

# Mieloma multiplo: biologia, criteri diagnostici e prognostici

**Niccolò BOLLI**

*Dipartimento di Oncologia ed Onco-Ematologia, Università degli Studi di Milano, Milano.  
Dipartimento di Ematologia ed Onco-Ematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano.*

**Francesco DI RAIMONDO**

*Divisione di Ematologia, AOU Policlinico-OVE, Università di Catania.*

ABSTRACT

Il mieloma multiplo è una neoplasia ematologica derivante dalla trasformazione neoplastica di un clone di plasmacellule. Si estrinseca clinicamente attraverso manifestazioni locali e sistemiche legate alla produzione incontrollata di immunoglobuline clonali ed all'infiltrazione midollare ed extra-midollare da parte delle plasmacellule neoplastiche. Nonostante si tratti tuttora di una patologia non guaribile, i progressi nella comprensione dei meccanismi biologici di trasformazione e l'avvento di nuovi farmaci dotati di sempre maggiore efficacia ne hanno radicalmente trasformato la prognosi, tanto che negli ultimi 15 anni la sopravvivenza media è più che raddoppiata. Inoltre, fattori prognostici considerati un tempo come negativi, oggi hanno perso la loro valenza grazie alle nuove terapie mentre nuovi approcci diagnostici, prognostici e di valutazione della malattia minima residua stanno entrando nell'uso clinico quotidiano. In questo capitolo tratteremo delle principali caratteristiche biologiche della malattia, e di quali indagini siano necessarie per porre diagnosi e inquadrare la prognosi nel paziente affetto da mieloma multiplo alla luce delle recenti acquisizioni.

## ■ BIOLOGIA

### ***Inquadramento epidemiologico ed eziologico***

Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla trasformazione e accumulo di plasmacellule (PC) neoplastiche nel midollo osseo. Rappresenta poco più dell'1% delle nuove diagnosi di cancro negli Stati Uniti d'America, ed è responsabile di circa il 17% delle

neoplasie ematologiche, con un trend in incremento (1). L'incidenza del MM è però diversa nei vari gruppi etnici e più alta nella popolazione di colore (2), a suggerire la presenza di una predisposizione genetica a sviluppare la malattia, confermata anche dalla sua maggiore incidenza in familiari di primo grado di pazienti affetti (3). Sono inoltre riconosciuti fattori esogeni che possono aumentare il rischio di sviluppare la malattia, tra cui fattori chimici (4), fisici (5), e condizioni patologiche quali malattie autoimmuni (6) e obesità (7). Tuttavia, nella gran parte dei pazienti di nuova diagnosi non sono riscontrati fattori di rischio genetico o ambientali, e si ritiene che la patogenesi del MM riconosca principalmente fattori acquisiti intrinseci alla cellula ed al microambiente, come descritto in seguito.

*Indirizzo per la corrispondenza*

Niccolò Bolli  
Via G. Venezian, 1  
20133 Milano  
E-mail: niccolo.bolli@unimi.it

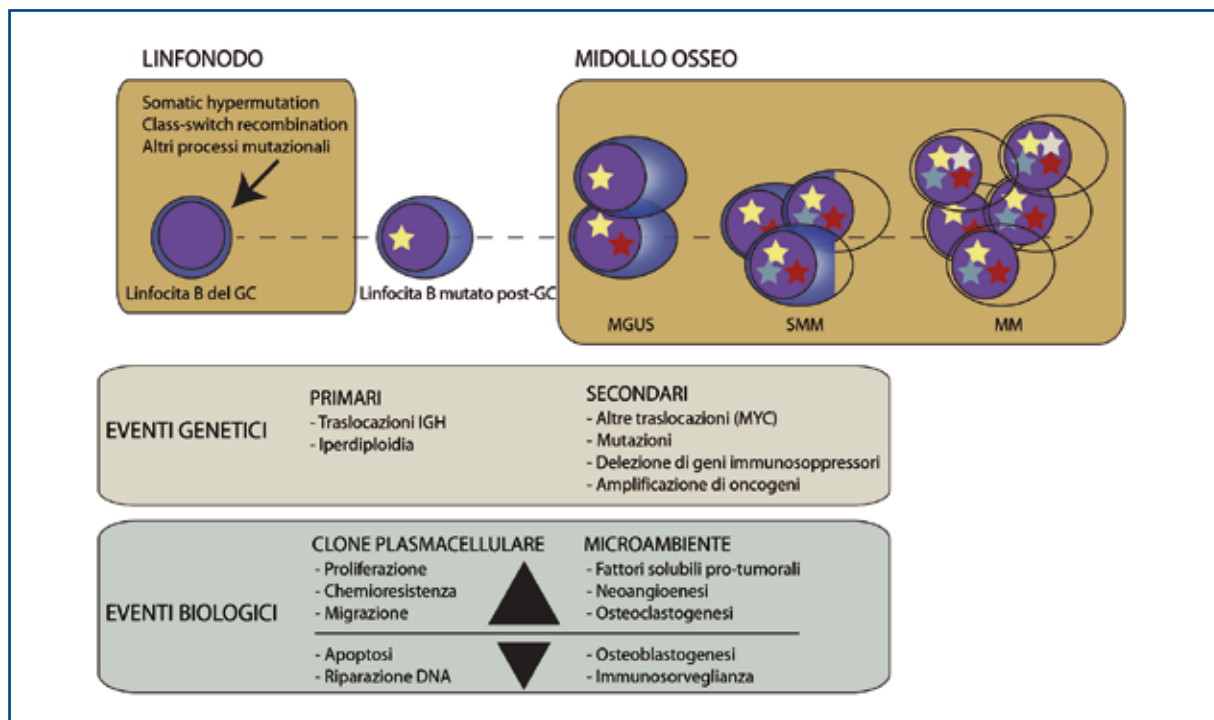
### Cellula di origine ed eventi iniziati

Il mieloma multiplo deriva da un evento trasformante a carico di un B-linfocita nel centro germinativo, come dimostra la presenza di ipermutazioni somatiche a livello della regione variabile del recettore dell'antigene, e della ricombinazione della regione costante dello stesso recettore (8). Questa cellula B-lymfocitaria migrerebbe poi nel midollo osseo, dove a seguito dell'interazione con il microambiente completerebbe il processo di differenziazione terminale a PC (9). A riprova di ciò, vari studi hanno dimostrato l'esistenza di B-linfociti a fenotipo non plasmacellulare, ma appartenenti al clone neoplastico, alla cui presenza si dovrebbe la capacità proliferativa della massa tumorale e l'origine delle recidive post-terapia (10, 11). È ormai noto che il processo trasformante non deriva da un singolo evento, ma bensì da molteplici alterazioni genomiche stocastiche, acquisite dalle cellule tumorali in modo seriale e/o parallelo (12, 13). Questo percorso di tra-

sformazione attraverso l'accumulo sequenziale di alterazioni trova un corrispettivo in clinica, dove il MM evolve da forme asintomatiche verso una malattia sempre più aggressiva, talora con crescita extramidollare, durante il suo decorso clinico (14) (Figura 1). Le forme asintomatiche di MM sono la gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS) ed il MM smoldering (SMM), definite dalla presenza di un clone plasmacellulare in assenza di danno d'organo, e differenziate tra di loro attraverso parametri clinici volti a misurare la massa di malattia come descritto in seguito. La MGUS è una patologia di riscontro molto comune, stimata intorno al 2-3% della popolazione di età >50 anni (15).

Lo studio tramite FISH e aCGH di casi di MGUS ha permesso di evidenziare in questi la presenza di anomalie citogenetiche, ed in particolare:

- Traslocazioni del locus della catena pesante delle immunoglobuline (IGH), dove un processo aberrante di ricombinazione della



**FIGURA 1 •** Patogenesi del MM. La cellula rotonda blu con nucleo viola rappresenta una cellula B normale, che esce dal centro germinativo e si differenzia in plasmacellula nel midollo osseo. L'evento iniziale (stella gialla) si ritiene avvenga nel centro germinativo, facilitato dai processi di ipermutazione somatica e ricombinazione dell'isotipo della catena pesante dell'IGH. Mutazioni successive (stelle di diversi colori) caratterizzano la trasformazione del clone plasmacellulare in MGUS, SMM e MM.

regione costante può causare la giustapposizione tra un enhancer IGH (fortemente attivo nelle PC) ed un oncogene in grado di sostenere la trasformazione neoplastica. Esistono tre gruppi di traslocazioni, in base agli oncogeni coinvolti (16):

- il gruppo di MMSET, con overespressione di MMSET in 4p16 nel 15% dei casi, e di FGFR3 nell'80% di questi;
- il gruppo delle cicline (Ciclina D1 in 11q13, 15%; Ciclina D2 in 12p13, <1%; Ciclina D3 in 6p21, 2%);
- il gruppo di MAF (MAF in 16q23, 5%; MAFB in 20q12, 2%; MAFA in 8q24.3, <1%).

- Trisomie di due o più dei cromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21, che portano ad un quadro di iperdiploidia. In questo caso, il meccanismo trasformante non è noto, ma si pensa sia legato all'iperespressione di uno o più oncogeni nei cromosomi trisomici.

Mentre la patogenesi dei casi di iperdiploidia è tuttora ignota, sembra che le traslocazioni IGH derivino da riarrangiamenti aberranti promossi da rotture del doppio filamento di DNA causati dall'enzima AID durante il processo di ricombinazione della regione costante, o meno frequentemente di ipermutazione della regione variabile, del recettore per l'antigene (17). In questo senso, il rischio di sviluppare una neoplasia plasmacellulare sarebbe intimamente connesso ai meccanismi fisiologici di generazione di diversità della risposta anticorpale nel genere umano, e questo ne spiegherebbe l'alta prevalenza nella popolazione adulta/anziana. Le anomalie citogenetiche descritte sopra sono presenti sia nella MGUS che nel MM, e sono dunque riconosciute come eventi primari, ovvero inizianti la trasformazione neoplastica del clone plasmacellulare. Tuttavia, essi non sono eventi sufficienti per sviluppare una malattia sintomatica in quanto la grande maggioranza dei casi di MGUS non ha tendenza evolutiva ed anzi rimane stabile per decenni nella maggior parte dei pazienti.

### **Progressione di malattia**

Il tasso di trasformazione da MGUS a MM è costante nel tempo e indipendente dalla durata della diagnosi di MGUS, il che suggerisce che

la progressione di malattia è determinata da un evento acquisito in modo stocastico piuttosto che da un accumulo progressivo di eventi diversi con effetto additivo (15). Ciononostante, il meccanismo di progressione non è stato dimostrato ad oggi, e sebbene sia inverosimile ipotizzare una modalità di progressione comune a tutti i casi, si ritiene che tra i possibili eventi rientrino l'acquisizione di eventi genetici secondari, la disregolazione del ciclo cellulare con conseguente aumento della capacità proliferativa delle cellule, la resistenza all'apoptosi, e cambiamenti del microambiente midollare (*Figura 1*).

### **Anomalie genetiche secondarie**

Sebbene traslocazioni IGH si riscontrino sia nelle MGUS che nel MM, la loro prevalenza aumenta con l'evolversi della malattia verso forme più aggressive. Inoltre, c'è differenza tra le traslocazioni primarie riscontrate nella MGUS, che sono in genere eventi clonali, bilanciati, che coinvolgono le regioni di ricombinazione della regione costante, e le traslocazioni secondarie nel MM, che sono subclonali, coinvolgono altre regioni dell'IGH e spesso rientrano in traslocazioni complesse con >2 cromosomi (16). Tra le traslocazioni secondarie rientrano quelle che coinvolgono l'oncogene *MYC*, aumentandone significativamente l'espressione nei casi di MM rispetto alla MGUS. Altri eventi genetici secondari riguardano delezioni in regioni di geni oncosoppressori, e tra queste la 17p13, dove si trova **TP53**, e la 1p32, dove si trova l'inibitore delle cicline *CDKN2C*. È perciò evidente che traslocazioni primarie e alterazioni secondarie hanno come effetto finale quello di aumentare le capacità proliferative della cellula, inattivando i meccanismi di controllo del ciclo cellulare. A questo proposito, è interessante notare come l'iperespressione di una ciclina D sembri essere un terminale comune di molte alterazioni, a partire da quelle dove il gene è direttamente coinvolto da una traslocazione, per continuare con le traslocazioni del gruppo MAF che hanno come effetto finale l'iperespressione di ciclina D2, e infine tramite la perdita di inibitori delle cicline D chinasi come *CDKN2A* e *CDKN2C*.

Inoltre, mutazioni di geni che regolano la via di trasduzione del segnale di MAPK sono conside-

rati eventi tardivi. Tra queste, mutazioni attivanti di **KRAS, NRAS, BRAF**, e mutazioni inattivanti di **NF1** e **RASA2** sono descritte in circa i due terzi dei casi di MM alla diagnosi (12). Infine, inattivazione di geni che regolano la via di trasduzione del segnale di NF- $\kappa$ B sono presenti in circa il 17% dei casi alla diagnosi, e tra queste mutazioni inattivanti o delezioni di *TRAF3*, *CYLD*, *BIRC2* e *BIRC3* (18).

### **Disregolazione dell'apoptosi**

Al di là delle alterazioni geniche descritte sopra, le PC neoplastiche esibiscono una disregolazione di molti processi biologici e tra questi la resistenza a segnali apoptotici. Ciò può essere ottenuto attraverso vari meccanismi, ad esempio iperespressione di Toll-Like Receptors (19) collegata al legame con ligandi non meglio identificati, iperespressione del recettore dell'IL-6 prodotta dal microambiente (20), iperespressione della molecola anti-apoptotica BCL-2 (21). Inoltre, anche i micro-RNA (miRNA) giocano un ruolo nella regolazione dei processi biologici, e iperespressione di miRNA legati alla via di trasduzione del segnale dell'IL-6, o di miRNA contro il gene pro-apoptotico BIM, è stata osservata in PC neoplastiche rispetto a PC sane, e in MM rispetto a MGUS (22).

### **Eterogeneità clonale del MM**

Diversi studi indicano che il MM è una malattia eterogenea alla diagnosi (12, 13, 23, 24). Questo significa che i processi evolutivi descritti sopra non avvengono in tutte le cellule del tumore, né avvengono in modo necessariamente sequenziale. Al contrario, una volta stabilito il clone neoplastico tramite il meccanismo di iniziazione, le varie cellule che lo compongono possono acquisire eventi aggiuntivi in maniera stocastica e indipendente l'una dall'altra. La competizione per le risorse metaboliche, e la terapia applicata, creano in questo una pressione evolutiva tra gruppi di cellule contenenti alterazioni diverse (subcloni), dalla quale può emergere di volta in volta un clone dominante diverso. Questo concetto ha profonde implicazioni cliniche, in quanto implica che la terapia applicata può alterare la spontanea tendenza evolutiva della malattia, facendo sì che la chemiosensibilità ad ogni recidiva sia di volta

in volta diversa (12, 23). Ad oggi non è pratica comune genotipizzare la malattia alla recidiva data l'assenza di marcatori di chemiosensibilità, ma l'introduzione di farmaci via via più efficaci e la disponibilità sempre maggiore di strumenti di analisi genomica suggeriscono che questo possa essere in futuro un nuovo modo di approcciarsi alla terapia del MM.

### **Ruolo del microambiente**

Alterazioni genomiche sono necessarie ma, come detto sopra, non sufficienti per lo sviluppo del MM da una fase di MGUS. Occorre che ci sia un microambiente "permissivo" che favorisca la progressione da MGUS a MM e in tal senso esiste una interazione bidirezionale fra le PC neoplastiche e il microambiente, quest'ultimo costituito da numerose componenti, cellulari e non (25, 26). Ad esempio, l'aumento della neo-angiogenesi nei pazienti con MM rispetto a pazienti con MGUS è stata da tempo documentata (27). Numerosi studi recenti hanno evidenziato il ruolo della aberrante espressione di HIF-1 $\alpha$ , HIF-2, VEGF e HGF (almeno in parte legate all'ipossia che caratterizza il midollo dei pazienti con MM) nella neo-angiogenesi (28), ma anche le diversità delle cellule endoteliali dei pazienti affetti da MM rispetto alle cellule endoteliali normali (29). Numerose altre citochine sono aumentate nel midollo dei pazienti affetti da MM e mediano un circuito di feedback positivo tra cellule tumorali e stroma, favorente la progressione neoplastica. La più rappresentativa è la IL-6, prodotta in prevalenza dalle cellule stromali, che rappresenta un vero e proprio fattore di crescita per le plasmacellule attraverso la via di MAPK, JAK/STAT e PI3K/AKT. Altre citochine coinvolte nella proliferazione plasmacellulare sono IGF-1, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17.

Una menzione a parte meritano le varie cellule immunitarie che popolano il microambiente midollare nei pazienti con MM. L'aumentata espressione del recettore inibitorio PD-1 sui linfociti T, associata all'aumentata espressione del ligando PD-L1 nelle plasmacellule mielomatose, rende ragione della anergia dell'asse T linfocitario e della conseguente tolleranza immunologica nei confronti delle plasmacellule neoplastiche (30). Peraltro questi meccanismi sono il bersa-

## KEY POINTS

## BIOLOGIA DEL MIELOMA MULTIPLO

- ✓ Sebbene il MM si manifesti con un accumulo di plasmacellule nel midollo osseo, l'evento iniziante è a carico di un linfocita nel centro germinativo, e la malattia si estrinseca dopo che la cellula trasformata migra nel midollo osseo ed interagisce con il microambiente.
- ✓ Gli eventi inizianti la trasformazione sono di natura cariotipica (iperdiploidia, traslocazioni IGH), mentre la progressione è data dall'acquisizione in modo parallelo ed indipendente di ulteriori lesioni geniche da parte delle cellule tumorali, facendo sì che il MM è una malattia eterogenea già alla diagnosi.

glio di recenti approcci terapeutici che tendono proprio a scardinare questo sistema. Inoltre, il midollo dei pazienti affetti da MM è ricco di linfociti Th17, in grado di indurre immunosoppressione soprattutto attraverso la produzione di IL-17 e IL-10 (25). Anche le cellule mieloidi rivestono un ruolo importante nel microambiente del MM. Oltre ai tumor associated macrophages (TAM), che hanno una ampia capacità di produzione di citochine (IL-6, TNF, VEGF, IL-10) (31), di recente è stata descritta una eterogenea popolazione di cellule mieloidi soppressorie (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) che vanno dalle cellule più immature fino ai neutrofili e che hanno una forte capacità immunosoppressiva soprattutto attraverso la produzione di arginasi che depleta l'ambiente di arginina, aminoacido indispensabile per l'attività dei T linfociti. Peraltro queste cellule hanno anche la capacità di differenziarsi in TAM e in osteoclasti (32, 33). Questi ultimi sono in netta prevalenza sugli osteoblasti nel microambiente patologico promosso dalle plasmacellule mielomatose, e in tal modo si giustifica la comparsa di lesioni osteolitiche nel MM, promosse da un eccessivo riassorbimento non controbilanciato da nuova apposizione di tessuto osseo. Questo sbilanciamento è promosso da citochine pro-osteoclastogeniche quali RANKL, MIP-1 $\alpha$ , IL-3, IL-6 e IL-7, e da una riduzione di citochine inibenti gli osteoclasti, quali la osteoprotegerina. Di contro l'osteoblastogenesi nel MM è ridotta a seguito della ridotta produzione di fattori che favoriscono la proliferazione osteoblastica come RUNX2, e la aumentata produzione di fattori inibenti quali DKK1, HGF e TGF- $\beta$  (34). Infine, le cellule staminali mesenchimali (MSC)

hanno un ruolo nella progressione della patologia mielomatosa. A differenza dei soggetti normali, nel MM sotto lo stimolo delle plasmacellule clonali le MSC sono in grado di secernere una grande quantità di citochine che favoriscono la proliferazione delle plasmacellule stesse (IL-6, TNF $\alpha$ , VEGF, IL-1 $\beta$ ), hanno un profilo genomico e trascrittomico alterato(35), e favoriscono la trasformazione delle cellule mieloidi in cellule ad attività immunosoppressiva (33).

## ■ DIAGNOSI

Il sospetto di MM si pone di fronte al riscontro di una componente monoclonale all'elettroforesi sieroproteica, di anemia, ipercalcemia e/o insufficienza renale, oppure in un paziente che lamenti dolori ossei in presenza di lesioni litiche. Le indagini raccomandate alla diagnosi di una discrasia plasmacellulare sono elencate nella *tabella 1*.

Come descritto nella *Tabella 1*, il MM è virtualmente sempre preceduto da una fase asintomatica e clinicamente indolente denominata MGUS(36). La condizione di MGUS è diagnosticata in presenza di una componente monoclonale <3 gr/dl e PC midollari <10%, in assenza di alcuna manifestazione clinica di mieloma (37). Sebbene il tasso di evoluzione a MM sia basso, circa dell'1% all'anno (15), fattori quali l'isotipo IgA della catena pesante, una quantità di componente monoclonale (CM) >1,5 gr/dl, un alto grado di infiltrazione midollare, un rapporto alterato tra le catene leggere libere nel siero (free light chains, FLC ratio), e la riduzione delle immunoglobuline policlonali residue rappresentano fattori di rischio per la progressione (15, 38).

Lo SMM è invece una condizione intermedia fra MGUS e MM, definita, secondo i criteri stabiliti dall'International Myeloma Working Group (IMWG) nel 2003(37), da una quantità di CM  $\geq$ 3 g/dl e/o PC midollari  $\geq$ 10%, in assenza di alcuna manifestazione clinica di mieloma. Tale condizione si riscontra circa nel 14% dei pazienti affetti da mieloma e il rischio di trasformazione in una malattia clinicamente sintomatica è stato calcolato essere del 10% all'anno, almeno per i primi 5 anni (39). Interessante notare come questo tasso di progressione possa essere influenzato dagli



**TABELLA 1** • Indagini diagnostiche consigliate nel sospetto di una discrasia plasmacellulare.

|   |
|---|
| Emocromo con formula ed esame dello striscio periferico   |
| Biochimica che includa funzionalità renale ed epatica, calcemia, albumina, LDH, beta2-microglobulina, albumina, PCR |
| Analisi delle catene leggere libere sieriche (free light chains, FLC)   |
| Elettroforesi ed immunofissazione sierica   |
| Urinalisi con elettroforesi ed immunofissazione da un campione raccolto nelle 24 ore                                |
| Biopsia e/o aspirato midollare con analisi FISH   |
| Esami radiografici dello scheletro in toto  |

stessi fattori in gioco nella MGUS, come verrà meglio descritto in seguito.

Sempre secondo i criteri IMWG del 2003, la diagnosi di MM sintomatico invece prevede la dimostrazione istologica di un infiltrato di PC in presenza di segni clinici della malattia, definiti criteri CRAB (iperCalcemia, insufficienza Renale, Anemia, lesioni osee-Bone disease) come descritto nella **tabella 2**. Da segnalare che non sono specificati limiti inferiori di CM e percentuale di PC midollari.

La distinzione tra SMM e MM è di notevole rilevanza, in quanto solo nel secondo caso si pone indicazione a trattamento. Di fatto quindi, secondo i criteri del 2003, la definizione di MM e il conseguente trattamento erano legati alla presenza di evidenti manifestazioni cliniche (CRAB). Questo modo di vedere, accettabile in un'era di limitate opzioni terapeutiche, ha subito nel tempo dei ripensamenti legati soprattutto alla impossibilità in tal modo di prevenire l'insorgenza di danno d'organo, in particolare insufficienza renale e schiacciamenti vertebrali che rappresentano eventi clinici a forte impatto non solo sulla mortalità ma anche sulla morbilità dei pazienti. Negli ultimi anni pertanto, gli sforzi diagnostici e clas-

sificativi sono stati orientati all'identificazione del sottogruppo di pazienti affetti da SMM con più alto rischio di progressione a MM, per i quali porre indicazione ad iniziare il trattamento pur in assenza di criteri CRAB. Questa evoluzione dell'approccio clinico nasce anche da una migliore definizione dei biomarkers che identificano casi più aggressivi di mieloma e dallo sviluppo di nuovi schemi terapeutici più efficaci e meno tossici.

### **Definizione della malattia ossea**

Tradizionalmente, le lesioni osteolitiche venivano identificate sulla base della radiografia convenzionale dello scheletro assile ed appendicolare, che tuttavia ha una bassa sensibilità in quanto evidenzia soltanto lesioni con perdita  $\geq 30\%$  della massa ossea. Negli ultimi anni c'è stato un significativo progresso nelle metodiche radiografiche, con un netto miglioramento della sensibilità nell'evidenziare lesioni osteolitiche. Pertanto l'IMWG (40) raccomanda che nel sospetto di mieloma tutti i pazienti vengano sottoposti ad almeno una delle seguenti metodiche: TAC total body a basso dosaggio, PET-TAC, RNM total body o della intera colonna. La dimostrazione di una lesione osteolitica con una di queste metodiche soddisfa il criterio CRAB anche se non viene evidenziata con la radiografia convenzionale a patto che la lesione sia  $\geq 5$  mm. Una aumentata captazione alla PET invece non è di per sé sufficiente per porre diagnosi di MM se non c'è evidenza di una lesione osteolitica alla parte TAC dell'esame. Nei casi di PET-TAC dubbi, viene consigliato di ripetere l'esame dopo 3-6 mesi oppure di eseguire una biopsia della lesione. Al contrario le valutazioni in densitometria ossea non devono essere prese in considerazione e la presenza di osteoporosi o anche di fratture vertebrali, in assenza di lesioni litiche, non sono sufficienti per indicare una malattia ossea. Queste considerazioni servono soprattutto ad impedire

**TABELLA 2** • Definizione delle manifestazioni CRAB.

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>Ipercalcemia</b>         | Calcio sierico $>1$ mg/dl del limite superiore di normalità, oppure $>11$ mg/dl           |
| <b>Insufficienza renale</b> | Clearance della creatinina $<40$ mL per min o creatinina sierica $>2$ mg/dl               |
| <b>Anemia</b>               | Emoglobina ridotta di $>2$ g/dl oltre il limite inferiore di normalità, oppure $<10$ g/dl |
| <b>Lesioni ossee</b>        | Una o più lesioni osteolitiche all'Rx scheletro, TC o PET-TC                              |

un eccesso di diagnosi di MM in soggetti anziani affetti da MGUS, nei quali è vi è un'alta prevalenza di osteoporosi anche grave con schiacciamenti vertebrali.

### **Definizione di insufficienza renale**

Secondo i criteri IMWG del 2003, l'insufficienza renale era definita come valori di creatininemia  $>2$  mg/dl. Recenti evidenze suggeriscono invece di valutare la funzionalità renale attraverso la determinazione della clearance della creatinina, stimata o calcolata, che rappresenta una misura più accurata del filtrato glomerulare. Pertanto i nuovi criteri IMWG definiscono come insufficienza renale valori di clearance  $\leq 40$  ml/min causati da nefropatia da deposito di catene leggere. Altre forme di danno renale come la nefropatia da amiloidosi, la malattia da deposito di immunoglobuline monoclonali e la sindrome di Fanconi, non rappresentano un criterio CRAB. Particolare attenzione deve poi essere usata nell'escludere altre cause di insufficienza renale come la nefropatia diabetica o quella secondaria a farmaci, come ad esempio antiinfiammatori assunti per il dolore osseo. Pertanto, specie quando il dosaggio delle FLC è inferiore a 500 mg/L, può essere necessario il ricorso ad una biopsia renale per escludere o confermare la diagnosi.

### **Definizione di infiltrazione plasmacellulare**

La valutazione dell'infiltrato plasmacellulare nel midollo osseo deve essere eseguita con esame morfologico di aspirato midollare e con biopsia osteomidollare. In caso di discrepanza, deve essere considerato il dato più elevato. Inoltre, la monoclonalità delle plasmacellule deve essere dimostrata da metodiche di immunoistochimica, immunofluorescenza, citofluorimetria, o analisi molecolare del riarrangiamento del locus delle immunoglobuline.

### **Altre compromissioni d'organo**

I criteri IMWG del 2003 definivano altre manifestazioni cliniche quali condizioni sufficienti a formulare la diagnosi di MM anche in assenza di altri criteri CRAB. Tali indicazioni non sono state confermate nei criteri del 2014. È stato infatti osservato che l'iperviscosità è sempre associata ad altri criteri CRAB, mentre la presen-

za di amiloidosi AL deve orientare la diagnosi verso un'amiloidosi sistemica invece che verso il MM. Inoltre, neuropatia periferica e infezioni ricorrenti rappresentano un riscontro aspecifico, specie nella popolazione anziana. Ciononostante, le manifestazioni di cui sopra obbligano il clinico ad includere una discrasia plasmacellulare nella diagnosi differenziale.

### **Nuovi criteri IMWG per la diagnosi di mieloma multiplo**

I nuovi criteri IMWG pubblicati nel 2014 (40) richiedono la presenza di uno o più "myeloma defining event" (MDE) in aggiunta alla evidenza di una plasmocitosi midollare  $\geq 10\%$  o di un plasmocitoma extramidollare per la diagnosi di MM. Gli MDE comprendono, oltre ai classici criteri CRAB, anche altri 3 specifici biomarcatori che permettono la diagnosi di Mieloma Multiplo "attivo", identificando con questo termine i pazienti che richiedono un trattamento in quanto a rischio (circa l'80%) di progressione entro due anni dalla diagnosi. Questi biomarcatori sono:

- **Plasmacellule midollari  $\geq 60\%$ :** Un'analisi della Mayo Clinic su 276 pazienti affetti da SMM, ha indicato che il 2% di essi aveva una conta delle plasmacellule midollari del 60% o oltre e per questi pazienti la mediana di sopravvivenza libera da progressione (PFS) era di 7,7 mesi (41). Tale dato è stato confermato da un successivo studio sempre della Mayo Clinic su 651 pazienti (42) e in seguito anche validato da altri gruppi (43, 44).
- **Free light chain ratio nel siero  $\geq 100$  o  $\leq 0,01$ :** Il normale rapporto fra le catene leggere  $\kappa/\lambda$  libere nel siero (serum FLC ratio) è 0,26-1,65. Diversi studi della Mayo Clinic nello SMM hanno documentato che un FLC ratio alterato conferisce un maggior rischio di progressione, fino all'82% a 2 anni ed al 93% a 3 anni in pazienti con FLC ratio  $\geq 100$  o  $\leq 0,01$  (45,46). Successivamente questi risultati sono stati confermati da altri gruppi (43, 44). Ai fini pratici, giova ricordare come l'alterato rapporto deve essere valutato a partire da una concentrazione sierica della FLC clonale di almeno 100 mg/L. Inoltre, diverse metodiche commerciali di valutazione del FLC ratio possono avere valori di riferimento non sovrapponibili (47).

■ *>1 lesione ossea focale alla risonanza magnetica nucleare (RMN):* La RMN della colonna o total body è una delle indagini raccomandate per il riconoscimento delle lesioni osteolitiche. Uno studio ha mostrato come il 70% dei pazienti con più di una lesione focale alla RMN total body ha avuto una progressione entro 2 anni (48). Tale osservazione è stata poi confermata da altri gruppi (49). I criteri IMWG raccomandano che alla RNM vengano considerate soltanto le lesioni focali e non il pattern di infiltrazione midollare diffusa che, seppur associato ad un elevato rischio di progressione, non è sufficiente per la diagnosi di MM. Allo stesso modo, se le lesioni focali sono <5 mm o equivoche, è raccomandato l'impiego di altre metodiche quali la TAC o la PET-TAC, o la ripetizione a 3-6 mesi. Infatti è proprio la tendenza alla evolutività delle lesioni che identifica i pazienti ad alto rischio, e pazienti con una RNM patologica che rimane stabile nel tempo non hanno tendenza alla progressione contrariamente ai pazienti con una RNM normale all'esordio che sviluppano successivamente una lesione focale (50).

### **Nuovi criteri IMWG per la diagnosi di mieloma multiplo Smoldering**

L'introduzione dei nuovi criteri per la diagnosi di MM ha fatto sì che lo SMM sia oggi definito dalla presenza di una componente monoclonale  $\geq 3$  g/dl e/o da infiltrato midollare  $\geq 10$  e  $< 60\%$  di plasmacellule clonali, in assenza di MDE o amiloidosi. Circa il 15% dei casi di SMM definiti secondo i vecchi criteri rientra oggi nella definizione di MM. Ciononostante, lo SMM rimane anche oggi una categoria molto eterogenea dove molti studi sono stati prodotti allo scopo di identificare i pazienti ad alto rischio di progressione. Questi studi sono stati stimolati anche dalla recente dimostrazione di un vantaggio di sopravvivenza in pazienti affetti da SMM e trattati con una combinazione di Lenalidomide e basse dosi di Desametasone (51). Per tale motivo sono stati definiti alcuni "score systems" in grado di identificare i pazienti a maggior rischio di trasformazione. I più impiegati sono quello prodotto dalla Mayo Clinic che si basa su tre

### **KEY POINTS NUOVI CRITERI PER LA DIAGNOSI DI MIELOMA MULTIPLO (MM)**

- ✓ Pazienti con  $\geq 60\%$  di plasmacellule midollari, FLC ratio  $> 100$  (con livelli di FLC di almeno 100 mg/l),  $> 1$  lesione focale alla RNM sono definiti come MM anche in assenza di danno d'organo.
- ✓ La TAC a basso dosaggio total body, la RNM e la PET-TAC sono più sensibili rispetto alla radiografia convenzionale per la dimostrazione delle lesioni ossee e devono essere considerate sia alla diagnosi che nel monitoraggio.
- ✓ Nel definire l'interessamento renale, solo la nefropatia da deposito di catene leggere è da considerare come "myeloma defining event".

parametri (componente M  $\geq 30$ g/l, plasmacellule  $\geq 10\%$ , FLC  $> 8$ ) (45) e quello concepito dal gruppo spagnolo di Salamanca che prende in considerazione l'immunoparesi e la una percentuale  $\geq 95\%$  di plasmacellule patologiche identificate in citofluorimetria (52). Con questi criteri ogni score system identifica tre gruppi di pazienti che differiscono come rischio di progressione, quantificato nel 52% a 2 anni per i pazienti a più alto rischio. Tuttavia, quando i due score systems sono stati messi a confron-

**TABELLA 3 • Criteri per la definizione di mieloma smoldering ad alto rischio.**

*Plasmacellule midollari  $\geq 10\%$  e una o più delle seguenti caratteristiche:*

- Componente monoclonale  $\geq 30$  g/l
- Componente monoclonale IgA
- Immunoparesi con riduzione delle due immunoglobuline non coinvolte
- FLC ratio  $\geq 8$  (e  $< 100$ )
- Aumento della CM  $\geq 25\%$  in due successive determinazioni in un periodo di 6 mesi
- Plasmacellule clonali nel midollo  $> 50\%$  (e  $< 60\%$ )
- Immunofenotipo plasmacellulare anormale ( $\geq 95\%$  di plasmacellule clonali) e riduzione di 1 o più immunoglobuline non appartenenti alla CM
- Traslocazione (4;14) o delezione 17p o amplificazione 1q
- Elevato numero di plasmacellule circolanti ( $> 5 \times 10^6/L$ )
- RNM con anomalie diffuse o una lesione focale
- PET-TAC con una lesione focale ipercaptante senza lesione osteolitica



to, si è registrata una concordanza di definizione del rischio solo nel 28% dei casi (53). Peraltro, l'identificazione di plasmacellule anomale alla citofluorimetria multiparametrica non è una metodica facilmente riproducibile né implementabile da tutti i centri. È evidente pertanto la necessità di nuove classificazioni del rischio per questi pazienti. Recenti studi hanno identificato numerose variabili che possono identificare i pazienti ad alto rischio di progressione (54) (**Tabella 3**) ma c'è necessità di definire parametri semplici che possano essere applicati in tutti i centri.

## ■ PROGnosi

Come descritto sul piano biologico, il MM è una malattia eterogenea anche dal punto di vista clinico, dove la sopravvivenza varia da meno di un anno a più di 10 anni. Diversi studi prognostici nel MM hanno fornito un vasto catalogo di variabili legate al paziente, alla malattia ed al trattamento che possono influenzare la sopravvivenza in modo positivo o negativo (55). Evidentemente, il valore di queste variabili è relativo alle terapie disponibili all'epoca dello studio e non è necessariamente imm modificabile nel tempo. Inoltre, fattori prognostici un tempo considerati come rilevanti possono essere successivamente sostituiti in favore di nuovi con miglior capacità predittiva, identificati da progressi nel campo della ricerca o dalla incorporazione di nuovi test diagnostici in pazienti affetti da MM.

Nonostante la possibilità di inquadrare dal punto di vista prognostico ogni nuova diagnosi, il valore di questa informazione è classicamente solo consultivo: informare il paziente della sua aspettativa di vita prevista, e comparare studi clinici. Infatti, il tipo di approccio al MM di nuova diagnosi è tuttora dipendente dalla possibilità per il paziente di essere avviato o meno a terapia mieloablative con reinfusione di cellule staminali emopoietiche, e non a fattori prognostici di malattia. Questo approccio deriva dalla indisponibilità ad oggi di terapie curative nel MM, da cui la tendenza a trattare tutti con la più intensa terapia disponibile, ma è destinato a cambiare nel breve futuro. In questa sezione, passeremo in rassegna

i fattori prognostici più rilevanti nel MM, e come questi debbano influenzare l'approccio clinico-laboratoristico alla malattia di nuova diagnosi.

### **Fattori legati al paziente**

Tra i fattori legati al paziente che predicono la prognosi, il principale è senz'altro l'età. La sopravvivenza si accorcia infatti con l'avanzare dell'età alla diagnosi, e questo vale anche per pazienti trattati con nuovi farmaci (56).

### **Fattori legati alla malattia**

I fattori legati alla malattia invece sono classicamente investigati con esami clinici, laboratoristici e radiologici alla diagnosi di MM come descritto nella **Tabella 4**.

I sistemi classificativi usati inizialmente nel mieloma multiplo prendevano in considerazione parametri clinici da usare come surrogato della massa di malattia e del danno d'organo. È questo il caso del sistema classificativo di Durie & Salomon (D&S), che divideva i pazienti in tre classi in base al livello di anemia, calcemia, proteina monoclonale nel siero e nelle urine, lesioni ossee, e insufficienza renale, con soglie più basse per mielomi IgA, classicamente considerati a prognosi peggiore (57). Successivamente, questo sistema è stato abbandonato in favore dell'International Staging System (ISS) (58). L'ISS ha una capacità predittiva superiore al D&S, e riconosce tre gruppi prognostici divi-

**TABELLA 4** • *Esami prognostici nel MM.*

#### *Indagini richieste per inquadramento prognostico*

- Albumina e beta-2 microglobulina sieriche
- FISH su cellule midollari CD138+ alla ricerca di del (17p13), t(4:14), t(14:16), amp(1q)
- LDH sierico
- Isotipo Immunoglobulina
- Morfologia plasmablastica

#### *Indagini opzionali*

- Citogenetica
- Gene expression profiling
- Labeling index delle plasmacellule
- PET total body
- SNP arrays/aCGH (ricerca di aneuploidie)
- Sequenziamento di nuova generazione (ricerca di mutazioni ricorrenti, aneuploidie e traslocazioni)

si in base ai livelli di albumina e beta2-microglobulina (B2M) (Tabella 5).

Tra i vantaggi dell'ISS e uno dei fattori che ha contribuito al suo immediato successo, c'è quello di una grande semplicità, consistendo unicamente in esami di laboratorio alla portata di tutti gli ospedali. Il sistema è talmente semplice da portare alla domanda sul perché sia così potente. Lungi dal configurare una risposta esauriente, una parziale spiegazione è che questi due parametri sono ottimi surrogati della massa e dell'aggressività biologica della malattia. In particolare, i livelli di B2M (la proteina che costituisce la catena invariante delle molecole MHC di classe I) correlano con la massa di malattia, con i livelli di funzionalità renale e con la funzionalità del sistema immune in generale. Al contrario, i livelli sistemici di IL-6 prodotta dal microambiente midollare sotto l'influsso delle cellule mielomatose influenzano negativamente la produzione di albumina a livello epatico, che di conseguenza scende quando la malattia è florida.

Con l'avanzare del progresso nelle tecniche diagnostiche, e con il progresso nell'analisi del valore prognostico delle lesioni genetiche, ci si è chiesto se anche un sistema semplice e potente come l'ISS potesse essere migliorato dall'aggiunta di un numero maggiore di variabili, incluse alcune legate direttamente alla biologia della malattia e non sue surrogate. È nato così il Revised-ISS (R-ISS) (59), il cui valore predittivo della sopravvivenza dei pazienti è superiore all'ISS, ed è indipendente dall'età e dal tipo di trattamento (tra quelli studiati).

Tra gli altri approcci prognostici legati alle caratteristiche biologiche di malattia, hanno avuto un discreto sviluppo le tecniche di gene-expression profiling (GEP), ovvero l'analisi dei livelli di espressione dei geni delle cellule mielomatose

**TABELLA 5 • ISS.**

|  |
|--|
| <b>Stadio I</b>                                  |
| • Albumina >3.5 gr/dl & B2M <3.5 mg/L            |
| <b>Stadio II</b>                                 |
| • Pazienti che non rientrano negli stadi I o III |
| <b>Stadio III</b>                                |
| • B2M >5.5 mg/L                                  |

**TABELLA 6 • R-ISS.**

|   |
|---|
| <b>Stadio I</b>   |
| ISS stadio I  |
| +<br>LDH nella norma  |
| +<br>Assenza di lesioni genetiche ad alto rischio*  |
| <b>Stadio II</b>  |
| Pazienti che non rientrano negli stadi I o III  |
| <b>Stadio III</b>   |
| ISS stadio III  |
| +<br>LDH superiore alla norma   |
| <b>oppure</b>   |
| Presenza di lesioni genetiche ad alto rischio   |
| <small>*Lesioni genetiche ad alto rischio: del(17p13), t(4;14), t(14;16) indagate con FISH in interfase</small> |

e la conseguente estrazione di patterns di ipoespressione ed iperespressione di geni specifici ("signatures") in grado di predire la sopravvivenza (60, 61). Sviluppata dai diversi gruppi indipendentemente, l'analisi di gene expression signatures non ha ancora trovato vasto utilizzo in clinica a causa della mancanza di un consenso su quale sia la signature con maggiore valore predittivo, nonché per problematiche di scarsa riproducibilità e di applicazione in diagnostica di questa metodica finora utilizzata solo in laboratori di ricerca. Il ruolo del GEP nella prognosi del MM è attualmente in esame in diversi studi prospettici ed è verosimile che in futuro esso possa trovare maggiore spazio nella pratica clinica quotidiana.

Infine, altre caratteristiche genetiche non comprese nell'R-ISS hanno un importante ruolo prognostico. Tra queste, aneuploidie quali amplificazioni del braccio lungo e delezioni del braccio corto del cromosoma 1, amplificazioni del braccio lungo del cromosoma 5 e delezioni del braccio corto del cromosoma 12 (62, 63), e mutazioni del gene **TP53** (12). A complicare ulteriormente le cose, l'osservazione che le anomalie cromosomiche non sono quasi mai isolate, ma coesistono nello stesso paziente, tanto che per un'accurata predizione prognostica sarebbe utile valutare eventuali interazioni tra di esse. Sforzi iniziali in questo senso hanno evidenziato un effetto additivo negativo nella co-esistenza, ad esempio, di

## KEY POINTS

APPROCCIO PROGNOSTICO  
AL MIELOMA MULTIPLO (MM)

- ✓ I sistemi prognostici sono destinati ad essere continuamente aggiornati in base a nuove scoperte biologiche e progressi terapeutici.
- ✓ Finalmente con il "Revised International Staging System" si è arrivati ad uno score prognostico che combina surrogati clinici del carico tumorale (ISS) e caratteristiche biologiche intrinseche della cellula.

t(4;14) e del(1p) (64).

Infine, l'avvento delle tecniche di next-generation sequencing ha aperto la strada alla possibilità di combinare variabili cliniche, laboratoristiche, cariotipiche e genomiche in nuovi modelli prognostici (65), la cui validità dovrà essere valutata in studi prospettici.

#### Fattori legati alla terapia

Molti studi indipendenti dimostrano che il raggiungimento di almeno una remissione parziale molto buona al termine della terapia di induzione predice una migliore sopravvivenza a lungo termine rispetto a risposte parziali, anche in una malattia come il MM dove le recidive sono la regola (66). Tuttavia, il rischio genetico ha un valore superiore, in quanto pazienti ad alto rischio non hanno percentuali inferiori di risposta, ma bensì tassi di recidiva più precoce (67). Al contrario, pazienti a basso rischio che ottengono una risposta insoddisfacente o una recidiva precoce devono essere considerati comunque ad alto rischio (68).

#### Fattori prognostici e fattori predittivi

Oltre ai fattori prognostici sopra descritti, sono noti alcuni fattori che hanno valore predittivo nel MM, ovvero possono predire sensibilità o resistenza della malattia a particolari farmaci, anche se la loro presenza/assenza non ha valore informativo sulla sopravvivenza in generale. Tra questi, i due esempi principali sono: le mutazioni o lesioni inattivanti del gene **TRAF3**, che predicono maggiore sensibilità al trattamento con Bortezomib (18); le mutazioni del gene **CRBN**, che predicono al contrario resistenza al trattamento con IMiDs (69). Mentre la ricerca di queste due

classi di lesioni non è ad oggi adottata nella pratica clinica quotidiana, una menzione a parte va riservata alla presenza della t(4;14), il cui effetto prognostico negativo è abrogato, o quantomeno mitigato, dal trattamento con bortezomib (70), che dovrebbe quindi essere raccomandato in induzione e consolidamento per tutti questi pazienti.

#### Strategie di trattamento adatte al rischio

Nonostante siamo in grado di predire con discreta accuratezza la categoria di rischio del paziente alla diagnosi, non c'è ancora consenso se questa informazione possa essere utilizzata per differenziare la terapia tra alto e basso rischio, riservando terapie più intense per i primi e riducendo la tossicità per i secondi. Un approccio di questo tipo è stato adottato dalla Mayo Clinic nello schema mSMART (71) ma al di fuori di questo, solo studi clinici prospettici potranno stabilire se tale approccio sarà efficace su larga scala nell'ottimizzare la tossicità ed i costi dei farmaci. Con la disponibilità di terapie in numero sempre maggiore e la possibilità futura di investigare un gran numero di lesioni genetiche di routine alla diagnosi (72, 73), l'individuazione di ulteriori fattori predittivi potrebbe in futuro migliorare l'approccio terapeutico ai pazienti, fornendo la possibilità di somministrare una terapia personalizzata e razionalizzare l'utilizzo del vasto armamentario terapeutico di nuovi farmaci attivi nel MM.

## BIBLIOGRAFIA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66: 7-30.
2. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia.* 2009; 23: 1691-7.
3. Morgan GJ, Johnson DC, Weinhold N, Goldschmidt H, Landgren O, Lynch HT, et al. Inherited genetic susceptibility to multiple myeloma. *Leukemia.* 2014; 28: 518-24.
4. Ruder AM, Hein MJ, Hopf NB, Waters MA. Mortality among 24,865 workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) in three electrical capacitor manufacturing plants: a ten-year update. *Int J Hyg Environ Health.* 2014; 217: 176-87.

5. Lewis EB. Leukemia, multiple myeloma, and aplastic anemia in american radiologists. *Science*. 1963; 142: 1492-4.
6. Lindqvist EK, Goldin LR, Landgren O, Blimark C, Mellqvist U-H, Turesson I, et al. Personal and family history of immune-related conditions increase the risk of plasma cell disorders: a population-based study. *Blood*. *American Society of Hematology*. 2011; 118: 6284-91.
7. Söderberg KC, Kaprio J, Verkasalo PK, Pukkala E, Koskenvuo M, Lundqvist E, et al. Overweight, obesity and risk of haematological malignancies: a cohort study of Swedish and Finnish twins. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 1232-8.
8. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 335-48.
9. Tricot G. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *The Lancet*. 2000; 355: 248-50.
10. Corradini P, Boccadoro M, Voena C, Pileri A. Evidence for a bone marrow B cell transcribing malignant plasma cell VDJ joined to C mu sequence in immunoglobulin (IgG)- and IgA-secreting multiple myelomas. *J Exp Med*. The Rockefeller University Press. 1993; 178: 1091-6.
11. Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008; 68: 190-7.
12. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications*. 2014; 5: 2997.
13. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer cell*. 2014; 25: 91-101.
14. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011; 364: 1046-60.
15. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002; 346: 564-9.
16. Zingone A, Kuehl WM. Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma. *Semin Hematol*. 2011; 48: 4-12.
17. Gonzalez D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007; 110: 3112-21.
18. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng W-J, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell*. 2007; 12: 131-44.
19. Mantovani A, Garlanda C. Inflammation and multiple myeloma: the Toll connection. *Leukemia*. Nature Publishing Group. 2006; 20: 937-8.
20. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*. 1993; 82: 3712-20.
21. Ong F, van Nieuwkoop JA, de Groot-Swings GM, Hermans J, Harvey MS, Kluin PM, et al. Bcl-2 protein expression is not related to short survival in multiple myeloma. *Leukemia*. 1995; 9: 1282-4.
22. Pichiorri F, Suh S-S, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *National Acad Sciences*. 2008; 105: 12885-90.
23. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012; 120: 1067-76.
24. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF, et al. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014; 28: 384-90.
25. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015; 125: 3049-58.
26. Romano A, Conticello C, Cavalli M, Vetro C, La Fauci A, Parrinello NL, et al. Immunological dysregulation in multiple myeloma microenvironment. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation. 2014; 2014: 198539-10.
27. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994; 87: 503-8.
28. Storti P, Bolzoni M, Donofrio G, Airoidi I, Guasco D, Toscani D, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  suppression in myeloma cells blocks tumoral growth in vivo inhibiting angiogenesis and bone destruction. *Leukemia*. Nature Publishing Group. 2013; 27: 1697-706.
29. Ria R, Todoerti K, Berardi S, Coluccia AML, De Luisi A, Mattioli M, et al. Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. American Association for Cancer Research. 2009; 15: 5369-78.
30. Pardoll D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 252-64.
31. Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas SK. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur J Immunol*. WILEY-VCH Verlag. 2011; 41: 2522-5.
32. Malek E, de Lima M, Letterio JJ, Kim B-G, Finke JH, Driscoll JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells:



- The green light for myeloma immune escape. *Blood Rev.* 2016; 30: 341-8.
33. Giallongo C, Tibullo D, Parrinello NL, La Cava P, Di Rosa M, Bramanti V, et al. Granulocyte-like myeloid derived suppressor cells (G-MDSC) are increased in multiple myeloma and are driven by dysfunctional mesenchymal stem cells (MSC). *Oncotarget. Impact Journals.* 2016; 5.
  34. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia. Nature Publishing Group.* 2009; 23: 435-41.
  35. Reagan MR, Ghobrial IM. Multiple myeloma mesenchymal stem cells: characterization, origin, and tumor-promoting effects. *Clin Cancer Res.* American Association for Cancer Research. 2012; 18: 342-9.
  36. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1362-9.
  37. Kyle RA, Child JA, Anderson K, Barlogie B, Bataille R, Bensinger W, et al. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: A report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol.* Blackwell Science Ltd. 2003; 121: 749-57.
  38. Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ, et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia.* 2013; 27: 208-12.
  39. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV, Landgren O, Bladé J, Merlini G, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia.* 2010; 24: 1121-7.
  40. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Bladé J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014; 15: e538-48.
  41. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *New England Journal of Medicine.* 2007; 356: 2582-90.
  42. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2011; 365: 474-5.
  43. Kastritis E, Terpos E, Moulopoulos L, Spyropoulou-Vlachou M, Kanellias N, Eleftherakis-Papaia-kovou E, et al. Extensive bone marrow infiltration and abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia.* 2013; 27: 947-53.
  44. Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, Cohen A, Vogl DT, Stadtmauer EA, et al. Classifying ultra-high risk smoldering myeloma. *Leukemia.* 2015; 29: 751-3.
  45. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood.* American Society of Hematology. 2008; 111: 785-9.
  46. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* 2013; 27: 941-6.
  47. Jacobs JFM, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? *Clin Chem Lab Med.* 2016; 54: 1021-30.
  48. Hillengass J, Fechtner K, Weber M-A, Bäuerle T, Ayyaz S, Heiss C, et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol.* American Society of Clinical Oncology. 2010; 28: 1606-10.
  49. Kastritis E, Moulopoulos LA, Terpos E, Koutoulidis V, Dimopoulos MA. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia.* 2014; 28: 2402-3.
  50. Merz M, Hielscher T, Wagner B, Sauer S, Shah S, Raab MS, et al. Predictive value of longitudinal whole-body magnetic resonance imaging in patients with smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* 2014; 28: 1902-8.
  51. Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, la Rubia de J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide plus dexamethasone versus observation in patients with high-risk smoldering multiple myeloma (QuiRedex): long-term follow-up of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 7: 1127-36.
  52. Pérez-Persona E, Vidriales M-B, Mateo G, García-Sanz R, Mateos M-V, de Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood.* American Society of Hematology. 2007; 110: 2586-92.
  53. Cherry BM, Korde N, Kwok M, Manasanch EE, Bhutani M, Mulquin M, et al. Modeling progression risk for smoldering multiple myeloma: results from a prospective clinical study. *Leuk Lymphoma.* Taylor & Francis; 2013; 54: 2215-8.
  54. Rajkumar S. Smoldering multiple myeloma. *Blood.* 2015; 125: 3069-75.
  55. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim C-S, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia.* 2014; 28: 269-77.
  56. Ludwig H, Bolejack V, Crowley J, Bladé J, Miguel JS, Kyle RA, et al. Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma.

- J Clin Oncol*. American Society of Clinical Oncology; 2010; 28: 1599-605.
57. 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: 842-54.
  58. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3412-20.
  59. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosiñol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 2863-9.
  60. Shaughnessy JD, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. American Society of Hematology. 2007; 109: 2276-84.
  61. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F, Charbonnel C, Gouraud W, Jézéquel P, et al. Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol*. American Society of Clinical Oncology. 2008; 26: 4798-805.
  62. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau J-L, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4585-90.
  63. Boyd KD, Ross FM, Walker BA, Wardell CP, Tapper WJ, Chiecchio L, et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 7776-84.
  64. Hebraud B, Magrangeas F, Cleynen A, Lauwers-Cances V, Chretien ML, Hulin C, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. *Blood*. American Society of Hematology; 2015; 125: 2095-100.
  65. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 3911-20.
  66. Harousseau J-L, Avet-Loiseau H, Attal M, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Achievement of at least very good partial response is a simple and robust prognostic factor in patients with multiple myeloma treated with high-dose therapy: long-term analysis of the IFM 99-02 and 99-04 Trials. *J Clin Oncol*. American Society of Clinical Oncology; 2009; 27: 5720-6.
  67. Barlogie B, Anaissie E, Haessler J, van Rhee F, Pineda-Roman M, Hollmig K, et al. Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma. *Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2008; 113: 355-9.
  68. Kumar S, Mahmood ST, Lacy MQ, Dispenzieri A, Hayman SR, Buadi FK, et al. Impact of early relapse after auto-SCT for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. Nature Publishing Group; 2008; 42: 413-20.
  69. Kortüm KM, Mai EK, Hanafiah NH, Shi C-X, Zhu YX, Bruins L, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood*. American Society of Hematology. 2016; 128: 1226-33.
  70. Avet-Loiseau H, LeLeu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol*. American Society of Clinical Oncology. 2010; 28: 4630-4.
  71. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*. Elsevier. 2013; 360-76.
  72. Kortuem KM, Braggio E, Bruins L, Barrio S, Shi CS, Zhu YX, et al. Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2016; 6: e397.
  73. Bolli N, Li Y, Sathiaseelan V, Raine K, Jones D, Ganly P, et al. A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2016; 6: e467.