Cao J, Hong CH, et al. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J Immunol*. 1995;155:2487-2497.
133. Kiyoi H, Naito K, Ohno R, Naoe T. Comparable gene structure of the immunoglobulin heavy chain variable region between multiple myeloma and normal bone marrow lymphocytes. *Leukemia*. 1996;10:1804-1812.
134. Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, et al. Origin and diversification of the clonogenic cell in multiple myeloma: lessons from the immunoglobulin repertoire. *Leukemia*. 2000;14:1718-1726.
135. Ralph QM, Brisco MJ, Joshua DE, Brown R, Gibson J, Morley AA. Advancement of multiple myeloma from diagnosis through plateau phase to progression does not involve a new B-cell clone: evidence from the Ig heavy chain gene. *Blood*. 1993;82:202-206.
136. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. *Blood*. 1997;89:219-226.
137. Milstein C, Neuberger MS, Staden R. Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8791-8794.
138. Wilson PC, de Bouteiller O, Liu YJ, et al. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med*. 1998;187:59-70.
139. Gonzalez D, Gonzalez M, Alonso ME, et al. Incomplete DJH rearrangements as a novel tumor target for minimal residual disease quantitation in multiple myeloma using real-time PCR. *Leukemia*. 2003;17:1051-1057.
140. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-

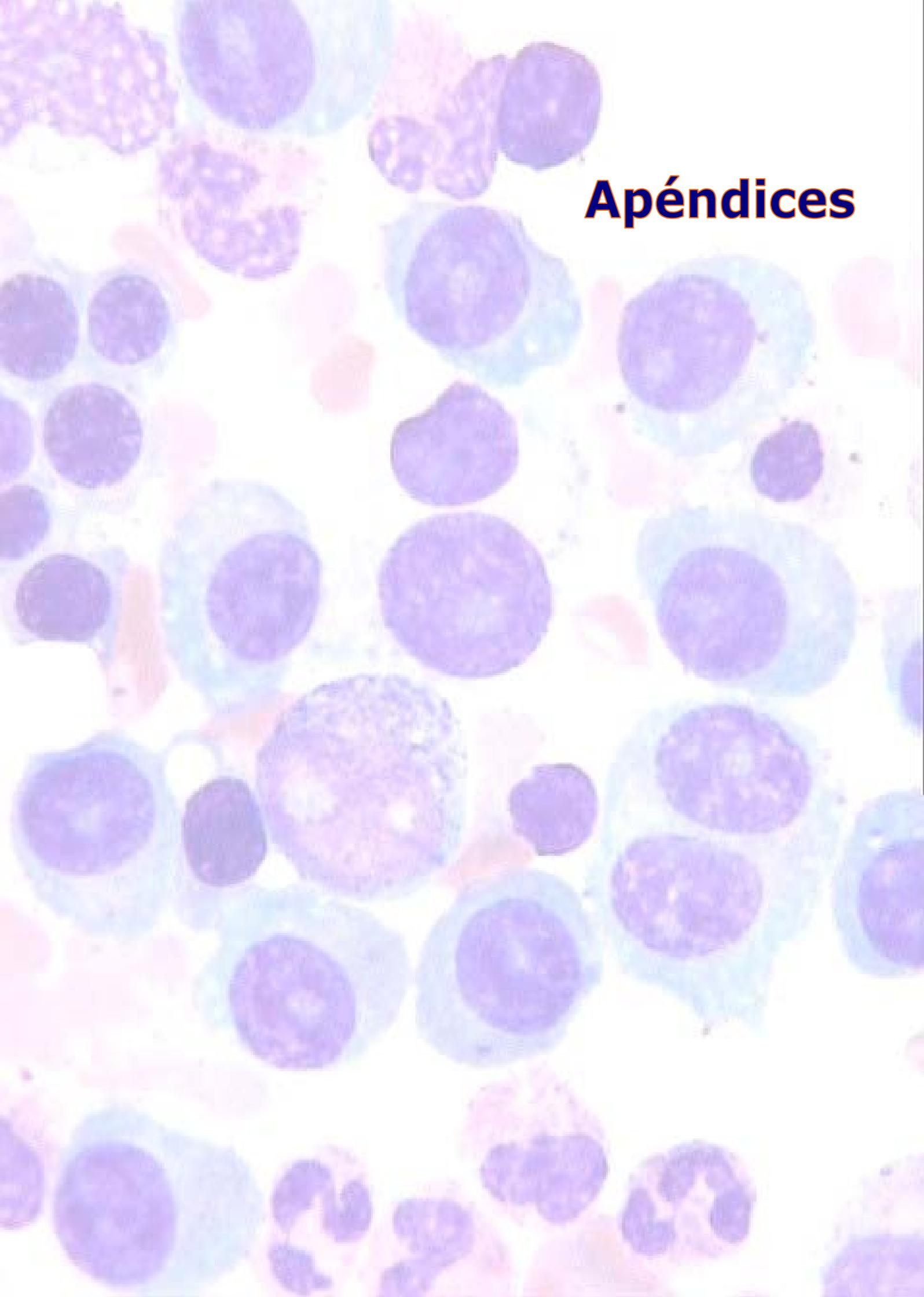
- time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90:1365-1372.
141. Cannell PK, Amlot P, Attard M, Hoffbrand AV, Foroni L. Variable kappa gene rearrangement in lymphoproliferative disorders: an analysis of V kappa gene usage, VJ joining and somatic mutation. *Leukemia*. 1994;8:1139-1145.
142. Kiyoi H, Naito K, Ohno R, Saito H, Naoe T. Characterization of the immunoglobulin light chain variable region gene expressed in multiple myeloma. *Leukemia*. 1998;12:601-609.
143. Kosmas C, Stamatopoulos K, Papadaki T, et al. Somatic hypermutation of immunoglobulin variable region genes: focus on follicular lymphoma and multiple myeloma. *Immunol Rev*. 1998;162:281-292.
144. Kosmas C, Viniou NA, Stamatopoulos K, et al. Analysis of the kappa light chain variable region in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1996;94:306-317.
145. Wagner SD, Martinelli V, Luzzatto L. Similar patterns of V kappa gene usage but different degrees of somatic mutation in hairy cell leukemia, prolymphocytic leukemia, Waldenstrom's macroglobulinemia, and myeloma. *Blood*. 1994;83:3647-3653.
146. Brauning A, Goossens T, Rajewsky K, Kuppers R. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol*. 2001;31:3631-3637.
147. Halverson R, Torres RM, Pelanda R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol*. 2004;5:645-650. Epub 2004 May 2023.
148. Retter MW, Nemazee D. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med*. 1998;188:1231-1238.
149. Han S, Zheng B, Schatz DG, Spanopoulou E, Kelsoe G. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science*. 1996;274:2094-2097.
150. Kelsoe G. V(D)J hypermutation and receptor revision: coloring outside the lines. *Curr Opin Immunol*. 1999;11:70-75.
151. Nemazee D, Weigert M. Revising B cell receptors. *J Exp Med*. 2000;191:1813-1817.
152. Perfetti V, Vignarelli MC, Palladini G, Navazza V, Giachino C, Merlini G. Insights into the regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements via analysis of the kappa light chain locus in lambda myeloma. *Immunology*. 2004;112:420-427.
153. van der Burg M, Tumkaya T, Boerma M, de Bruin-Versteeg S, Langerak AW, van Dongen JJ. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood*. 2001;97:1001-1008.
154. Stevenson F, Sahota S, Zhu D, et al. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev*. 1998;162:247-259.
155. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta*. 1991;198:1-91.
156. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*. 1997;11:2192-2199.
157. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann 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;17:2257-2317.
158. Linke B, Bolz I, Fayyazi A, et al. Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia*. 1997;11:1055-1062.
159. Lion T. Minimal residual disease. *Curr Opin Hematol*. 1999;6:406-411.
160. Billadeau D, Quam L, Thomas W, et al. Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood*. 1992;80:1818-1824.
161. Corradini P, Voena C, Astolfi M, et al. High-dose sequential chemoradiotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. *Blood*. 1995;85:1596-1602.

-
162. Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e37.
163. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Salama P, Ayala R, Bautista JM. The use of fluorescent molecular beacons in real time PCR of IgH gene rearrangements for quantitative evaluation of multiple myeloma. *Clin Lab Haematol.* 2004;26:31-35.
164. Li AH, Forestier E, Rosenquist R, Roos G. Minimal residual disease quantification in childhood acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction using the SYBR green dye. *Exp Hematol.* 2002;30:1170-1177.
165. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 2003;17:1013-1034.
166. Donovan JW, Ladetto M, Zou G, et al. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia [In Process Citation]. *Blood.* 2000;95:2651-2658.
167. Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Res.* 1998;58:3957-3964.
168. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia.* 1998;12:2006-2014.
169. Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N, et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia.* 2000;14:324-328.
170. Rasmussen T, Poulsen TS, Honore L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Hematol.* 2000;28:1039-1045.
171. Ladetto M, Donovan JW, Harig S, et al. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6:241-253.
172. Cremer FW, Ehrbrecht E, Kiel K, et al. Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive parameter in patients with multiple myeloma [In Process Citation]. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:851-858.
173. Bakkus MH, Bouko Y, Samson D, et al. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2004;126:665-674.
174. Fenk R, Ak M, Kobbe G, et al. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica.* 2004;89:557-566.
175. Galimberti S, Brizzi F, Mameli M, Petrini M. An advantageous method to evaluate IgH rearrangement and its role in minimal residual disease detection. *Leuk Res.* 1999;23:921-929.
176. Gleissner B, Maurer J, Sindram A, Reinhard R, Thiel E. Comparison of ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis and automated fragment analysis for evaluation of IgH gene products. *Leuk Res.* 2001;25:769-774.
177. Novella E, Giaretta I, Elice F, et al. Fluorescent polymerase chain reaction and capillary electrophoresis for IgH rearrangement and minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. *Haematologica.* 2002;87:1157-1164.
178. Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC, et al. The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2001;112:814-819.
179. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1999;107:121-131.

180. Li JL, Liu YR, Chang Y, Fu JY, Chen SS. [Immunophenotypic characteristics of multiple myeloma cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2002;10:226-228.
181. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004;121:482-488.
182. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002;99:1853-1856.
183. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 1997;90(6):2465-70:2465-2470.
184. Bird JM, Russell NH, Samson D. Minimal residual disease after bone marrow transplantation for multiple myeloma: evidence for cure in long-term survivors. *Bone Marrow Transplant*. 1993;12:651-654.
185. Bjorkstrand B, Ljungman P, Bird JM, Samson D, Gahrton G. Double high-dose chemoradiotherapy with autologous stem cell transplantation can induce molecular remissions in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:367-371.
186. Swedin A, Lenhoff S, Olofsson T, Thuresson B, Westin J. Clinical utility of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement identification for tumour cell detection in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1998;103:1145-1151.
187. Corradini P, Voena C, Tarella C, et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol*. 1999;17:208-215.
188. Mitterer M, Oduncu F, Lanthaler AJ, et al. The relationship between monoclonal myeloma precursor B cells in the peripheral blood stem cell harvests and the clinical response of multiple myeloma patients. *Br J Haematol*. 1999;106:737-743.
189. Martinelli G, Terragna C, Lemoli RM, et al. Clinical and molecular follow-up by amplification of the CDR-III IgH region in multiple myeloma patients after autologous transplantation of hematopoietic CD34+ stem cells. *Haematologica*. 1999;84:397-404.
190. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, et al. Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2000;18:2273-2281.
191. Willems P, Verhagen O, Segeren C, et al. Consensus strategy to quantitate malignant cells in myeloma patients is validated in a multicenter study. *Blood*. 2000;96:63-70.
192. Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al. The detection of contaminating clonal cells in apheresis products is related to response and outcome in multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia*. 2000;14:1493-1499.
193. Galimberti S, Benedetti E, Morabito F, et al. Prognostic role of minimal residual disease in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation. *Leuk Res*. 2005;29:961-966.
194. Proposed guidelines for protocol studies. I. Introduction. II. Plasma cell myeloma. 3. Chronic lymphocytic leukemia. IV. Chronic granulocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep [3]*. 1973;4:141-173.
195. Blade 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;102:1115-1123.
196. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000;14:1426-1435.
197. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
198. Schutz E, von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques*. 1999;27:1218-1222, 1224.

-
199. Gonzalez D, Gonzalez M, Balanzategui A, et al. Molecular characteristics and gene segment usage in IGH gene rearrangements in multiple myeloma. *Haematologica*. 2005;90:906-913.
200. Ladetto M, Omede P, Sametti S, et al. Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Hematol*. 2002;30:529-536.
201. Bruggemann M, Droese J, Bolz I, et al. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2000;14:1419-1425.
202. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998;352:1731-1738.
203. Chen R, Huang W, Lin Z, Zhou Z, Yu H, Zhu D. Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine transmissible gastroenteritis virus. *J Virol Methods*. 2004;122:57-61.
204. Lowe B, Avila HA, Bloom FR, Gleeson M, Kusser W. Quantitation of gene expression in neural precursors by reverse-transcription polymerase chain reaction using self-quenched, fluorogenic primers. *Anal Biochem*. 2003;315:95-105.
205. Szczepanski T, van 't Veer MB, Wolvers-Tettero IL, Langerak AW, van Dongen JJ. Molecular features responsible for the absence of immunoglobulin heavy chain protein synthesis in an IgH(-) subgroup of multiple myeloma. *Blood*. 2000;96:1087-1093.

Apéndices



1. Minimal Residual Disease Monitorization in Multiple Myeloma Patients Achieving Complete Response after Autologous Stem Cell Transplantation: A comparative study between ASO Real Time Quantitative PCR and Flow Cytometry

2. Application of self-quenched JH consensus primers for real-time quantitative PCR of IgH gene to minimal residual disease evaluation in Multiple Myeloma



Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry

María Eugenia Sarasquete
Ramón García-Sanz
David González
Joaquín Martínez
Gema Mateo
Pilar Martínez
José María Ribera
José Mariano Hernández
Juan José Lahuerta
Alberto Orfão
Marcos González
Jesus F. San Miguel

Background and Objectives. Minimal residual disease (MRD) studies are useful in multiple myeloma (MM). However, the definition of the best technique and clinical utility are still unresolved issues. The aim of this study was to analyze and compare the clinical utility of MRD studies in MM with two different techniques: allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative PCR (ASO-RQ-PCR), and flow cytometry (FCM).

Design and Methods. Bone marrow samples from 32 MM patients who had achieved complete response after transplantation were evaluated by ASO-RQ-PCR, using TaqMan technology, and multiparametric FCM.

Results. ASO-RQ-PCR was only applicable in 75% of patients for a variety of technical reasons, while FCM was applicable in up to 90%. Therefore, simultaneous PCR/FCM analysis was possible in only 24 patients. The number of residual tumor cells identified by both techniques was very similar (mean=0.29%, range=0.001-1.61%, correlation coefficient=0.861). However, RQ-PCR was able to detect residual myelomatous cells in 17 patients while FCM only did so in 11; thus, 6 cases were FCM negative but PCR positive, all of them displaying a very low number of clonal cells (median=0.014%, range=0.001-0.11). Using an MRD threshold of 0.01% (10^{-4}) two risk groups with significantly different progression-free survival could be identified by either PCR (34 vs. 15m, $p=0.04$) or FCM (27 vs. 10m, $p=0.05$).

Interpretations and Conclusions. Although MRD evaluation by ASO-RQ-PCR is slightly more sensitive and specific than FCM, it is applicable in a lower proportion of MM patients and is more time-consuming, while both techniques provide similar prognostic information.

Key words: multiple myeloma, autologous stem cell transplantation, minimal residual disease, quantitative ASO-PCR, flow cytometry.

Haematologica 2005; 90:1365-1372

©2005 Ferrata Storti Foundation

From the Grupo Español de Mieloma (GEM-PETHEMA), Red Española de Mieloma (G03/136), Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Universidad de Salamanca, Spain.

Correspondence:
Ramón García-Sanz, Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Paseo de San Vicente, 58-182, Salamanca, 37007, Spain.
E-mail: rgarcias@usal.es

Multiple myeloma (MM) is a malignant disease characterized by an increased number of clonal plasma cells in the bone marrow. High-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation is routinely used for the treatment of young MM patients and produces a high rate of complete remissions.¹⁻³ Although variable, the duration of such responses does not usually exceed three years and disease recurrence still remains the leading cause of death. This is due to the persistence of residual tumor cells, known as minimal residual disease (MRD), responsible for tumor relapse. In recent years, the study of MRD by flow cytometry or polymerase chain reaction (PCR) has proven to be of great value in predicting clinical outcome in different hematologic malignancies.⁴⁻⁷ In MM however, both the clinical utility and the most suitable method for MRD detection remain controversial.

Investigation of MRD by qualitative PCR

of VDJH rearrangements with allelic-specific oligonucleotides (ASO-PCR) has shown prognostic value in MM patients after autologous and allogeneic stem cell transplantation.⁸⁻¹⁰ Nevertheless, some difficulties have hampered the use of this technique. Firstly, it is applicable in only two-thirds of cases because of the lack of clonal targets for amplification, caused by the presence of somatic mutations in IgH genes. In addition, the clinical utility of qualitative PCR in the setting of autologous stem cell transplantation has been modest,^{8,9} because the sensitivity is so high that most cases remain PCR-positive regardless of their different outcomes.^{11,12} Different strategies have been suggested to resolve these problems. The first problem could be overcome by using additional targets such as incomplete DJH rearrangements.¹³ For the second problem, the use of real-time quantitative PCR with the same strategy (ASO-RQ-PCR) could be the best alternative, since this has provided accurate quantification of MRD levels.

However, although several groups have published technical results with real-time PCR,¹⁴⁻¹⁷ the clinical application of this methodology is still relatively limited in MM since only three studies are currently available and all included less than twenty patients who had achieved complete remission.¹⁸⁻²⁰

Very recently, multiparametric flow cytometry has been shown to be an attractive alternative approach to MRD monitoring in MM. This technique not only allows the number of plasma cells to be monitored but also distinguishes between myelomatous and normal plasma cells,²¹ facilitating the monitoring of global changes in the plasma cell compartment of MM patients. As a disadvantage, the myeloma clone includes not only plasma cells but also less mature B cells, which are immunophenotypically different from plasma cells.²² Nevertheless, dilution experiments have shown that immunophenotyping has a sensitivity of 10^{-4} to 10^{-5} , with several reports demonstrating its clinical utility in the setting of autologous transplantation.^{23,24}

The aim of this study was to evaluate and compare the clinical value of measuring residual myeloma disease by ASO-RQ-PCR and flow cytometry in a series of uniformly treated MM patients who had achieved complete remission or near complete remission according to slightly modified EBMT criteria.

Design and Methods

Patients and response criteria

Patients included in this study had been treated with the GEMM2000 protocol designed by the Spanish GEM-PETHEMA group (*Grupo Español de Mieloma - Programa Español para el Tratamiento de Hemopatías Malignas*). This protocol consists of four cycles of VBCMP/VBAD followed by high dose melphalan and autologous peripheral blood stem cell transplantation. Patients not achieving complete remission (CR) with this scheme received a second transplant of either autologous or allogeneic stem cells following reduced intensity-conditioning. Response to treatment was assessed according to slightly modified EBMT criteria.²⁵ A complete response was defined by a negative immunofixation test in serum and urine (confirmed in two different samples obtained at an interval of 6 weeks), absence of soft-tissue plasmacytomas, a normal serum calcium concentration, stable skeletal disease, and less than 5% plasma cells (PC) in the bone marrow. A near complete remission was defined by the absence of myeloma protein on electrophoresis, but positive immunofixation and <5% plasma cells in bone marrow. Patients were eligible for inclusion in this MRD study if they had achieved complete remission or near-complete remission after the first transplant and bone

marrow samples taken at diagnosis and 3 months after the transplant were available.

ASO-RQ-PCR

Sampling and DNA extraction

Genomic DNA from bone marrow samples at the time of diagnosis and 3 months after transplant was isolated using DNAzol reagent (MRC, Cincinnati, Ohio, USA). DNA was stored at -20°C .

PCR amplification and analysis of the IgH genes

Complete VDJH rearrangements were amplified using three multiplexed tubes containing VH-family-specific primers for FR1, FR2 and FR3 primers with a JH consensus primer. Amplification of incomplete DJH rearrangements was performed in two different tubes, one containing family-specific primers for DH1 to DH6 and the second tube with the DH7 primer, together with a consensus JH. Primers were newly designed and tested during the BIOMED-2 Concerted Action.²⁶ All reactions were carried out in 50 μL containing 0.1 μg of DNA samples and 10 pm of each primer. For heteroduplex analysis, PCR products were denatured at 94°C for 10 min and then cooled at 4°C for 60 min to induce duplex formation.²⁷ The hetero and/or homoduplexes generated were rapidly loaded on a 10% non-denaturing polyacrylamide gel in 1 \times TAE buffer, run at room temperature and visualized by ethidium bromide staining. In addition, the clonal nature of the PCR fragments was confirmed by Gene-Scanning analysis according to well-known procedures.²⁸

Sequencing and CDR3 identification

Clonal products were eluted from the polyacrylamide gel and directly sequenced in an automated ABI 377 sequencer using Big-Dye terminators (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In order to avoid nucleotide misinterpretations because of Taq errors, all products were sequenced twice using 5'VH, DH primers or 3'JH primers. Germline VH, DH and JH segments from complete VDJH rearrangements were identified by comparison with the V Base²⁹ <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT> and IGMT database^{30,31} <http://imgt.cines.fr> using on-line DNAPLOT (MRC Center for Protein Engineering). DH and JH germline segments from incomplete DJH rearrangements were identified using the BLAST search in the DH-JH germline locus sequence (accession number EMB/X97051, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Once the segments had been identified, the N-Region was highlighted for the ASO-primer design because of its high specificity for each rearrangement.

Design of the ASO-primer

All ASO-primers were designed with Primer Express version 1.0 (PE Biosystems) and OLIGO 6.1 software

(Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA) complementary to the VH-DH or DH-JH junctional regions and complied with the following recommendations: (i) primer-dimer formation must have a ΔG lower than -3.5 kcal/mol, (ii) the ASO primer should not have GC-rich 3' ends, (iii) melting temperature differences between the ASO-primer and its corresponding JH primer must be lower than 2°C, (iv) amplicon size must always be lower than 170 pb, and v) the melting temperature of the probe must be 5-10°C higher than that of the primers to ensure strong binding of the probe during the annealing phase.³²

Evaluation of ASO-primer design

A qualitative PCR with the ASO-primer and the respective JH intronic primer was carried out with several dilutions of the patient's diagnostic sample as a positive control and buffy-coat DNA from healthy donors as a negative control. A single band of the expected size should be present in the patient's samples whereas nothing should appear in the buffy coat sample. In addition, dilutions of the original diagnostic sample had to provide the clonal band at the dilution of at least 10^{-3} - 10^{-4} (see below).

Real-time quantitative PCR (RQ-PCR)

For the RQ-PCR, the method of Verhagen *et al.* was employed.³³ This method includes the use of an ASO forward primer, together with one out of six reverse primers complementary to the intron (JH1-JH6) and one out of three JH consensus probes (JH 1-2-4-5, JH3 and JH6) depending on the specific JH segment used in the rearrangement. Only cases meeting the criteria for matching primers and probes according to Gonzalez *et al.*¹⁶ were included in the study. No specific probes were considered because this would imply an unacceptable increase in the costs. All reactions were carried out in a 25 μ L final volume, containing 12.5 μ L of 2 \times Taqman Universal Mastermix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), including AmpErase uracil N-glycosylase (UNG), 300 nM of each primer, 200 nM of probe, and 600 ng of genomic DNA.

The two-step amplification protocol consisted of a 2 min incubation step at 50°C to digest PCR contamination products via UNG, 10 min at 95°C (inactivation of UNG, denaturation of target DNA, and activation of AmpliTaq Gold), followed by target amplification by 50 cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 59-63°C (depending on each particular ASO-primer). Each ASO-primer was tested at different annealing temperatures, ranging from 59-63°C, in order to determine the maximum sensitivity and specificity for each particular assay. Fluorescence data were collected during the annealing-extension phase of every cycle, using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System containing a 96-well thermal cycler (PE Biosystems). All RQ-PCR experi-

ments were performed in duplicate, except MRD samples that were processed in triplicate. The quality and quantity of the DNA were assessed by RQ-PCR of the albumin gene as previously described.³⁴

Standard curve evaluation

To determine the amplification efficiency and the sensitivity of the method, diagnostic DNA was diluted in 10-fold steps into DNA from normal mononuclear cells down to 10^5 . The dilution series was subjected to RQ-PCR analysis together with appropriate positive and negative controls (water and mononuclear cells). The maximal sensitivity was defined as the last dilution of diagnostic DNA in which at least one of the duplicate dilution samples resulted in a positive fluorescent signal with a maximal cycle threshold (CT) value of 40 cycles.³³ To consider an experiment as acceptable, the Y-intercept had to be <40 and the slope higher than 3.0 and lower than 3.7. Based on the assumption that each cell contains 6pg of DNA, the addition of 600ng of DNA in each tube was considered to be equivalent to the addition of 100.000 cells. Calculations were corrected according to the percentage of tumor cells by flow cytometry. The maximal theoretical sensitivity was calculated to be between 10^{-5} and 5×10^{-5} (1 and 5 copies per tube, respectively).

Quantification of MRD by flow cytometry analysis

The number of plasma cells present in the bone marrow at diagnosis was assessed by flow cytometry using a validated immunophenotypic approach.²³ The same sample used for molecular studies was used for immunophenotypic analyses. The panel of monoclonal antibodies in quadruple combinations included: CD38/56/19/45, CD138/28/33/38 and CD20/117/138/38. Plasma cell phenotypic aberrations were identified at diagnosis and then used as patient-specific probes for follow-up analyses.

To increase the level of sensitivity of the technique, we used a two-step acquisition procedure in which up to 2×10^6 cells were acquired through a specific *live-gate* drawn on SSC/CD38⁺⁺⁺/CD138⁺ cells. In all cases, an FL1/FL2/FL3 isotype-matched negative control CD38 for antigen-positive cells was used to evaluate specifically the autofluorescence level of the plasma cells.²³ For data analysis, Paint-A-Gate software (Becton Dickinson, San José, CA, USA) was used according to well established methods.³⁵ The main variable evaluated in this study was the percentage of phenotypically aberrant MM-plasma cells in the whole bone marrow.

Statistical methods

To estimate the statistical significance of the differences observed between means, the Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests were employed, using the SPSS statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Table 1. Clinical and biological characteristics of the patients.

	At diagnosis N=24	At transplant N=24
Age (years)	58±9.8	59±9.7
Hemoglobin (g/dL)	10.3±2.5	11.4±1.3
Platelets (x10 ⁹ /L)	204±718	223±12
Leukocytes (x10 ⁹ /L)	6.7±2	7±2.3
Creatinine >2 mg/dL	22%	4%
ECOG score ≥ 2	59%	8%
Extramedullary involvement	16%	0%
Presence of lytic lesions	79%	75%
Hemoglobin <8.5 g/dL	30%	17%
Lactate dehydrogenase >460 U/L	0%	0%
Albumin <3.5 g/dL	50%	29%
Monoclonal proteinuria	54%	0%
Calcium >11.0 mg/dL	18%	0%
β ₂ -microglobulin > 6 mg/mL	29%	4%
C-reactive protein > 6mg/dL	19%	0%
13q monosomy (assessed by FISH)	47%	NA
S phase plasma cells >1.8%	29%	NA

Response Status	Pre-Transplant	Post-Transplant
Complete remission, negative IFX	17%	58%
Complete remission, positive IFX	13%	41%
Other	70%	0%

Results expressed as median±standard deviation. IFX, immunofixation.

The χ^2 test (cross-tabs, SPSS) was used for comparison of dichotomous variables between groups. The relationship between percentages of plasma cells detected by flow cytometry and RQ-PCR was evaluated through linear regression (Regression SPSS).

Survival curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier, and compared using the log-rank test (survival SPSS). Those variables displaying a significant association with survival in these analyses ($p < 0.05$) or those for which prior studies had demonstrated a prognostic value were included in a multiple regression analysis (Cox regression, SPSS). The model was tested both by including the variables in a continuous fashion (continuous model) and by grouping them into categories (dichotomous model). This analysis was carried out using the *ENTER method*, since the stepwise method could not be applied due to the scanty number of events occurring in this series.

Results

Patients' characteristics and applicability of techniques

Fifty-three patients were initially included in the study (all had achieved complete or near-complete remission following autologous peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow samples at diag-

nosis and 3 months post-transplant were available for all of them). Five were directly excluded from the study because they did not display an immunophenotypic pattern different from that of normal plasma cells, and therefore could not be used for immunophenotypic MRD investigation (90% applicability). For the remaining 48 patients, 16 were lost due to pre-analytical problems: four cases due to degraded diagnostic DNA, three because of insufficient diagnostic DNA to construct the standard curve, and nine because of insufficient tumor cells at diagnosis to provide a good PCR product to be sequenced. Only 24 of the 32 cases remaining fitted the criteria to be valid in molecular studies for MRD investigations (applicability of 75%). The reasons for withdrawing these eight cases were that three did not amplify any IgH rearrangement, three lacked a long enough N-region to design an ASO-primer, and two had mutations either in the probe or in the JH intronic primer. Alternative primers using the somatically hypermutated region always provided non-specific amplifications in healthy samples. As shown in Table 1, the patients' characteristics were similar to those reported for other transplant series with good response. It should be noted that all but one patient had stage II/III MM.

ASO-RQ-PCR and flow cytometry

For ASO-RQ-PCR analysis, a VD_JH rearrangement was used in 10 cases and a DJ_H rearrangement in the remaining 14. Clonotypic cells were undetectable by RQ-PCR in 7 patients – MRD-negative cases, while in the remaining 17 patients (71%) $\geq 0.001\%$ tumor cells (≥ 1 myelomatous cell per 10^5 residual normal hematopoietic cells) could be detected (MRD-positive). MRD status detected by RQ-PCR correlated with the immunofixation status. Thus, when immunofixation was used to define complete remission, 62% of patients had results consistent with those of RQ-PCR studies, but 34% of patients were found to have positive MRD by RQ-PCR but were immunofixation negative; on the other hand, there was one patient (4%) who was MRD-negative by RQ-PCR but did have a positive immunofixation test (Figure 1A). It is plausible that the immunofixation would have changed to a negative result later. Unfortunately, this patient died from delayed veno-occlusive disease four months after transplant. The median percentage of tumor cells present in the bone marrow three months after transplant in MM patients achieving complete remission was 0.043%, with a range between 0 and 1.61 (mean 0.29%, SD 0.51%).

In order to discriminate between patients with high or low MRD at this time point, we established a threshold level of 0.01% (presence of more or less than one tumor cell within 10^4 normal cells): eleven patients had MRD $\leq 0.01\%$ (low MRD) while thirteen had $>0.01\%$

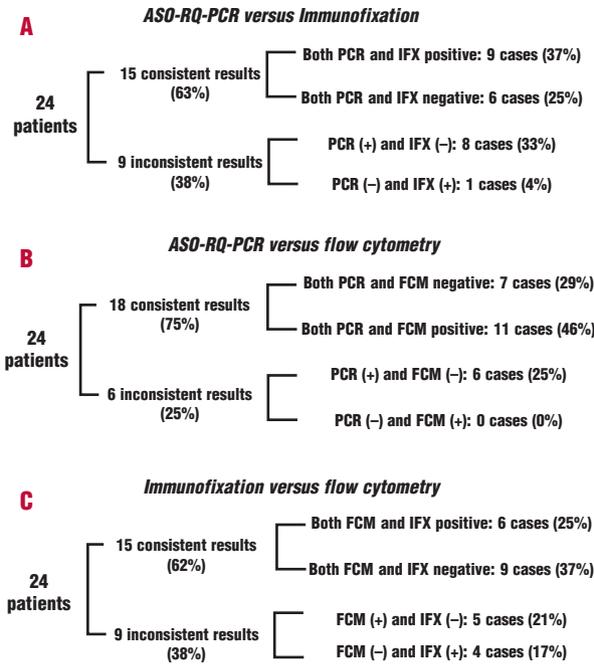


Figure 1. Comparison between minimal residual disease detection by RQ-PCR, flow cytometry (FCM) and immunofixation (IFX) three months after transplantation. In this figures, no cut-off point of 0.01% has been considered, so any detection of MRD is considered positive.

(high MRD). Regarding the predictive value of the MRD detected by RQ-PCR, the presence of a low MRD was associated with a longer progression-free survival. Thus, patients with less than $\leq 0.01\%$ residual clonal cells displayed a progression-free survival of 34 months as compared to only 15 months for patients with a higher MRD level ($p=0.042$) (Figure 2A). Interestingly, other cut-off values, such as 0.1% were also predictive of the outcome of the patients (*data not shown*). It is important to note that there were two extramedullary relapses within the group with low MRD and that these were not predicted with this methodology. If these cases were excluded, the prognostic discrimination power of RQ-PCR was higher ($p=0.019$). By contrast, immunofixation status did not allow discrimination between two different risk categories (Figure 2B). As far as flow cytometry was concerned, immunophenotypically aberrant plasma cells were undetectable in 13 cases (54%, MRD-negative cases), while in 11 patients (46%) more than 0.01% tumor cells were detectable by flow cytometry (MRD positive cases). In comparison with ASO-RQ-PCR, the level of tumor cells detected by flow cytometry was very similar, ranging between 0 and 1.60 (mean 0.29%, SD 0.48%). Although six cases were negative by flow cytometry but positive by RQ-PCR (Figure 1B), the number of clonal cells present in these cases was very low (median 0.014%, range 0.001-0.11%). Actually, as shown in

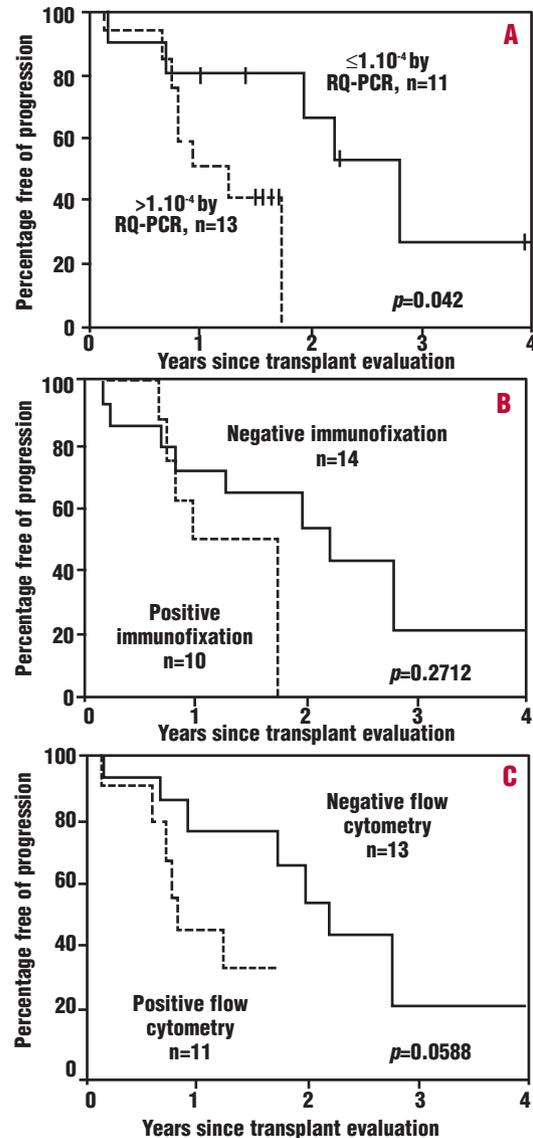


Figure 2. Progression-free survival curves according to the residual disease evaluation. **A:** based on MRD by RQ-ASO-PCR; **B:** based on immunofixation and **C:** based on MRD by flow cytometry. Discrimination between groups of risk according to MRD was made using a cut-off point of 0.01% (10^{-4}).

Figure 3, when the number of residual tumor cells detected by both techniques was compared in each individual case, the degree of correlation was very high ($R=0,861$). In addition, MRD detected by flow cytometry provided a very similar predictive value to that observed with ASO-RQ-PCR, with survival curves almost parallel (Figure 2). Thus, patients with <1 immunophenotypically aberrant plasma cells per 10,000 normal cells displayed a longer progression-free survival than those with a higher MRD (27 vs.10 months, $p=0.05$; Figure 2C). FCM did not provide a significant value, although when considering all patients able to be followed ($n=48$) the p value was largely <0.05 . Interestingly, as with RQ-PCR, other MRD threshold

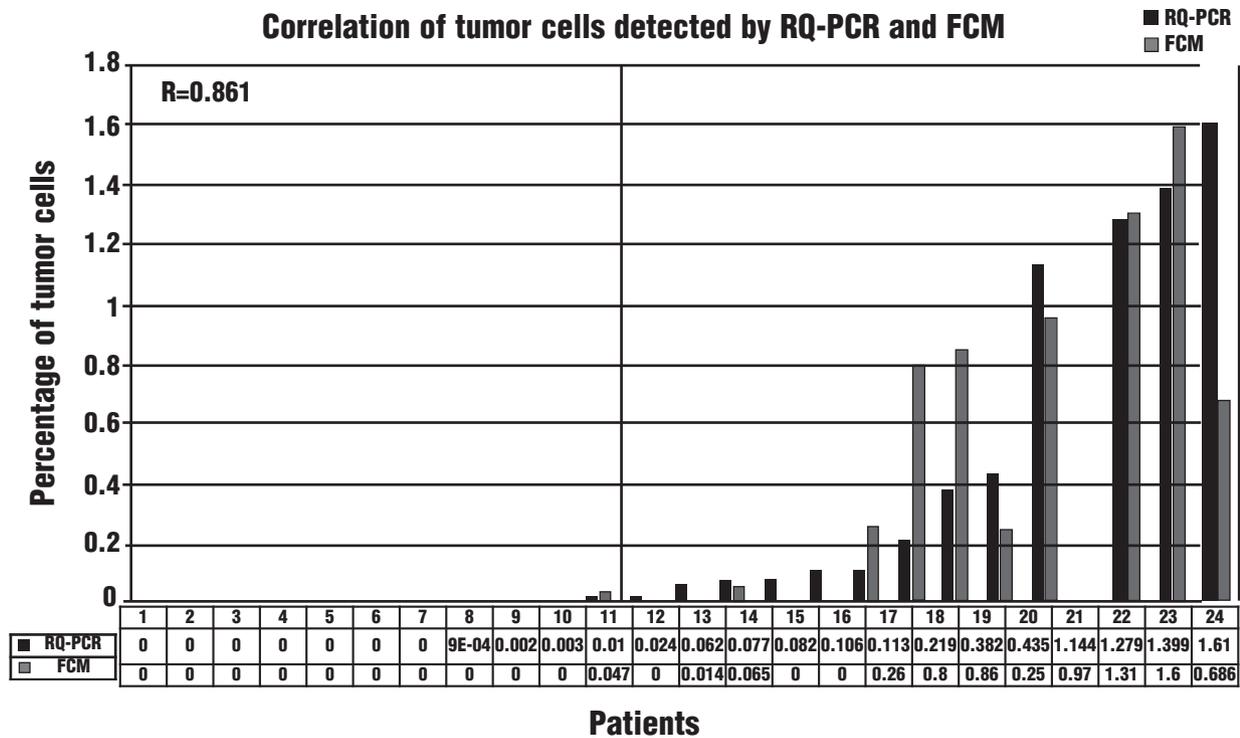


Figure 3. Relationship between flow cytometry (FCM) and ASO-RQ-PCR results of the number of tumor cells in the bone marrow of myeloma patients three months after transplantation.

values such as 0.1% were also predictive of progression-free survival. There were some patients with discrepant results between flow cytometry and RQ-PCR: three patients had $\leq 10^{-4}$ tumor cells detected by flow cytometry and $>10^{-4}$ by RQ-PCR. Two of them had already relapsed while the other one is still free of progression. The two relapses were both conventional (M-component increase) and all patients were alive at the time of closing this study. Analyzing factors influencing the outcome of these patients, only two parameters were found to be associated with a shorter progression-free survival: advanced age (≥ 60 years) and high MRD level detected by RQ-PCR or flow cytometry. Other factors (including cytogenetics, β -2-microglobulin and percentage of S-phase plasma cells) did not achieve a significant predictive value, probably because of the strict patient selection criteria, especially that of including only patients achieving complete remission.

Discussion

We evaluated the utility of MRD investigations in bone marrow samples from MM patients achieving complete remission after high-dose therapy and autologous stem cell transplantation, in order to ascertain whether MRD assessment could contribute to a better definition of the quality of response and to determine its predictive value for relapse. For this purpose, we

used and compared two different methodologies: ASO RQ-PCR and flow cytometry. This is the first study in which the clinical utility of ASO RQ-PCR is evaluated in a homogeneous series of transplanted MM patients, as well as the first time in which ASO-RQ-PCR is directly compared with flow cytometry. Our results show that both methodologies, ASO-RQ-PCR and FCM, may help to discriminate two risk categories of MM patients, based on the level of residual clonotypic or aberrant plasma cells ($> 10^{-4}$; high and low risk), showing significantly different outcomes. Using multiparametric flow cytometry, our group has previously demonstrated that, in MM patients achieving remission after autologous peripheral blood stem cell transplantation,^{23,36} the persistence of >1 aberrant plasma cell within 10,000 total BM cells is associated with a shorter progression-free survival. In addition, the recovery of a favorable ratio between normal and myelomatous plasma cells predicts a better outcome after transplantation,²³ an observation recently confirmed by others.³⁷ The prognostic relevance of PCR investigations of MRD is less clear. Several groups, including our own, have found that the detection of IgH clonal rearrangements with low sensitive qualitative approaches such as heteroduplex and PAGE or fingerprinting, predicts a poorer outcome in patients undergoing autologous stem cell transplantation.^{28,38-40} However, contradictory results have been reported when more sensitive tech-

niques, such as ASO-PCR, are used. Thus, while some groups have found that patients achieving PCR-negativity had prolonged progression-free survival after allogeneic or autologous transplantation,^{9,10,41} other studies have found that clonotypic cells persist in virtually all MM patients after autologous stem cell transplantation, which prevents different risk populations from being differentiated.^{11,12} This problem could be resolved by quantifying PCR results. However, only two quantitative studies with ASO-PCR have been reported in MM patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. Bakkus *et al.*,¹⁸ using a semi-quantitative ASO-PCR approach based on the limiting-dilution method, analyzed a total of 64 patients, although only 15 were in complete remission at the time of evaluation. A threshold MRD level of 0.015% was established as being optimal for distinguishing between risk groups of patients. Fenk *et al.*¹⁹ used the RQ-ASO-PCR technique to evaluate the bone marrow obtained before transplantation in 11 MM patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. An IgH/ β_2 actin ratio $>0.03\%$ was able to predict a shorter progression-free survival independently of the clinical response. It should be noted that the cut-off values identified in these two studies are very similar to the 10^{-4} threshold used in the present study to separate high MRD from low MRD. However, in our study we found that several other less restrictive cut-off values (0.1%) also allowed risk categories to be established, indicating that the higher the MRD level the higher the risk of relapse. Interestingly, these cut-off points are the same as those identified by immunophenotyping.^{23,36} Moreover, survival curves derived from both techniques (RQ-ASO-PCR and flow cytometry) were almost identical. Therefore, according to these results a possible goal for new treatment strategies for MM would be to reach a residual tumor load below 10^{-4} . Examining the advantages and disadvantages of ASO-RQ-PCR and flow cytometry techniques for MRD detection, the former has the advantage of identifying all clonotypic cells, including not only the plasma cells but also earlier precursor clonal B cells. However, a clonal result gives no definitive proof of malignant potential and it does not necessarily predict outcome.⁴² Accordingly, six out of 13 RQ-PCR-positive patients did not relapse despite showing significant levels of tumor cells. By contrast, flow cytometry just focuses on the plasma cell compartment, while precursor tumor cells go undetected. This could explain why there were six patients in whom ASO-RQ-PCR detected very low numbers of tumor cells while flow cytometry was unable to detect any aberrant malignant cells. Despite this, as previously mentioned, both techniques yielded almost identical progression-free survival curves, using the same threshold level for discrimination of MRD risk groups. On the other hand, the applicability of flow

cytometry ($>90\%$) is significantly higher than that of PCR ($\geq 75\%$) despite the use of highly standardized DNA V(D)J amplification methodologies²⁶ and the use of alternative targets such as DJH rearrangements.¹⁶ Reasons for molecular failures were: short N-region (13%) and unamplifiable IgH rearrangement presumably due to somatic VH hypermutation (13%) or JH hypermutation (8%). Several experiments to improve this applicability failed to provide positive results. Thus, the main reason for molecular analysis failures was an inadequate diagnostic sample. Another important problem of molecular studies is that they are time and labor-consuming methodologies that provide a relatively modest advantage in clinical terms compared to flow cytometry. Thus, only two patients (10%) were allocated to the high-risk group by using ASO-RQ-PCR rather than flow cytometry.

In conclusion, investigation of MRD by quantitative ASO RQ-PCR in bone marrow of MM patients achieving complete remission after autologous stem cell transplantation provides relevant information on residual tumor load with a significant impact on the risk of relapse. However, other MRD techniques, such as multiparametric flow cytometry, yield similar prognostic information with the advantage of being easier and quicker and probably applicable to a higher number of patients. Thus, it is reasonable to think that flow cytometry will be the routine technique for assessing MRD in MM in clinical practice, but to reach this goal, additional studies including larger numbers of patients and longer follow-up are required. At the moment, we can say that real-time PCR and flow cytometry are complementary techniques in MRD evaluation for MM. Both techniques show that decreases in the bone marrow tumor load below 1 malignant cell per 10,000 total bone marrow cells could be used as a target for the definition of a molecular/immunophenotypic complete remission.

MES participated in the design of the study, carried out all molecular studies and prepared the database for the final analysis. She prepared the initial version of the paper; RG-S: conception and design of most of the work, reviewed the database and did the statistical analysis. He re-wrote the paper and provided the pre-approval of the final version; DG participated in the initial conception and design of the study and did the first molecular studies; JM and PM participated in the generation of the molecular results; GM, AO: produced the flow cytometry data; JMH and JMR were clinicians responsible for the patients; MG, JLL and JFSM promoted the study and were responsible for getting the financial support. JFSM was the person responsible for the most important revision of the draft and giving final approval of the version to be submitted.

This work was supported by the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) with the grants 01/0089, PI-02/0905 and Red G03/136. MES was supported by the grant "Formación de Personal Investigador" from the Consejería de Educación of the Junta Castilla y León 2000. The authors would like to thank F. García, A. Antón and M. Anderson for their technical support.

Manuscript received March 31, 2005. Accepted August 1, 2005.

References

- San Miguel JF, Blade CJ, Garcia-Sanz R. Treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 1999;84:36-58.
- Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JC, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myelome. *N Engl J Med* 1996;335:91-7.
- Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:1875-83.
- Cave H, van der Werff ten Bosch, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 1998;339:591-8.
- van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731-8.
- Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Vidriales B, Valverde B, Ocqueteau M, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16:3774-81.
- Mughal TI, Yong A, Szydlo RM, Dazzi F, Olavarria E, van Rhee F, et al. Molecular studies in patients with chronic myeloid leukaemia in remission 5 years after allogeneic stem cell transplant define the risk of subsequent relapse. *Br J Haematol* 2001;115:569-74.
- Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo A, et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol* 1999;17:208-15.
- Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, Ronconi S, Tosi P, Lemoli R, et al. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in multiple myeloma patients receiving allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2000;85:930-4.
- Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, Martinelli G, Terragna C, Majolino I, et al. Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 2003;102:1927-9.
- Cremer FW, Ehrbrecht E, Kiel K, Benner A, Hegebart U, Ho AD, et al. Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive parameter in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:851-8.
- Lemoli RM, Martinelli G, Zamagni E, Motta MR, Rizzi S, Terragna C, et al. Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 2000;95:2234-9.
- Gonzalez D, Balanzategui A, Garcia-Sanz R, Gutierrez N, Seabra C, van Dongen JJ, et al. Incomplete DJH rearrangements of the IgH gene are frequent in multiple myeloma patients: immunobiological characteristics and clinical implications. *Leukemia* 2003;17:1398-403.
- Voena C, Malnati M, Majolino I, Faga G, Montefusco V, Farina L, et al. Detection of minimal residual disease by real-time PCR can be used as a surrogate marker to evaluate the graft-versus-myeloma effect after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:791-3.
- Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Salama P, Ayala R, Bautista JM. The use of fluorescent molecular beacons in real time PCR of IgH gene rearrangements for quantitative evaluation of multiple myeloma. *Clin Lab Haematol* 2004;26:31-5.
- Gonzalez D, Gonzalez M, Alonso ME, Lopez-Perez R, Balanzategui A, Chillon MC, et al. Incomplete DJH rearrangements as a novel tumor target for minimal residual disease quantitation in multiple myeloma using real-time PCR. *Leukemia* 2003;17:1051-7.
- Ladetto M, Donovan JW, Harig S, Trojan A, Poor C, Schlossman R, et al. Real-time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6:241-53.
- Bakkus MH, Bouko Y, Samson D, Apperley JF, Thielemans K, Van Camp B, et al. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;126:665-74.
- Fenk R, Ak M, Kobbe G, Steidl U, Arnold C, Korthals M, et al. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:557-66.
- Raab MS, Cremer FW, Breitkreutz IN, Gerull S, Luft T, Benner A, et al. Molecular monitoring of tumour load kinetics predicts disease progression after non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Ann Oncol* 2005;16:611-7.
- Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, et al. 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;152:1655-65.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2332-6.
- San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Blade J, Lopez-Berges C, Caballero D, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1853-6.
- Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:197-222.
- Blade J, Samson D, Reece D, Apperley J, Björkstrand B, Gahrton G, 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;102:1115-23.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggermann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, 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;17:2257-317.
- Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, Langerak AW, Gonzalez D, Chillon MC, Balanzategui A, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica* 1999;84:328-35.
- Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Balanzategui A, Chillon MC, Alaejos I, et al. Gene scanning of VDJH-amplified segments is a clinically relevant technique to detect contaminating tumor cells in the apheresis products of multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;2:665-72.
- Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 1995;16:237-42.
- Lefranc MP. IMGT, the international ImmunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 2001;29:207-9.
- Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res* 2004;32:W435-W440.
- van dV, V, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-34.
- Verhagen OJ, Willems MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14:1426-35.
- Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, De H, V, Roovers E, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998;12:2006-14.
- Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Corral M, Caballero MD, et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999;107:121-31.
- Mateo G, Orfao A, Montalban MA, Blade J, Laherta JJ, San Miguel JF. Immunophenotypic investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Hematol J* 2003;Supplement 1:s48-s9.
- Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-100.
- Bird JM, Bloxham D, Samson D, Marcus RE, Russell NH, Kelsey SM, et al. Molecular detection of clonally rearranged cells in peripheral blood progenitor cell harvests from multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 1994;88:110-6.
- Dreyfus F, Melle J, Quarre MC, Pillier C. Contamination of peripheral blood by monoclonal B cells following treatment of multiple myeloma by high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1993;85:411-2.
- Björkstrand B, Ljungman P, Bird JM, Samson D, Gahrton G. Double high-dose chemoradiotherapy with autologous stem cell transplantation can induce molecular remissions in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:367-71.
- Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo A, et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol* 1999;17:208-15.
- Rasmussen T. The presence of circulating clonal CD19+ cells in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1359-66.

Application of Self-Quenched JH Consensus Primers for Real-Time Quantitative PCR of *IGH* Gene to Minimal Residual Disease Evaluation in Multiple Myeloma

Joaquin Martinez-Lopez,* Pilar Martinez-Sanchez,* Ramon Garcia-Sanz,† Maria Eugenia Sarasquete,† Rosa Ayala,* Marcos Gonzalez,† Jose Manuel Bautista,‡ David Gonzalez,† Jesus San Miguel,† Guillermo Garcia-Effron,* and Juan Jose Lahuerta*

From the Servicio de Hematología,* Hospital Universitario, 12 de Octubre Madrid; the Servicio de Hematología,† Hospital Clínico de Salamanca, Salamanca; and the Departamento IV de Bioquímica y Biología Molecular,‡ Universidad Complutense, Madrid, Spain

Monitoring multiple myeloma patients for relapse requires sensitive methods to measure minimal residual disease and to establish a more precise prognosis. The present study aimed to standardize a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) test for the *IgH* gene with a JH consensus self-quenched fluorescence reverse primer and a VDJH or DJH allele-specific sense primer (self-quenched PCR). This method was compared with allele-specific real-time quantitative PCR test for the *IgH* gene using a TaqMan probe and a JH consensus primer (TaqMan PCR). We studied nine multiple myeloma patients from the Spanish group treated with the MM2000 therapeutic protocol. Self-quenched PCR demonstrated sensitivity of $\geq 10^{-4}$ or 16 genomes in most cases, efficiency was 1.71 to 2.14, and intra-assay and interassay reproducibilities were 1.18 and 0.75%, respectively. Sensitivity, efficiency, and residual disease detection were similar with both PCR methods. TaqMan PCR failed in one case because of a mutation in the JH primer binding site, and self-quenched PCR worked well in this case. In conclusion, self-quenched PCR is a sensitive and reproducible method for quantifying residual disease in multiple myeloma patients; it yields similar results to TaqMan PCR and may be more effective than the latter when somatic mutations are present in the JH intronic primer binding site. (*J Mol Diagn* 2006, 8:364–370; DOI: 10.2353/jmoldx.2006.050101)

The configuration of immunoglobulin (Ig) genes shows a post-follicular origin in multiple myeloma plasma cells; these cells are somatically hypermutated and present no

intraclonal variation or class-switching.¹ After stem cell transplantation, 30 to 40% of multiple myeloma (MM) patients achieve complete remission (CR) with negative immunofixation, although most of them ultimately relapse.^{2,3} Monitoring of MM patient response to treatment has been classically based on the detection and quantification of patient M serum component. Accordingly, more sensitive methods are necessary to measure minimal residual disease (MRD) and to establish a more precise prognosis. Immunophenotypic flow cytometry studies of myelomatous plasma cells and the current molecular strategies are highly sensitive, allowing the detection of very low levels of MRD. However, both strategies have limitations.^{4–8}

Several real-time quantitative IgH polymerase chain reaction (PCR) assays have demonstrated optimal results for tumor burden quantification after treatment in patients with several hematological malignancies, including multiple myeloma.^{4,5,9–12} A major problem in multiple myeloma real-time PCR quantification is hypermutation in the VDJH rearrangement.

Measuring MRD by allele-specific oligonucleotide (ASO) real-time quantitative PCR for the *IgH* gene (IgH RQ-PCR) could be a good strategy to evaluate molecular response and its prognostic importance in MM patients who show complete remission on the immunofixation test.^{4,5} Usually, ASO primers are targeted to the VDJH junction, and the TaqMan probe and reverse primer are targeted to JH consensus and intronic regions. In this situation, it is possible that the consensus primers and probe coincide with a somatically mutated JH segment. If this happens, the primer and/or probe will be mismatched, and PCR efficiency will be dramatically reduced.⁵

The fluorescent techniques used in PCR-based detection are various: linear hydrolysis probes (TaqMan probes), hybridization probes, fluorescence resonance

Supported in part by a grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (grant FIS 01/0089) and Fondo de Investigaciones Sanitarias network (grant G03/136).

J.M.-L. and P.M.-S. contributed equally to this work.

Accepted for publication January 24, 2006.

Address reprint requests to Pilar Martínez-Sánchez, Servicio de Hematología, Hospital Universitario, 12 de Octubre. Av. de Córdoba, s/n Madrid 28041, Spain. E-mail: mpmartinezsa@yahoo.es.

energy transfer-labeled oligonucleotides, molecular beacons, DNA-binding dyes (SYBRGreen), etc. A way to simplify real-time *IgH* gene PCR in postfollicular B malignancies is to avoid using a probe or to employ shorter probes. In this sense, several methods like SyBGreen or short consensus probes have been proposed and used.^{13,14}

Nazarenko et al¹⁵ developed a novel fluorescent primer design that labeled primers with a single fluorophore on a base close to the 3' end. This technique does not require a quencher but is still suitable for real-time quantification and has demonstrated good results in quantifying *c-myc*, interleukin-4 cDNAs, and some reference genes. Other authors have used this approach to quantify the gene expression in neural precursors¹⁶ and to detect a gastroenteritis virus gene.¹⁷ But before now, this technique had never been used for *IgH* gene quantification.

The present study aimed at standardizing an ASO RQ-PCR test for the *IgH* gene with a JH consensus self-quenched fluorescence reverse primer and a VD_JH or DJH allele-specific sense primer, called self-quencher PCR here, to quantify residual disease in MM patients after high-dose chemotherapy and then during follow-up. Results provided with this methodology were also compared with ASO IgH RQ-PCR using the TaqMan probe and JH consensus primer, which we will call TaqMan PCR.⁹

Materials and Methods

Patients and Samples

Bone marrow samples from nine MM patients were recruited for this study. All patients were treated according to the MM2000 therapeutic protocol proposed by the Grupo Español de Mieloma. This protocol consists of four cycles of VBCMP/VBAD (vincristine, BCNU, cyclophosphamide, melphalan, prednisone/vincristine, BCNU, adriamycin, and dexamethasone) alternate chemotherapy regimen followed by high-dose melphalan and autologous peripheral blood stem cell transplantation. All patients included in the study were in CR after transplantation. CR was defined by the electrophoretic disappearance of the M-component in both serum and urine (confirmed in two different samples obtained at an interval of 6 weeks), absence of soft-tissue plasmacytomas, a normal serum calcium concentration, stable skeletal disease, and less than 5% plasma cells in the bone marrow.³

The nine patients were randomly selected from a series of 57 patients achieving CR as previously defined, in whom the VD_JH or DJH monoclonal rearrangement had been fully identified. The sequences of each rearrangement junction, ASO primers, and JH probes and primers are shown in Figure 1.

Methods

Patient samples were studied at diagnosis and at the time of the patient's best response to autologous peripheral

blood stem cell transplantation. Genomic DNA was isolated from 2 ml of bone marrow aspirates from each patient. High molecular weight DNA was isolated by standard proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction, and ethanol precipitation or automatic extraction with Magnapure (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) based on magnetic bead technology.

Identification of the IgH clonal population was made according to the BIOMED II protocol.¹⁸ PCR product was directly sequenced first with the JH consensus primer and later with the VH primer, in an automated ABI 3100 Avant DNA sequencer using Big-Dye 3.1 terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA). Germline VH, DH, and JH segments from complete VD_JH rearrangements were identified by comparison with the V Base23 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) and the International ImMunoGeneTics Information System database (<http://imgt.cines.fr>) using online DNAPLOT. Germline DH and JH segments from incomplete DJH rearrangements were identified using the BLAST search in the DH-JH germline locus sequence (accession no. EMB/X97051; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Figure 1). The allele-specific primer for the CDR3 region of the IgH gene was designed according to previously described instructions.⁵

Self-Quenched PCR

The alternative method for assessing MM patient response to therapy was RQ-PCR with a consensus fluorogenic mono-labeled primer. This method used the same 5' allele-specific primer targeted for the VD_JH or DJH CDR3 region as the TaqMan real-time PCR. The JH consensus primer designed by van Dongen et al¹⁸ was modified to design the self-quenched primer. The consensus JH primer consisted of a 3' primer labeled with a fluorescent dye and modified according to the general thermodynamic conditions previously described for the self-quenching primer in the Oligo 6 program¹⁹ (W. Rychlik, Molecular Biology Insights, Cascade, CO; <http://www.oligo.net>): the presence of either a C or G as the terminal 3' nucleotide of the primer and the fluorophore 6-FAM being attached to the last T base from the 3' end of the primer. The last step was the addition of a 5' tail, which is a complement sequence to the 3' end and thus forms a hairpin. The ΔG in the stem of the hairpin primers ranged from -1.6 to -5.8 kcal/mol.¹⁵ The final sequence of the self-quenched primer was *GGTCACTTACCTGAG-GAGACGGTGACC* (the primitive primer sequence is underlined, the 5'tail is represented in italics, and the position in which the fluorophore 6-FAM was attached is printed in bold type). The ΔG of the complementary sequence in the hairpin stem was -3.4 kcal/mol.

TaqMan PCR

Real-time quantitative PCR of the *IgH* gene was performed with TaqMan probes, using the previously published TaqMan and JH consensus primers⁹ and with the VD_JH or DJH rearrangements as targets. This method was

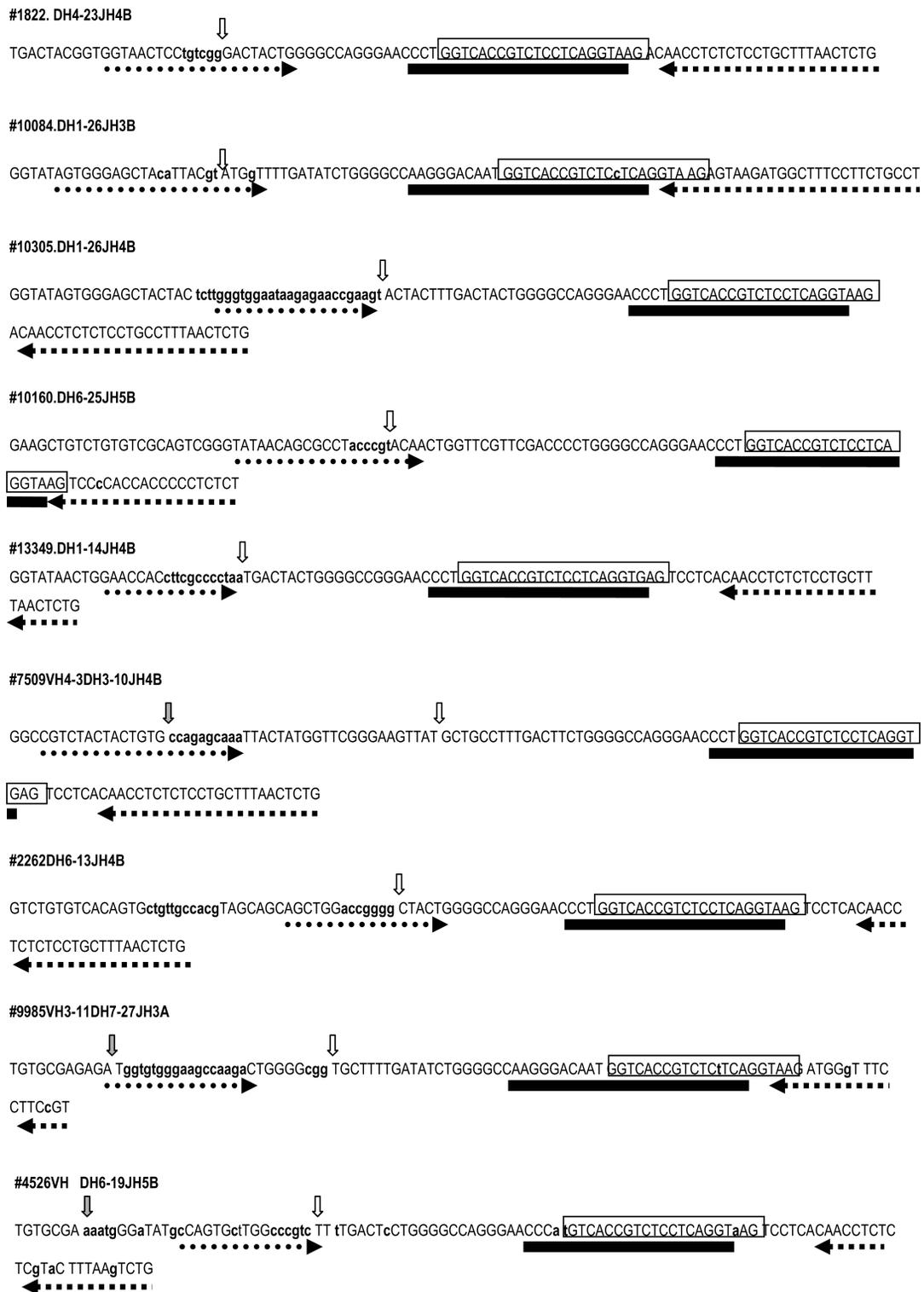
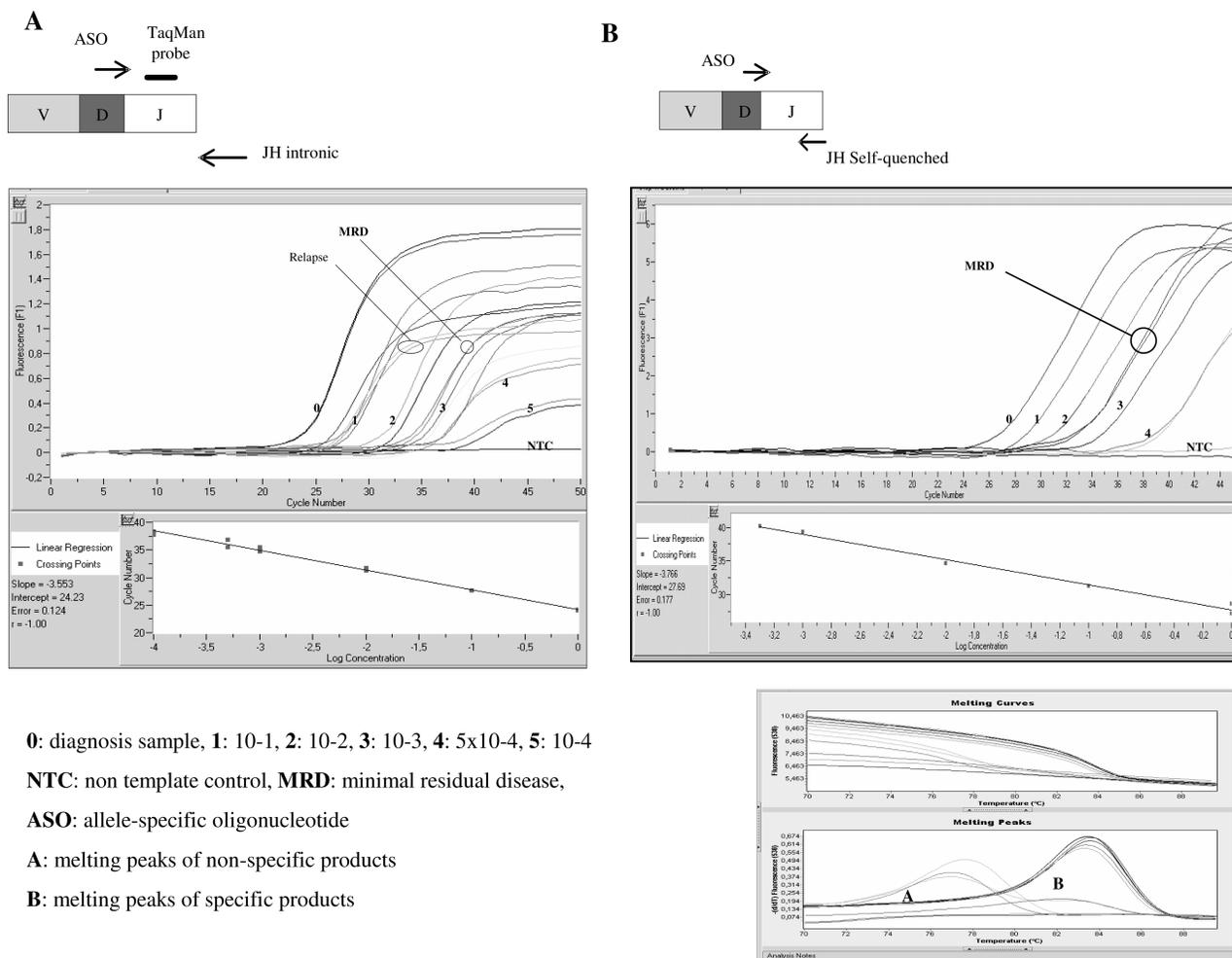


Figure 1. Patient rearrangements and oligonucleotide sequences. Junction regions VDH, DHJ, or both are indicated with vertical arrows. N nucleotide insertions and somatic mutations are represented in lowercase letters. Allele-specific and JH intronic primer are underlined with dotted lines, probe sequences are underlined with black lines, and the self-quenched sequence is inside the rectangle. All cases have been sequenced using the JH consensus primer. Cases 10160, 9985, and 4526 (cases that did not work) have also been sequenced using the next JH intronic primer just downstream to study the mutations present in the probe and primer binding sites.

the control, and its protocols were adapted to the Light Cycler system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). A 5' allele-specific primer in the VDJH or DJH CDR3

region was designed for each individual patient, a specific TaqMan probe for the JH family and a 3'-specific JH intronic primer for the JH family were used for all patients.



0: diagnosis sample, 1: 10⁻¹, 2: 10⁻², 3: 10⁻³, 4: 5x10⁻⁴, 5: 10⁻⁴

NTC: non template control, MRD: minimal residual disease,

ASO: allele-specific oligonucleotide

A: melting peaks of non-specific products

B: melting peaks of specific products

Figure 2. Scheme and standard curves of two methodologies. **A:** Example of TaqMan PCR. Amplification curves of one patient's diagnostic sample, several dilutions to calculate standard curve, the sample after treatment (MRD), and the sample at the time of the relapse. NTC, nontemplate control. **B:** Example of self-quenched PCR. **C:** Melting curves in one self-quenched method case. There are two different melting temperatures: 84°C for the specific fragments (**B**) and 77°C for the nonspecific fluorescence (**A**).

Control Genes

Two different control genes were used for quantification result normalization: β -actin for the Taqman PCR method²⁰ and thromboxane A (TXA) for the self-quenched PCR, because the β -actin gene was not amenable to the modifications necessary to produce a self-quenched primer.¹⁸ The TXA forward primer sequence was modified according to the rules described above for self-quenched primer design. The primer sequences were TXAF, 5'-GGACTGCCCGACATTCTGCAAGTCC-3' and TXAR 5'-GGTGTTCGCCGGGAA GGGTT-3'. The ΔG of its complementary sequence was -1.9 kcal/mol.

PCR Conditions

Real-time PCR reactions were performed in a Light Cycler system using Fast Start Light Cycler TM DNA-Master containing Taq-polymerase, reaction buffer, and dNTPs. All reactions were performed in a 10- μ L volume with 500 ng of genomic DNA, 300 nmol/L each primer, 200 nmol/L TaqMan probe, and 4 mmol/L MgCl₂. To

optimize self-quenched PCR, it was necessary to adjust the primer concentration between 200 and 1000 nmol/L; the optimum concentration was 300 nmol/L in seven cases, 500 nmol/L in two cases, and 250 nmol/L in one case. For TXA PCR, the optimum primer concentration used was 500 nmol/L.

Cycling conditions were 10 minutes at 95°C for initial denaturation followed by 45 cycles of 0 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. An annealing temperature of 65°C was used in two cases of ASO-PCR for the self-quenched PCR and also for the self-quenched PCR for the TXA gene. When self-quenched primer was used, the PCR products were subjected to a melting cycle with a cooling ramp rate of 0.2°C/seconds from 95 to 70°C, with continuous monitoring of the fluorescence ratio to establish the T_m of the amplified fragment (Figure 2).

The diagnostic DNA from each patient was serially diluted down to 10⁻⁵ in 10-fold increments into polyclonal DNA from healthy individuals (Figure 2). Standard curves were calculated using these dilutions. Successful RQ-PCR was assessed according to a standard curve with a

Table 1. Results of MRD Calculated by Two Methods

No.	Efficiency	Slope	Sensitivity	<i>r</i>	MRD	Copies/cells
1822 TaqMan	2.14	-3.03	5×10^{-5}	-0.98	2.8×10^{-4}	4
1822 Self-q	1.92	-3.54	5×10^{-5}	-1.00	3.8×10^{-4}	4
10084 TaqMan	1.74	-4.14	5×10^{-4}	-0.99	1.2×10^{-2}	4
10084 Self-q	2.12	-3.07	10^{-4}	-0.99	5.6×10^{-2}	8
10305 TaqMan	1.99	-3.35	5×10^{-5}	-1.00	6.6×10^{-2}	4
10305 Self-q	1.71	-4.29	10^{-4}	-0.99	2.7×10^{-2}	8
10160 TaqMan	1.95	-3.45	10^{-3}	-0.99	N.R.	-
10160 Self-q	1.59	-4.97	10^{-2}	-0.98	N.R.	-
13349 TaqMan	2.88	-2.18	10^{-4}	-0.98	1.3×10^{-2}	8
13349 Self-q	1.89	-3.63	5×10^{-4}	-0.99	1.8×10^{-2}	16
7509 TaqMan	2.26	-2.82	10^{-4}	-0.99	2.2×10^{-4}	8
7509 Self-q	2.01	-3.3	5×10^{-4}	-0.98	1.9×10^{-4}	16
2262 TaqMan	2.13	-3.04	5×10^{-4}	-0.99	7.5×10^{-1}	16
2262 Self-q	2.05	-3.21	5×10^{-4}	-0.99	7.1×10^{-1}	16
9985 TaqMan				-0.96	N.A.	-
9985 Self-q	2.14	-3.03	10^{-4}	-1.00	N.A.	8
4526 TaqMan				-0.88	N.R.	-
4526 Self-q					N.R.	-

Characteristics of standard curves, sensitivity and efficiency in every case. *r*, correlation coefficient; N.A., results not available because there is no MRD sample; N.R., no results because of technique failure.

correlation coefficient (*r*) of at least 0.98, and the specific fluorescence quantification was calculated with the aid of the Light Cycler software v3.01. PCR efficiency was calculated according to the formula: $PCR\ E = 10^{-1/slope}$. Relative quantification of MRD was performed according to the following formula from Pfaffl et al.²¹

$$I_{gHMRD} = (E_{I_{gH}})^{\Delta CT_{I_{gH}}(Diagnosis-MRD)} / (E_{control})^{\Delta CT_{control}(Diagnosis-MRD)}$$

Intra- and interassay reproducibility was assessed by repeating the same experiment five times. Maximal sensitivity was defined as the last dilution of diagnostic DNA in which at least one of the duplicate dilution samples gave a positive fluorescent signal with a maximum C_T value of 40 cycles. This C_T value had to be at least three cycles lower than the C_T values found in any unspecific amplification with polyclonal DNA.

When the ASOVDJH or DJH PCR for both techniques failed (sensitivity below 5×10^{-4} or a slope ≥ 4), a larger fragment using the JH intronic primer just downstream was amplified and sequenced to find possible mutations in the probe or the JH binding site. The MeltCalt program was used to estimate the changes that somatic mutations produced in the ΔT_m for each probe and primer in VDJH rearrangements.²²

Results

In six of the nine patients, it was possible to calculate the MRD with both methods using standard curves. The parameters of the standard curves and results for each case are shown in Table 1.

Self-Quenched PCR

Self-quenched PCR worked in seven cases. The sensitivities of the standard curves varied from 5×10^{-4} , or 16 copies of the target gene, to 5×10^{-5} , or 4 copies of the

target gene. This is based on the assumption that a cell contains 6.25 pg of DNA and the fact that $0.5 \mu g$ of DNA was used per test. PCR efficiencies varied from 1.71 to 2.14 (Table 1). Intra-assay reproducibility for the cycle threshold (Ct) of 8800 copies had a mean and SD of 31.72 ± 0.13 , reflecting a coefficient of variation (CV) of 0.43%, whereas the interassay reproducibility for the Ct of 8800 copies was 31.86 ± 0.41 and CV 1.3%. A melting curve was performed at the end of PCR cycling to check the specificity of the amplifications. The T_m for specific products varied from 76 to 83°C. Unspecific amplifications due to primer dimer formation were identified by the presence of different melting peak T_m s (Figure 2).

The control gene for this approach was *TXA* gene, modified as a self-quenched primer as previously described in Methods. The efficiency of the self-quenched PCR for the *TXA* gene was 1.87, the slope was -3.67, and the correlation coefficient was equal to 1. The mean and SD for the intra-assay reproducibility of the 16,600 copy Ct was 26.67 ± 0.38 , with a CV of 1.45%, and the interassay reproducibility for the 16,600 copy Ct was 28.26 ± 0.56 and CV was 2%.

TaqMan PCR

TaqMan PCR worked in six cases. The sensitivities of the standard curves ranged from 5×10^{-4} , or 16 copies of target gene, to 5×10^{-5} , or 4 copies of target gene. PCR efficiencies ranged from 1.74 to 2.88. Intra-assay reproducibility for the 8800 copy Ct had a mean and SD of 29.10 ± 0.31 , reflecting a CV of 1.05%; and interassay reproducibility for the 8800 copy Ct was 29.79 ± 0.8 and CV was 2.8%.

This approach used β -actin as the control gene. Each primer ($0.3 \mu mol/L$) and a 60°C annealing temperature were used for this PCR. The efficiency was 1.96, the slope was -3.41, and the correlation coefficient was equal to 1. The intra-assay reproducibility for the 16,600

copy Ct had a mean and SD of 24.82 ± 0.08 , reflecting a CV of 0.35%, and the interassay reproducibility for the 16,600 copy Ct was 23.52 ± 0.27 with a CV 1.16%.

The Comparison of Self-Quenched and TaqMan PCR

Sensitivity ranged between 5×10^{-4} and 5×10^{-5} with both methods. The TaqMan probes provided better sensitivity in three patients whereas the self-quenched primer was more sensitive in a different patient (Table 1). PCR efficiency ranged from 1.71 to 2.14 using the self-quenched primer and between 1.74 and 2.88 using the TaqMan probe (Table 1).

In one case, the self-quenched primer technique was effective, but the TaqMan probe technique failed, while in another two cases, the efficiency and/or sensitivity were inadequate with both methods.

Minimal residual disease could be measured with both methods in six of nine patients. Results were similar in all six patients, and these all had the same MRD logarithm with the two proposed methods (Table 1).

Causes for Unsuccessful ASO RQ-PCRs

As previously mentioned, the efficiency and sensitivity of PCR were inadequate in three cases. This was due to the presence of somatic mutations in the target for the probe, the JH intronic primer, or the JH self-quenched primer (Figure 1).

In case 9985, the self-quenched PCR provided good results, but the TaqMan PCR approach did not work. The VDJH sequence revealed that zone binding with the JH intronic primer had two mismatches that produced a ΔT_m of 9.8°C. In this case, the self-quenched approach yielded a correct amplification despite the presence of a mismatch in its primer binding zone. This mismatch produced a ΔT_m of 3.6°C.

In another case, 4526, the TaqMan approach had a total of six mutations, three in the probe, and three in the JH intronic primer binding site with a ΔT_m of 14.9°C. The self-quenched primer binding site had one mutation with a ΔT_m of 3.4°C, but it was located just at the 3'-terminal nucleotide of the primer.

Finally, case 10160 had a somatic mutation in the JH intronic primer binding site resulting in a ΔT_m of 8.5°C, which explained the very low sensitivity for the TaqMan approach. In this case, the self-quenched method did not work either. The JH self-quenched primer binding site showed only one mutation with a ΔT_m of 5°C and did not show primer dimer formation. This ΔT_m , although not high, was the only explanation we found for this inadequate result.

Discussion

The present study has evaluated a new methodology for molecular evaluation of residual disease in MM patients that shows some advantages over other methodologies.

The most important being a need for only two primers to get a specific PCR quantification of the monoclonal hallmarks in MM patients. This makes it possible to avoid problems derived from the use of the probes that are required in other methodologies, without a significant loss in the reproducibility, sensitivity, or specificity of the procedure.

Molecular detection techniques, like PCR amplification of clonal VDJH rearrangements, are very sensitive but methodologically difficult.^{5,6,8,23,24} Until now, ASO IgH TaqMan PCR, or TaqMan PCR, has been the most widely accepted method for evaluating MRD in MM patients.^{5,6,24} TaqMan PCR has been widely accepted for many diseases^{9,12,25} and is now being introduced in MM.^{4,5,8} This technique has demonstrated its usefulness in lymphoid malignancies that present no recurrent translocations because they are of pre-follicular origin. However, it is not always possible to apply this approach to mature postgerminal B lymphoid malignancies, like MM, because of the frequent presence of somatic mutations in the *IgH* gene.^{5,9,12,26} Several authors have suggested that a mutation in the JH primer or probe binding site with a $\Delta T_m > 6^\circ\text{C}$ or the presence of more than three mutations are always associated with PCR failure.^{5,6}

Here, we have designed a single JH consensus fluorescent primer and optimized an ASO RQ-PCR for real-time quantification of VDJH clonal rearrangements in multiple myeloma in a technique that is called self-quenched PCR. This strategy allows the use of PCR with only two oligonucleotides (the classical forward and reverse), avoiding problems derived from the use of a third oligonucleotide (the probe). In its place, the self-quenched JH consensus primer can act as the specific molecular dye for the reaction. This strategy will resolve some problems derived from the existence of somatic mutations. An example of this difficulty with somatic mutations would be the results in patient 9985. Using a self-quenched primer avoided the use of the JH intronic 3' primer, the binding site of which was strongly mutated. In contrast, the sensitivity, reproducibility, quantification curve efficiency, and molecular MRD levels with both methods were very similar (almost identical) in six patients (Table 1). In addition, the two control genes, β -actin in the TaqMan PCR and TXA in the self-quenched PCR, provided a similar level of VDJH-specific gene segments for each patient. Thus, both methods are equivalent in measuring the DNA quality.

Another advantage of the self-quenched method is cost. This approach only needs the ASO-specific primer and one fluorescent JH consensus primer that can be used for all patients. In contrast, TaqMan PCR requires three different consensus probes and six different specific JH intronic primers. By our estimate, self-quenched PCR costs about 20 to 25% less than TaqMan PCR.

In summary, ASO RQ-PCR of VDJH clonal segments using a self-quenched primer, or self-quenched PCR, is a reproducible and sensitive method for evaluating MRD in multiple myeloma patients achieving CR after high-dose therapy and stem cell transplantation. This methodology provides results comparable with TaqMan strategies,

and it could be even better in the cases with frequent somatic mutations in the JH intronic primer binding site.

Acknowledgments

We thank all of the hospitals in the Grupo Español de Mieloma and especially Drs. B. Hernández and C. Calle of Hospital Nuestra Señora de Alarcos (Ciudad Real) and Dr. R. Martínez of Hospital Clínico San Carlos (Madrid).

References

1. Bakkus MH, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K: Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br J Haematol* 1994, 87:68–74
2. Lahuerta JJ, Grande C, Martínez-Lopez J, De La Serna J, Toscano R, Ortiz MC, Larregla S, Conde E, Insunza A, Gonzalez-San Miguel JD, Bargay J, Cabrera R, Garcia-Ruiz JC, Albo C, Garcia-Alonso L, Solano F, Vivancos P, Leon A, San Miguel J: Tandem transplants with different high-dose regimens improve the complete remission rates in multiple myeloma: results of a Grupo Espanol de Sindromes Linfoproliferativos/Trasplante Autologo de Medula Osea phase II trial. *Br J Haematol* 2003, 120:296–303
3. Lahuerta JJ, Martínez-Lopez J, Serna JD, Blade J, Grande C, Alegre A, Vazquez L, Garcia-Larana J, Sureda A, Rubia JD, Conde E, Martínez R, Perez-Equiza K, Moraleda JM, Leon A, Besalduch J, Cabrera R, Miguel JD, Morales A, Garcia-Ruiz JC, Diaz-Mediavilla J, San-Miguel J: Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2000, 109:438–446
4. Fenk R, Ak M, Kobbe G, Steidl U, Arnold C, Korthals M, Hunerliturkoglu A, Rohr UP, Kliszewski S, Bernhardt A, Haas R, Kronenwett R: Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004, 89:557–566
5. Gonzalez D, Gonzalez M, Alonso ME, Lopez-Perez R, Balanzategui A, Chillon MC, Silva M, Garcia-Sanz R, San Miguel JF: Incomplete DJH rearrangements as a novel tumor target for minimal residual disease quantitation in multiple myeloma using real-time PCR. *Leukemia* 2003, 17:1051–1057
6. Ladetto M, Omede P, Sametti S, Donovan JW, Astolfi M, Drandi D, Volpato F, Giaccone L, Giarretta F, Palumbo A, Bruno B, Pileri A, Gribben JG, Boccadoro M: Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Hematol* 2002, 30:529–536
7. Rasmussen T, Knudsen LM, Huynh TK, Johnsen HE: Molecular and clinical follow-up after treatment of multiple myeloma. *Acta Haematol* 2004, 112:105–110
8. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Martinez J, Mateo G, Martinez P, Ribera JM, Hernandez JM, Lahuerta JJ, Orfao A, Gonzalez M, San Miguel JF: Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 2005, 90:1365–1372
9. Bruggemann M, Droese J, Bolz I, Luth P, Pott C, von Neuhoff N, Scheuering U, Kneba M: Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2000, 14:1419–1425
10. Eckert C, Scrideli CA, Taube T, Songia S, Wellmann S, Manenti M, Seeger K, Biondi A, Cazzaniga G: Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. *Leukemia* 2003, 17:2517–2524
11. Martínez-Lopez J, Lahuerta JJ, Salama P, Ayala R, Bautista JM: The use of fluorescent molecular beacons in real time PCR of IgH gene rearrangements for quantitative evaluation of multiple myeloma. *Clin Lab Haematol* 2004, 26:31–35
12. Pongers-Willemsse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, van der Schoot CE, van Dongen JJ: Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998, 12:2006–2014
13. Li AH, Forestier E, Rosenquist R, Roos G: Minimal residual disease quantification in childhood acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction using the SYBR green dye. *Exp Hematol* 2002, 30:1170–1177
14. Uchiyama M, Maesawa C, Yashima-Abo A, Tarusawa M, Satoh M, Satoh T, Ishida Y, Ito S, Murai K, Enomoto S, Utsugisawa T, Masuda T: Short consensus probes with 3'-minor groove binder of the immunoglobulin heavy-chain gene for real-time quantitative PCR in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Lab Invest* 2004, 84:932–936
15. Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A: Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:e37
16. Lowe B, Avila HA, Bloom FR, Gleeson M, Kusser W: Quantitation of gene expression in neural precursors by reverse-transcription polymerase chain reaction using self-quenched, fluorogenic primers. *Anal Biochem* 2003, 315:95–105
17. Chen R, Huang W, Lin Z, Zhou Z, Yu H, Zhu D: Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine transmissible gastroenteritis virus. *J Virol Methods* 2004, 122:57–61
18. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA: 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, 17:2257–2317
19. Rychlik W: Priming efficiency in PCR. *Biotechniques* 1995, 18:84–86, 88–90
20. Luthra R, Sarris AH, Hai S, Paladugu AV, Romaguera JE, Cabanillas FF, Medeiros LJ: Real-time 5'→3' exonuclease-based PCR assay for detection of the t(11;14)(q13;q32). *Am J Clin Pathol* 1999, 112:524–530
21. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:e45
22. Schutz E, von Ahsen N: Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999, 27:1218–1222, 1224
23. Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC, Owen RG, Pratt G, Evans PA, Richards SJ, Drayson M, Smith GM, Selby PJ, Child JA, Morgan GJ: The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001, 112:814–819
24. Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG: Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Res* 1998, 58:3957–3964
25. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemsse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gardner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettlinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998, 352:1731–1738
26. Ladetto M, Donovan JW, Harig S, Trojan A, Poor C, Schlossnan R, Anderson KC, Gribben JG: Real-time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000, 6:241–253