

**Genética del Mieloma Múltiple y Macroglobulinemia de
Waldenström**

Flavia Stella^{1,2}, Estela Pedrazzini^{1,3}, Leticia Giselle Guash¹, Carmen Stanganelli⁴,
Juana Cabrera⁴, Irma Slavutsky¹

De:

1. Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina
2. Área de Genética, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Posadas, Buenos Aires, Argentina
3. Departamento Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Buenos Aires, Argentina
4. División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

Año 2021

Índice

	Pág.
2. Valor pronóstico de las anomalías genéticas en Mieloma múltiple Flavia Stella, Leticia Giselle Guash, Estela Pedrazzini, Irma Slavutsky	3
3. Inestabilidad genómica en mieloma múltiple Estela Pedrazzini, Flavia Stella, Irma Slavutsky	33
4. Estudios citogenéticos y moleculares en Macroglobulinemia de Waldenström. Carmen Stanganelli, Juana Cabrera, Irma Slavutsky.....	60

Capítulo 1

Valor pronóstico de las anomalías genéticas en mieloma múltiple.

Flavia Stella^{1,2}, Leticia Giselle Guash¹, Estela Pedrazzini^{1,3}, Irma Slavutsky¹

De:

1. Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina
2. Área de Genética, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Posadas, Buenos Aires, Argentina
3. Departamento Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Buenos Aires, Argentina

Palabras clave: Mieloma múltiple; Alteraciones citogenéticas; mutaciones

Correspondencia: Dra. Irma Slavutsky
Laboratorio de Genética de Neoplasias
Linfoides Instituto de Medicina Experimental,
CONICET- Academia Nacional de Medicina
Pacheco de Melo 3081
1425 - Ciudad de Buenos Aires
Argentina

e-mail. islavutsky@hematologia.anm.edu.ar

Resumen

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia B post centro germinal caracterizada por la proliferación clonal de células plasmáticas en la médula ósea y la detección de una inmunoglobulina monoclonal en suero u orina, la proteína M. Se origina a partir de un proceso de transformación de múltiples pasos con acumulación progresiva de eventos genéticos que favorecen la proliferación y expansión del clon maligno. A nivel citogenético, se observan anomalías primarias directamente relacionadas con la patogénesis de la enfermedad, y secundarias, que incluyen ganancias y pérdidas de material genético que aportan información de valor pronóstico adicional. Las anomalías primarias permiten dividir a los pacientes en dos grandes grupos: hiperdiploides, con ganancia de cromosomas, considerados de buen pronóstico, y no-hiperdiploides, con número modal variable, asociados a mala evolución clínica. Las anomalías secundarias incluyen: deleción 13q14/monosomía del cromosoma 13, deleción de 17p13, alteraciones del cromosoma 1, específicamente amplificaciones del brazo largo (1q) y deleciones del brazo corto (1p), así como también rearrreglos del gen *MYC* y deleciones de 12p. Un nuevo subgrupo lo constituyen los MM doble hit que incluyen pacientes con: a) inactivación bialélica de *TP53* (deleción en un alelo y mutación en el otro) y, b) estadio clínico ISS III con amplificación de 1q21 (≥ 4 copias), asociados a muy mal pronóstico. Asimismo, resulta importante mencionar la presencia de mutaciones recurrentes que impactan en diferentes caminos de señalización, sustentando la alta heterogeneidad genética y clínica presente en la patología. Sin duda, la profundización de la caracterización biológica del MM resulta de fundamental importancia en el marco de una medicina traslacional, contribuyendo a un mejor diagnóstico y/o pronóstico, y aportando información para nuevos abordajes terapéuticos.

Introducción

Los desórdenes de células plasmáticas incluyen un amplio espectro de patologías que abarcan desde una fase premaligna, denominada gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), el mieloma múltiple indolente o asintomático (MMI), el mieloma múltiple (MM) sintomático y la leucemia de células plasmáticas (LCP) (1, 2). Particularmente, el MM se caracteriza por la proliferación clonal de células plasmáticas en la médula ósea (MO) ($\geq 10\%$), la detección de una inmunoglobulina monoclonal en suero u orina, la proteína M, y daño de órgano blanco, incluyendo la presencia de anemia, lesiones óseas, hipercalcemia o insuficiencia renal (3). En la mayoría de los casos se encuentra precedido por el MGUS, caracterizado por la presencia de una población clonal de células plasmáticas en la MO menor al 10%, con niveles de secreción de proteína M inferiores a 3 g/dL en suero o < 1 g/dL en orina, sin otra manifestación clínica, y cuya incidencia es superior al 3% en individuos mayores de 50 años, con una progresión a MM del 1% por año (4, 5). Dada su condición asintomática, más del 50% de los individuos con MGUS presentan este desorden desde más de 10 años previos al diagnóstico clínico (6). El MGUS puede evolucionar posteriormente a un MMI, sin manifestaciones clínicas, pero con plasmocitosis en MO $> 10\%$ y niveles de proteína M ≥ 3 g/dL, y finalmente a MM (5). El MMI progresa a MM sintomático a una tasa de aproximadamente 10% por año durante los primeros 5 años posteriores al diagnóstico, 3% por año en los siguientes 5 años, y de 1,5% por año posteriormente (4).

El MM es la segunda neoplasia hematológica más frecuente en adultos en el mundo occidental, con una incidencia de 6,6/100000 habitantes (7). Afecta más comúnmente a individuos mayores, con una edad media al diagnóstico de 65-70 años, es más frecuente en hombres que en mujeres y presenta diferencias en su incidencia entre regiones geográficas y grupos étnicos (8). Es una enfermedad heterogénea en cuanto a su presentación clínica, respuesta a la terapia y tiempo de supervivencia (SV) (2). A nivel genético, es una patología compleja que sufre un proceso de transformación de múltiples pasos con acumulación progresiva de

eventos genéticos que favorecen la proliferación y expansión del clon maligno (1, 2, 9, 10). El estudio de las alteraciones genéticas ha permitido la definición de subgrupos específicos, y provisto las bases para la identificación de genes involucrados en la iniciación y progresión de esta entidad, siendo primordiales al momento del diagnóstico, en la progresión/recaída de la enfermedad, así como en la evaluación de la respuesta al tratamiento (1, 11).

Características citogenéticas

El análisis citogenético en MM presenta limitaciones debido al bajo índice de proliferación de las células plasmáticas, permitiendo detectar alteraciones cromosómicas en el 30-40% de los casos (1). No obstante, un trabajo reciente (12) muestra el valor pronóstico independiente del cariotipo convencional en la detección de pacientes con MM de alto riesgo, rescatando la importancia de esta técnica en el estudio de esta patología. La introducción de la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) permitió aumentar considerablemente el nivel de detección de alteraciones, llegando aproximadamente al 80% de los casos, siendo de particular importancia dada la presencia de numerosas anomalías crípticas en el MM. Las alteraciones cromosómicas en esta patología incluyen anomalías primarias, directamente relacionadas con la patogénesis de la enfermedad, y secundarias, particularmente ganancias y pérdidas de material genético, que aportan información pronóstica adicional (11, 13) y que, en conjunto, han permitido establecer diferentes grupos de riesgo.

Anomalías cromosómicas primarias

Estas alteraciones permiten identificar diferentes caminos moleculares en la patogénesis del MM. En este contexto, los pacientes pueden ser divididos en dos grandes grupos: aquellos que tienen cariotipos hiperdiploides (aproximadamente el 42-45% de los casos) y los no-hiperdiploides que presentan translocaciones que involucran al gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*) ubicado a nivel de 14q32 (35-40% de los pacientes). Asimismo, se observa un 10-15% de casos con alteraciones combinadas

(hiperdiploidía y t14q32) y un 5-10% que presenta anomalías variables, cuyo comportamiento clínico es heterogéneo (14). Más recientemente, se ha identificado un nuevo subgrupo de pacientes con cariotipo tetraploide (4n) de muy mal pronóstico (6% de los MM al diagnóstico), asociados a mayor infiltración de células plasmáticas en la MO y aumento de anomalías de alto riesgo por FISH (15).

Los **MM hiperdiploides** presentan entre 48 y 74 cromosomas y se caracterizan por mostrar múltiples trisomías, preferencialmente de los cromosomas impares 3, 5, 9, 11, 15, 19 y/o 21 (1, 16). Se los observa en individuos de mayor edad y se asocian a lesiones óseas y pronóstico favorable. Al presente, no resulta claro el mecanismo subyacente en el desarrollo del MM hiperdiploide. Este subgrupo de pacientes presenta alta heterogeneidad biológica, con casos que tienen elevados niveles de expresión de genes asociados a proliferación, en tanto que otros muestran expresión aberrante de genes relacionados con el camino de señalización de *NF-kB* (*Nuclear factor kappa B*) o sobreexpresión de *HGF* (*Hepatocyte Growth Factor*) e *IL-6* (*Interleukin-6*) (17). Asimismo, resulta de interés mencionar que no todas las trisomías se observan con la misma frecuencia, siendo la más común la trisomía 9 seguida por los cromosomas 15 y 19, y en menor frecuencia la trisomía 17 (18). Kumar et al. (19) reportan que la presencia de trisomías puede atenuar el impacto adverso de las alteraciones de alto riesgo. Simultáneamente, Chretien et al. (18) encuentran que las trisomías 3 y 5 mejoran significativamente el pronóstico de los pacientes, presentando un rol protector en casos con alteraciones de alto riesgo como t(4;14) y del(17)(p13), en tanto que la trisomía 21 lo empeora. También observaron diferencias en el comportamiento clínico entre los pacientes que tienen trisomías entre 47-50 cromosomas respecto de aquellos con hiperdiploidías superiores a los 50 cromosomas, con mejor pronóstico para estas últimas. Por el contrario, otros trabajos (20, 21) indican que la presencia de alteraciones de alto riesgo en pacientes con MM hiperdiploide impacta negativamente en el pronóstico de los mismos.

Por su parte, los **MM no-hiperdiploides** presentan un número modal variable, desde hipodiploide hasta pseudotetraploides. Constituyen también un grupo heterogéneo, con numerosos subtipos moleculares asociados a translocaciones recurrentes que involucran el locus *IGH* y cinco diferentes oncogenes: *FGFR3-MMSET* (4p16), *CCND3* (6p21), *CCND1* (11q13), *MAF* (16q23) y *MAFB* (20q12), presentando distintas implicancias en el pronóstico de la enfermedad (14, 22) (Tabla 1.1). En menor frecuencia se observan otras translocaciones del cromosoma 14, entre ellas: t(6;14)(p25;q32) y t(12;14)(p13;q32) que involucran los genes *IRF4* (*Interferon Regulatory Factor 4*) y *CCND2*, respectivamente. Todas ellas determinan la desregulación de ciclinas D, llevando a la activación del ciclo celular y aportando ventajas selectivas a los subclones que las presentan (23).

Tabla 1.1: Subgrupos de alteraciones citogenéticas en MM no-hiperdiploide

Subgrupo	Genes involucrados	Frecuencia (%)
<u>Rearreglos de ciclinas</u>		
t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1/IGH</i>	15-20
t(6,14)(p21;q32)	<i>CCND3/IGH</i>	3-6
t(12;14)(p13;q32)	<i>CCND2/IGH</i>	<1
t(4;14)(p16;q32)	<i>FGFR3-MMSET/IGH</i>	6-15
<u>Rearreglos de <i>MAF</i></u>		
t(14;16)(q32;q23)	<i>IGH/MAF</i>	4-5
t(14;20)(q32;q11)	<i>IGH/MAFB</i>	1-2
t(8;14)(q24.3;q32)	<i>MAFA/IGH</i>	<1

CCND: ciclina D; *IGH*: inmunoglobulin heavy chain; *FGFR3*: fibroblast growth factor receptor 3; *MMSET*: multiple myeloma SET domain; *MAF*: musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene

En lo que respecta a las translocaciones que involucran a los **genes de ciclinas D** (*CCND*), la más frecuente es la t(11;14)(q13;q32) que lleva a la sobreexpresión de *CCND1*, observada en el 15-20% de los pacientes al diagnóstico (1, 14). La expresión desregulada de *ciclinas* es considerada un

fenómeno generalizado ligado a los mecanismos patogénicos y el pronóstico de esta enfermedad (23). Puede ser observada en MGUS y presenta alta incidencia en LCP tanto primaria como secundaria (50-60% de los casos) (24, 25). Tiene características biológicas y clínicas distintivas, está asociada con enfermedad hipo-secretoria o no-secretoria, IgD o IgM, morfología linfoplasmocítica o de pequeñas células plasmáticas maduras, cadena liviana lambda, expresión aumentada de CD20 y pérdida de expresión de CD56 (26-30). Asimismo, estos pacientes muestran aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2 y disminución de las proapoptóticas MCL-1/BCL-XL (31), lo que los hace susceptibles al tratamiento con Venetoclax, un inhibidor de BCL-2 (32). Si bien originalmente esta translocación ha sido asociada con un riesgo estándar, estudios más recientes en la era de los nuevos agentes muestran peor evolución respecto de los casos con cariotipo y FISH normal y mejor respuesta que los pacientes con alteraciones de alto riesgo (33, 34). Un estudio de An et al. (24) encuentra que los pacientes con t(11,14) que sobreexpresan CD20 muestran una mejor supervivencia libre de progresión y supervivencia global que aquellos sin expresión. Las otras dos translocaciones que involucran genes de ciclinas son t(6;14)(p21;q32) (*CCND3*) y t(12;14)(p13;q32) (*CCND2*), de muy baja frecuencia (2% y <1%, respectivamente), y con escasa información clínica (23).

La **t(4;14)(p16.3;q32)** es la segunda translocación recíproca en frecuencia en los pacientes con MM (Figura 1.1), observada en aproximadamente el 15% de los casos (35), asociada a IgA y cadena liviana lambda. Es una translocación críptica que debe ser evaluada mediante FISH o RT-PCR. La t(4;14) determina la yuxtaposición de dos potenciales oncogenes: *MMSET* (*multiple myeloma SET domain*) y *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*), ubicados en 4p16.3, con el gen *IGH*. *MMSET* permanece en el derivado 4 y se encuentra sobreexpresado en el total de casos, en tanto que la expresión del receptor de tirosina quinasa *FGFR3* se observa en el 75% de los pacientes debido a la pérdida del derivado 14, observada en el 25% de los casos con esta alteración (36-38). *MMSET* codifica para una histona metiltransferasa con un rol central en la patogénesis del MM, asociada a progresión tumoral e inestabilidad genómica, cuya

sobreexpresión determina la demetilación de H3K36 (38-41). Por el contrario, diferentes estudios demostraron que la expresión de *FGFR3* no tiene impacto significativo en la supervivencia de los pacientes (37, 39, 40), en tanto que un análisis más reciente de expresión génica revela que los casos sin t(4;14) pero con un perfil de expresión génica *MMSET* tienen un pronóstico similar a aquellos que presentan la translocación (42). Asimismo, los pacientes con esta alteración constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a su evolución clínica (43), lo cual estaría relacionado a la presencia de diferentes puntos de ruptura sobre el cromosoma 4 que determinan distintos transcriptos de *MMSET* (37, 38), que impactarían de manera diferencial en el pronóstico de la enfermedad (44), así como a la coexistencia de otras anomalías capaces de modular el pronóstico de esta translocación (45). Particularmente, el nuevo índice pronóstico establecido por Perrot et al. [45], muestra que sólo el 29% de los pacientes con t(4;14) presentan alto riesgo citogenético, asociado a la coexistencia de alteraciones del cromosoma 1 y/o trisomía 21. Por otra parte, esta translocación tiene baja frecuencia en MGUS y en el MMI, pudiendo permanecer estable durante años antes de la progresión de la enfermedad, y se encuentra asociada con algunas anomalías secundarias como la delección de 13q, desarrollada más adelante (46).

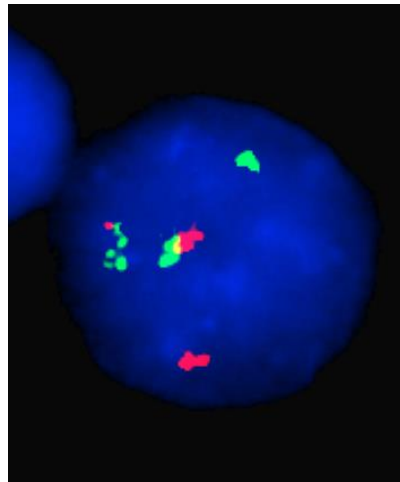


Figura 1.1: Núcleos interfásico de un paciente con MM hibridado con la sonda oncológica doble fusión ODF4p14q FGFR3-IGH (Live-Lexel, Buenos Aires, Argentina) mostrando las dos señales de fusión (rojo-verde), una señal roja correspondiente al cromosoma 4 normal y una señal verde correspondiente al cromosoma 14 normal.

Otro grupo de translocaciones lo constituyen las que involucran a los **genes MAF** (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*). Las mismas son menos frecuentes, están asociadas al isotipo IgA y se encuentran relacionadas a pronóstico adverso en MM (14). Ellas incluyen la t(14;16)(q32;q23) (5% de los casos) y la t(14;20)(q32;q11) (2%) que yuxtaponen *IGH* con los oncogenes *MAF* y *MAFB*, respectivamente (1, 14); ambas son translocaciones crípticas que deben detectarse con la técnica de FISH. Dichos genes son factores de transcripción de la familia bZIP (*basic leucine zipper*), que proviene de la superfamilia AP-1, y tienen funciones de transactivación (47-49), activándose a partir del rearreglo con el gen *IGH* (50). Estas translocaciones determinan el aumento de expresión de los genes *MAF*, lo que lleva a una sobre-expresión de *CCND2*, promoviendo la proliferación celular y afectando la regulación de la transición G1/S del ciclo celular. Asimismo, generan aumento de la expresión de la integrina $\beta 7$ que promueve la adhesión de las células de MM con las células estromales de la MO, fenómeno que se asocia con el aumento de la secreción de *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*), importante en la supervivencia de las células mielomatosas (51), y relacionado a resistencia a la apoptosis (52). Estudios de *microarrays* muestran un perfil de expresión génica similar para los genes *MAF* y *MAFB*, sustentando un camino de señalización común para ambos (53). Los puntos de ruptura de la t(14;16) se producen en el último intrón del gen *WWOX* (*WW domain containing oxidoreductase*), un conocido supresor tumoral centromérico a *MAF*, y donde se encuentra el sitio frágil FRA16D, generando su disrupción y la activación de *MAF* por parte del *enhancer* de *IGH* (54, 55). Estos pacientes presentan baja expresión de CD56, aumento de la expresión de CD20 y alteraciones cromosómicas en el cariotipo (56). Un trabajo reciente (45) no observa diferencias en la media de SV entre los pacientes que presentaban la t(14;16) y aquellos que no tenían esta alteración, señalando un interrogante sobre su significado pronóstico. Con respecto a la t(14,20), resulta interesante mencionar que su presencia en MGUS y MMI se asocia a enfermedad estable, por lo que se sugiere que la misma no sería responsable del mal pronóstico observado en los pacientes con MM, requiriendo eventos adicionales para la progresión de la enfermedad (14, 22, 46).

Alteraciones secundarias

Además de las anomalías primarias mencionadas, los desórdenes de células plasmáticas presentan alteraciones secundarias, asociadas a progresión tumoral. Entre las mismas se hallan la deleción de 13q14 (del13q14), lugar donde mapea el gen *RB1* (*Retinoblastoma*), la deleción de 17p13 (del17p13) que involucra al gen *TP53* (*Tumor Protein P53*) (10%), la ganancia/amplificación del brazo largo del cromosoma 1, fundamentalmente la banda 1q21, y la deleción de 1p32, así como las translocaciones que involucran al oncogén *MYC* (*Myelocytomatosis*) (8q24) y las deleciones de 12p (1, 14, 22).

La **del13q14** es una de las anomalías más comunes en pacientes con MM (45-50% de los casos) (57, 58); involucra al gen supresor de tumor *RB1*, regulador negativo del ciclo celular. Se la detecta también en MGUS, lo que sugeriría un rol primario en la oncogénesis temprana de la enfermedad (57, 59). Aproximadamente el 85% de los pacientes presenta monosomía 13, mientras que en el 15% restante se producen deleciones intersticiales (57, 58, 60, 61). La del13q14 presenta un alto nivel de asociación con las translocaciones que involucran *IGH* (84%), llegando al 90% de los casos que tienen la t(4;14)(p16;q32) (1). Si bien durante mucho tiempo se la consideró un marcador de pronóstico adverso, actualmente se sabe que su detección es indicativa de la presencia de hipodiploidía o translocaciones que involucran a *IGH*, siendo por lo tanto un marcador molecular de MM no-hiperdiploide (22). Simultáneamente, su detección en metafase tiene valor pronóstico, asociándose a un clon más proliferativo y mayor masa tumoral (57, 60, 62). Un trabajo reciente (63) encuentra efectos diferentes sobre la SV global y la progresión al analizar por separado los pacientes con del13q14 y aquellos que presentan monosomía 13, con efecto protector para la deleción y adverso para la monosomía, siendo necesarios más estudios para validar la implicancia de esta alteración en MM. Asimismo, análisis de expresión génica (64) muestran un peor pronóstico en los pacientes con inactivación bialélica de *RB1*, presentando valor pronóstico independiente en la recaída de la enfermedad.

La **del17p13** es considerada como el más importante factor de pronóstico adverso en MM (16, 65-68), y como una anomalía cromosómica de alto riesgo en el R-ISS (*Revised International Staging System*) (69). Se la observa en aproximadamente el 10% de los pacientes al diagnóstico y su frecuencia llega al 80% en los últimos estadios de la enfermedad, y se asocia con resistencia al tratamiento. El gen *TP53* funciona como un regulador transcripcional que participa en el control del ciclo celular, reparación y respuesta al daño del ADN y promoción de la apoptosis, siendo uno de los genes más frecuentemente mutados en cánceres humanos. Su pérdida se relaciona a enfermedad agresiva, corta supervivencia, enfermedad extramedular, hipercalcemia y compromiso del sistema nervioso central (16, 61, 65, 66, 70, 71). Se la observa en la mayoría de los casos con LCP tanto primaria como secundaria y es muy infrecuente en MGUS (65, 66, 72).

Las **anomalías del cromosoma 1**, específicamente ganancias de 1q, presentes en el 35-40% de los pacientes (73, 74) y pérdidas de 1p observadas en el 30% de los casos (75, 76), se encuentran entre las alteraciones estructurales más frecuentes en el MM, comúnmente asociadas con progresión de la enfermedad (1, 13, 14, 16, 61). En cuanto a la ganancia/amplificación de 1q, se ha descrito una región mínimamente involucrada ubicada entre 1q21.1 y 1q23.3 que contiene 679 genes e incluye entre otros a *CKS1B*, *ANP32E*, *BCL9* y *PDZK1* (61). El gen más involucrado es *CKS1B* (*CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B*) que mapea a nivel de 1q21.3; codifica para un regulador positivo del ciclo celular que activa las quinasas dependientes de ciclinas, promoviendo la proliferación celular, y también se une a *SKP2* (*S-Phase Kinase Associated Protein 2*) promoviendo la ubiquitinación y degradación proteasomal de p27^{KIP1} (77). La sobreexpresión de *CKS1B* en MM se encuentra asociada a alto nivel de proliferación y pronóstico adverso (73, 78-80). Asimismo, Stella et al. (78) detectaron mayor expresión de *CKS1B* en MM respecto de MGUS, sugiriendo un rol de este gen en la progresión de MGUS a MM. Diferentes autores evaluaron la asociación entre la expresión de *CKS1B* y el número de copias con la evolución clínica de los pacientes detectando mayor valor pronóstico en el aumento del

número de copias (78, 79) (Figura 1.2). En concordancia con estos hallazgos, trabajos recientes (81, 82) muestran peor evolución clínica de los pacientes en relación al número de copias de 1q21 y al tamaño del clon con esta anomalía. Las alteraciones de 1q21 presentan un alto grado de asociación con otras anomalías recurrentes en MM como translocaciones de *IGH*, del13q14 y del17p13, cuya presencia claramente empeora el pronóstico de los pacientes con dicha alteración (83). Simultáneamente, las anomalías de 1q han sido asociadas con la presencia de translocaciones *jumping* y un mayor nivel de inestabilidad genómica (84). Otro de los genes de posible interés en esta región es *ANP32E* (*Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member E*) ubicado en 1q21.2, un inhibidor de la fosfatasa 2A involucrado en el remodelamiento de la cromatina y la regulación transcripcional, que ha sido asociado a pronóstico adverso independiente en MM (61). Más recientemente, otros genes como *ADAR1* (*Adenosine Deaminase RNA Specific*) (1q21.3) y *MCL1* (*MCL1 Apoptosis Regulator, BCL2 Family Member*) (1q21.2) han sido propuestos como marcadores de mal pronóstico, siendo necesarios más estudios para confirmar estos datos (85, 86).

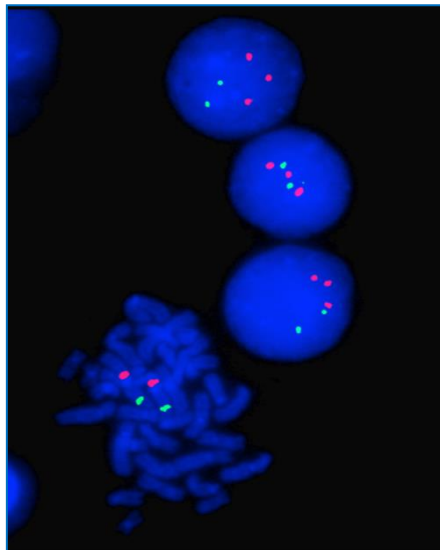


Figura 1.2: Metafase y núcleos interfásicos de un paciente con MM hibridados con la sonda OLE1p32q21 (CDKN2C-CKS1B) (Live-Lexel, Buenos Aires, Argentina) mostrando una metafase normal (dos señales verdes correspondientes a *CDKN2C* [1p32] y dos señales rojas correspondientes a *CKS1B* [1q21]) y núcleos con ganancia de 1q21 (3 copias rojas).

En cuanto a la delección de 1p, encontramos dos regiones de importancia, 1p12 y 1p32.3. La primera contiene al gen supresor tumoral *FAM46C* (*Family With Sequence Similarity 46 Member C*), cuya función es de importancia en la síntesis proteica (87) encontrándose asociado a mala evolución clínica (76). En cuanto a 1p32.3, tiene mayor frecuencia de delecciones y dos genes involucrados: *CDKN2C* (*Cyclin dependent Kinase Inhibitor 2C*) y *FAF1* (*Fas Associated Factor 1*). El primero es un inhibidor de *CDK6* (*Cyclin D dependent kinase 6*), involucrado en la regulación negativa del ciclo celular (88), en tanto que *FAF1* codifica para una proteína que participa en la iniciación de la apoptosis a través de su unión al antígeno FAS (61). La pérdida de 1p ha sido asociada con pronóstico adverso en MM, siendo más frecuente y de peor pronóstico la delección 1p32 (89, 90). Si bien no es un evento frecuente, diferentes autores han detectado delecciones homocigotas de los genes involucrados en 1p, cuya presencia se asocia a pronóstico adverso (76, 91). El análisis conjunto de estas anomalías permitió establecer grupos de riesgo citogenético que se detallan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Grupos de riesgo citogenético

<u>Alto riesgo (20-25%)</u>
t(4;14)(p16;q32) (FISH) t(14;16)(q32;q23) (FISH) t(14;20)(q32;q11) (FISH) del(17)(p13) (FISH) del(1p) (citogenética o FISH) Ganancia de 1q (citogenética o FISH) Cariotipo complejo
<u>Riesgo estándar (75-80%)</u>
Hiperdiploidía t(11;14)(q13;q32) (citogenética o FISH) t(6;14)(p21;q32) (FISH)

Modificado de Rajkumar (14)

Además de las translocaciones previamente mencionadas, los pacientes con MM pueden presentar **rearrreglos del gen MYC** (8q24), observados en, aproximadamente, el 15% de los casos recién diagnosticados, llegando al 45% durante la progresión de la enfermedad (92, 93). Simultáneamente, su sobreexpresión se asocia con formas más agresivas de la enfermedad, LCP y enfermedad extramedular (94-97). Dicho gen tiene un rol central en el crecimiento y proliferación celular, replicación del ADN, síntesis proteica y metabolismo energético (98). El mecanismo de activación se origina principalmente a través de translocaciones que involucran a los genes de las cadenas pesada y livianas de las inmunoglobulinas (50% de los casos) así como a *FAM46C*, *FOXO3*, *BMP6*, entre otros, en el 50% restante (99, 100). Diferentes estudios mostraron su activación durante la transición de MGUS a MM, indicando su implicancia en la progresión de la enfermedad, y sustentando la dependencia de las células de MM a dicho oncogén para su supervivencia (92, 93, 96, 101). Asimismo, su presencia en pacientes con cariotipos hiperdiploides constituye un factor de pronóstico adverso para este subgrupo (21). Un trabajo reciente de nuestro laboratorio (102) muestra rearrreglos de *MYC* en el 11,5% de los pacientes, significativamente asociado a la presencia de falla renal.

Otra anomalía de interés, es la **delección 12p13** (del12p13) observada en el 8-15% de los casos al diagnóstico, llegando al 24% en los pacientes con LCP (103, 104). La misma involucra particularmente al gen *CD27* (*cluster of differentiation 27*), ubicado a nivel de 12p13.31. *CD27* es miembro de la familia TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) y como otros integrantes de la misma, participa en la activación de la quinasa *JUN* (*Jun N-Terminal Kinase*) y de *NF-κB*, siendo de importancia en la producción de anticuerpos y la diferenciación de células plasmáticas (105). En MM, los niveles de *CD27* son heterogéneos, pudiendo detectarse una disminución de su expresión como consecuencia de la desregulación de la transcripción a nivel del ARN mensajero o debido a la delección de 12p (106, 107). Escasos estudios evaluaron el valor pronóstico del estatus de *CD27* en MM, y sus resultados son contradictorios: mientras que diferentes autores lo asociaron a un pronóstico adverso y una corta sobrevida (106-108), Jiang et al. (104) sostienen

que *CD27* podría no ser un marcador pronóstico por sí solo sino un indicador de inestabilidad cromosómica en MM. Estudios más recientes de perfiles de expresión génica asociaron la baja expresión de *CD27* con recaída de la enfermedad (109), en tanto que Alaterre et al. (110) detectaron que la alta expresión de cuatro genes: *CD24*, *CD27*, *CD36* y *CD302*, se encontraba asociada a más larga sobrevida, pudiendo establecer un score de riesgo de genes *CD*, que podría representar una herramienta útil en la predicción de la evolución clínica de los pacientes con MM.

Asimismo, sabemos que hay un 5-10% de los casos con alteraciones variables que involucran a los diferentes pares cromosómicos, con un comportamiento clínico heterogéneo. Un trabajo reciente (111) observa que la delección de la región variable del gen *IGH* y la amplificación de su región constante evaluadas por FISH, se encuentran asociadas a peor pronóstico y corta SV libre de progresión. Otro aspecto de importancia es la presencia de **cariotipos complejos**, originados a partir de la acumulación de cambios secuenciales capaces de desregular mecanismos genéticos relacionados al desarrollo y/o progresión de la enfermedad (13, 112). Los mismos se encuentran significativamente asociados a pronóstico adverso, constituyendo un factor pronóstico independiente y resaltando el valor del estudio citogenético en el MM (113). Estudios de nuestro Laboratorio muestran una amplia distribución de anomalías citogenéticas en los pacientes con esta patología, que involucran a todos los pares cromosómicos. Las mismas se detallan en la Figura 1.3.

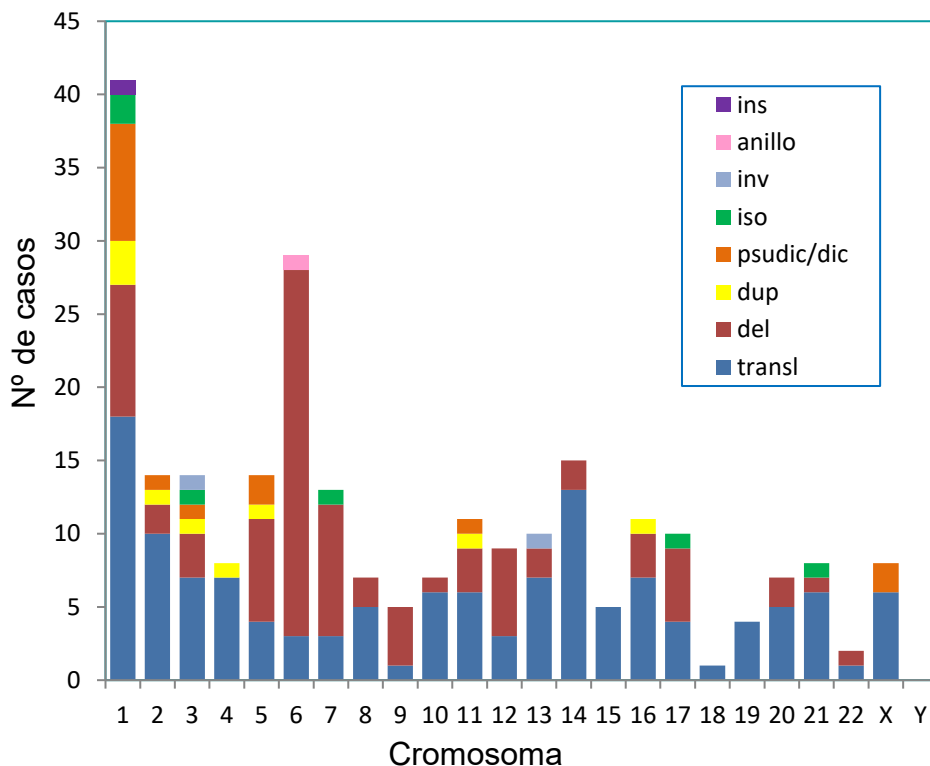


Figura 1.3: Histograma mostrando la distribución a anomalías cromosómicas en pacientes con MM de nuestro Laboratorio.

Asimismo, diferentes análisis muestran la presencia de alta **heterogeneidad clonal**, aún en estadios iniciales de la enfermedad, reflejando la alta complejidad genética de la patología. Esta característica puede seguir diferentes patrones que van desde la estabilidad clonal en algunos pacientes a la presencia de multiclonalidad en otros (9, 10, 16). Esta situación resulta de importancia dada sus implicancias a nivel del tratamiento, en el marco de una medicina adaptada al riesgo, ya que la competencia entre las diferentes poblaciones celulares podría influir en el resultado del mismo, siendo por lo tanto de sumo interés su evaluación.

MM doble *hit*

Un trabajo reciente (114) ha permitido identificar un nuevo subgrupo de pacientes con MM de alto riesgo y enfermedad muy agresiva, con características biológicas y clínicas específicas y muy corta SV libre de progresión y global a pesar de los nuevos tratamientos, denominado **MM doble *hit***. Este subgrupo corresponde a aproximadamente el 6% del total de los casos e incluye pacientes con: a) inactivación bialélica de *TP53* (deleción en un alelo y mutación en el otro) y, b) estadio clínico ISS III con amplificación de *CKS1B* (≥ 4 copias). Más recientemente, se incluyó entre los MM doble *hit* a los pacientes con **cariotipo hiperhaploide**, una alteración numérica rara, que presenta entre 24 y 34 cromosomas, corresponde al 0,25% de los casos con MM al diagnóstico (115), y afecta mayormente a individuos jóvenes (116). La presencia de cariotipos hiperhaploides es un evento muy poco frecuente en MM (117, 118), pero es observado en leucemias agudas y algunos tumores sólidos (119). En MM, el clon hiperhaploide se caracteriza por presentar monosomía de numerosos cromosomas en tanto que los cromosomas impares, asociados a trisomías en los casos hiperdiploides, permanecen disómicos. Este subgrupo de pacientes muestra con frecuencia monosomía del cromosoma 17, usualmente asociada a mutación de *TP53* en el alelo restante, llevando a inactivación bialélica de dicho gen, quedando por lo tanto incluido en el grupo de MM doble *hit* de muy alto riesgo (114). Si bien no se conoce exactamente el mecanismo de origen de estos cariotipos, diferentes autores sugieren en base a estudios secuenciales, que el cariotipo hiperhaploide se originaría por la pérdida de cromosomas a partir de un cariotipo diploide, como consecuencia de defectos en el huso mitótico y/o en los centrosomas que llevarían a una segregación anormal (114, 115).

Mutaciones

Finalmente, la introducción de la técnica de secuenciación masiva paralela (NGS; *next generation sequencing*) permitió detectar numerosas **mutaciones** en los pacientes con MM, que impactan en diferentes caminos de señalización

(Tabla 1.3). Entre ellos cabe destacar las mutaciones de los genes *RAS* (*KRAS*, *NRAS* y *BRAF*) (40% de los casos) que afectan la vía de MAPK asociada a crecimiento y supervivencia celular. En segundo lugar en frecuencia se encuentran las mutaciones de los genes que participan en la desregulación de *NF-κB*, tales como *TRAF3*, *CYLD*, *LTB*, *IKBKB*, *BIRC2*, *BIRC3*, *CARD11* y *TRAF3IP1*, que ocurren en alrededor del 20% de los casos. Ambos grupos no impactan en la progresión y SV de los pacientes.

Tabla 1.3: Mutaciones más frecuentes en MM

Gen	Frecuencia (%)	Vías de señalización/ Función
<i>KRAS</i>	20-25	MAPK/Crecimiento y supervivencia celular
<i>NRAS</i>	23-25	MAPK/Crecimiento y supervivencia celular
<i>TP53</i>	8-15	Respuesta al daño al ADN y apoptosis/gen supresor de tumor
<i>DIS3</i>	11	Endorribonucleasa exosomal
<i>FAM46C</i>	11	No definida
<i>BRAF</i>	6-15	MAPK/Crecimiento y supervivencia celular
<i>TRAF3</i>	3-6	NF-κB/Supervivencia y proliferación celular
<i>ROBO1</i>	2-5	Receptor de transmembrana/ Desarrollo celular
<i>CYLD</i>	2-3	NF-κB/Supervivencia y proliferación celular
<i>EGR1</i>	4-6	Factor de transcripción
<i>SP140</i>	5-7	Respuesta antigénica en células B
<i>FAT3</i>	4-7	Cadherina/Adhesión celular
<i>CCND1</i>	3	Progression del ciclo celular

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases; NF-κB: nuclear factor kappa B.
Modificado de Kumar & Rajkumar, 2018 (11)

Asimismo, resultan de interés las mutaciones en los genes que participan en el mecanismo de reparación del daño al ADN (*TP53*, *ATM* y *ATR*) (15% de los casos), asociadas a un pronóstico desfavorable, y las de los genes *DIS3* y

FAM46C, potenciales supresores tumorales, cuyo rol en la oncogénesis del MM no está aun completamente dilucidado (11, 16, 120). Estas mutaciones son consideradas actualmente alteraciones secundarias, de aparición tardía y contribuyen en conjunto a la evolución tumoral. Además, existe una asociación entre dichos cambios y las alteraciones recurrentes en MM, entre ellas, las mutaciones de los genes: *FGFR3*, *DIS3* y *PRKD2* con la t(4;14), de *CCND1* e *IRF4* con la t(11;14), de *MAF*, *BRAF*, *DIS3* y *ATM* con la t(14;16), de *MAFB* con la t(14;20) y de los cariotipos hiperdiploides con mutaciones de *FAM46C* (121). En cuanto al valor pronóstico, las mutaciones de *CCND1* en los casos con t(11;14) se asocian a mala evolución clínica, presentando más corta SV libre de progresión y global (100). Por el contrario, no se detectó asociación pronóstica para los genes *FGFR3*, *MAF* y *MAFB*. Resulta asimismo interesante destacar la asociación significativa de la t(11;14) con la presencia del alelo G de la variante rs9344 del primer exón de *CCND1*, que afecta su patrón de *splicing* (100).

Estos datos ponen de manifiesto la importancia de las alteraciones genéticas en la compleja heterogeneidad que caracteriza al MM y su implicancia en la presentación clínica y respuesta al tratamiento. Dicha complejidad aumenta considerablemente durante la progresión de la enfermedad con la adquisición de anomalías citogenéticas secundarias y mutaciones que se suman a las alteraciones primarias de cada subtipo, modificando el fenotipo clínico. Sin duda, la profundización de la caracterización biológica del MM resulta de fundamental importancia en el marco de una medicina adaptada al riesgo, contribuyendo a un mejor diagnóstico y/o pronóstico, y aportando información para nuevos abordajes terapéuticos.

Agradecimientos

El presente trabajo se efectuó con subsidios de Proyectos de Investigación Interinstitucionales de la Universidad de Morón y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Referencias

1. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009; 23: 2210- 21.
2. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011; 364: 1046-60.
3. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment to multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 3-9.
4. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, 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.
5. Weiss BM, Kuehl WM. Advances in understanding monoclonal gammopathy of undetermined significance as a precursor of multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 2010; 3: 165-74.
6. Therneau TM, Kyle RA, Melton III LJ, et al. Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition. *Mayo Clin Proc* 2012; 87: 1071-9.
7. Seer Cancer Statistics Review (2018). Seer Cancer Statistics Review. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available online at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/
8. Colunga-Pedraza PR, Gómez-Cruz GB, Colunga-Pedraza JE, Ruiz-Argüelles GJ. Geographic hematology: Some observations in Mexico. *Acta Haematol* 2018; 140:114-20.
9. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 335-48.
10. Corre J, Munshi N, Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? *Blood* 2015; 125:1870-6.
11. Kumar SK, Rajkumar SV. The multiple myelomas - current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15: 409-21.
12. Soekojo CY, Wang C-M, Chen Y, et al. Role of conventional karyotyping in multiple myeloma in the era of modern treatment and FISH analysis. *Clin Lymph Myeloma Leuk* 2019; 19: e470-7.
13. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Slavutsky I. Cytogenetic alterations in multiple myeloma: Prognostic significance and the choice of

- frontline therapy. *Cancer Invest* 2015; 27:1-9.
14. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2020; 95: 548-67.
 15. Sidana S, Jevremovic D, Ketterling RP, et al. Tetraploidy is associated with poor prognosis at diagnosis in multiple myeloma. *Am J Hematol* 2019; 94: e117-20.
 16. Manier S, Salem KZ, Park J, et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 100-3.
 17. Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, et al. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res* 2007; 67: 2982-9.
 18. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood* 2015; 126: 2713-9.
 19. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood* 2012; 119: 2100-5
 20. Pawlyn C, Melchor L, Murison A, et al. Coexistent hyperdiploidy does not abrogate poor prognosis in myeloma with adverse cytogenetics and may precede IGH translocations. *Blood* 2015; 125: 831-40
 21. Weinhold N, Kim D, Seckinger A, et al. Concomitant gain of 1q21 and MYC translocation define a poor prognostic subgroup of hyperdiploid multiple myeloma. *Haematologica* 2016; 101: e116-9.
 22. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J* 2015; 5: e365
 23. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular Pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest* 2012; 122: 3456-63.
 24. An G, Xu Y, Shi L, et al. t(11;14) Multiple myeloma: A subtype associated with distinct immunological features, immunophenotypic characteristics but divergent outcome. *Leuk Res* 2013; 37: 1251-7
 25. Bacher U, Haferlach T, Kern W, et al. Correlation of cytomorphology, immunophenotyping, and interphase fluorescence in situ hybridization in 381 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 301 patients with plasma cell myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 203: 169- 75

26. Garand R, Avet-Loiseau H, Accard F, Moreau P, Harousseau JL, Bataille R. t(11;14) and t(4;14) translocations correlated with mature lymphoplasmacytoid and immature morphology, respectively, in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 2032–5.
27. Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, et al. Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood* 2003; 101: 1570-1
28. Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, et al. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 1070-1.
29. Hundemer M, Klein U, Hose D, et al. Lack of CD56 expression on myeloma cells is not a marker for poor prognosis in patients treated by high-dose chemotherapy and is associated with translocation t(11;14). *Bone Marrow Transplant* 2007; 40:1033-7.
30. Feyler S, O'Connor SJ, Rawstron AC, et al. IgM myeloma: a rare entity characterized by a CD20-CD56-CD117- immunophenotype and the t(11;14). *Br J Haematol* 2008; 140: 547-51.
31. Slomp A, Peperzak V. Role and regulation of pro-survival BCL-2 proteins in multiple myeloma. *Front Oncol* 2018; 8: 533.
32. Touzeau C, Maciag P, Amiot M, Moreau P. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 2018; 32:1899-907.
33. Lakshman A, Alhaj Moustafa M, Rajkumar SV, et al. Natural history of t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia* 2018; 32: 131-8.
34. Paner A, Patel P, Dhakal B, et al. The evolving role of translocation t(11;14) in the biology, prognosis, and management of multiple myeloma. *Blood Rev* 2019; 100643.
35. Chesi M, Nardini E, Lim R, Smith K, Kuehl W, Bergsagel P. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 1998; 92: 3025-34.
36. Santra M, Zhan F, Tian E, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood* 2003; 101: 2374-6.
37. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003; 101:1520-9.

38. Keats JJ, Maxwell CA, Taylor BJ, et al. Overexpression of transcripts originating from the MMSET locus characterizes all t(4;14)(p16; q32)-positive multiple myeloma patients. *Blood* 2005; 105:4060-9.
39. Marango J, Shimoyama M, Nishio H, et al. The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. *Blood* 2008; 111: 3145-54.
40. Kuo AJ, Cheung P, Chen K, et al. NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. *Mol Cell* 2011; 44: 609-20.
41. Pei H, Zhang L, Luo K, et al. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 2011; 470: 124-8.
42. Wu SP, Pfeiffer RM, Ahn IE, et al. Impact of genes highly correlated with MMSET myeloma on the survival of non-MMSET myeloma patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 4039-44.
43. Moreau P, Attal M, Garban F, et al. Heterogeneity of t(4;14) in multiple myeloma. Long-term follow-up of 100 cases treated with tandem transplantation in IFM99 trials. *Leukemia* 2007; 21: 20204.
44. Lazareth A, Song X-Y, Coquin A. et al. MB4-2 breakpoint in MMSET combined with del(17p) defines a subset of t(4;14) multiple myeloma with very poor prognosis. *Haematologica* 2015; 100: e471-4
45. Perrot A, Lauwers-Cances V, Tournay E, et al. Development and validation of a cytogenetic prognostic index predicting survival in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2019; 37: 1657-65.
46. Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, et al. The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica* 2010; 95: 1221-5.
47. Kataoka K, Fujiwara KT, Noda M, Nishizawa M. MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 7581-91.
48. Nishizawa M, Kataoka K, Vogt PK. MafA has strong cell transforming ability but is a weak transactivator. *Oncogene* 2003; 22: 7882-90.
49. Van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, Neri A, Clevers HC, Bast BJ. Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. *Exp Hematol* 2009; 37: 78-86.
50. Eychène A, Rocques N, Pouponnot C. A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 683-93.

51. Kienast J, Berdel WE. c-maf in multiple myeloma: An oncogene enhancing tumor- stroma interactions. *Cancer Cell* 2004; 5: 109-10.
52. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, et al. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 2004; 5: 191- 9.
53. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; 108: 2020-8.
54. Jenner MW, Leone PE, Walker BA, et al. Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood* 2007; 110: 3291-300.
55. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, et al Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood* 2013; 121: 3413-9.
56. Narita T, Inagaki A, Kobayashi T, et al. t(14;16)-positive multiple myeloma shows negativity for CD56 expression and unfavorable outcome even in the era of novel drugs. *Blood Cancer J* 2015; 5: e285.
57. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 2001; 15: 981-6.
58. Chiecchio L, Protheroe RK, Ibrahim AH, et al. Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. *Leukemia* 2006; 20:1610-7.
59. Kaufmann H, Ackermann J, Baldia C, et al. Both *IGH* translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia* 2004; 18:1879-82.
60. Avet-Louseau H, Daviet A, Sauner S, Bataille R. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 2000; 111: 1116-7.
61. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010; 116: e56-65.
62. Shaughnessy J Jr, Tian E, Sawyer J, et al. Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *Br J Haematol*

2003; 120: 44-52.

63. Binder M, Rajkumar SV, Ketterling RP, et al. Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2017; 7: e600.
64. Chavan SS, He J, Tytarenko R, et al. Bi-allelic inactivation is more prevalent at relapse in multiple myeloma, identifying *RB1* as an independent prognostic marker. *Blood Cancer J* 2017; 7: 1-7.
65. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569-75.
66. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 2007; 109: 3489-95.
67. Xiong W, Wu X, Starnes S, et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood* 2008; 112: 4235-46.
68. Jovanovic KK, Escure G, Demonchy J, et al. Deregulation and targeting of TP53 pathway in multiple myeloma. *Front Oncol* 2019; 8: 665.
69. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2863-9.
70. Chang H, Sloan S, Li D, Keith Stewart A. Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions. *Br J Haematol* 2004; 127: 280-4.
71. Chang H, Qi C, Yi QL, Reece D, Stewart AK. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 2005; 105: 358-60.
72. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 1044-52.
73. Shaughnessy, J. Amplification and overexpression of *CKS1B* at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology* 2005; 10 (Suppl. 1):117-26.

74. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 2006; 108: 1724-32.
75. Chang H, X Qi, A Jiang, et al. 1p21 deletions are strongly associated with 1q21 gains and are an independent adverse prognostic factor for the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transp* 2010; 45: 117-21.
76. Boyd, K. D. 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.
77. Zhan F, Colla S, Wu X, et al. CKS1B, over expressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1- dependent and independent mechanisms. *Blood* 2007; 109: 4995-5001.
78. Stella F, Pedrazzini E, Baialardo E, Fantl DB, Schutz N, Slavutsky I. Quantitative analysis of CKS1B mRNA expression and copy number gain in patients with plasma cell disorders. *Blood Cells Mol Dis* 2014; 53:110-7.
79. Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ, et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia* 2006; 20: 2034-40.
80. Chen MH, Qi C, Reece D, et al. Cyclin kinase subunit 1B nuclear expression predicts an adverse outcome for patients with relapsed/refractory multiple myeloma treated with bortezomib. *Hum Pathol* 2012; 43: 858-64.
81. Du Ch, Mao X, Xu Y, et al. 1q21 Gain but not t(4;14) indicates inferior outcomes in multiple myeloma treated with bortezomib. *Leuk Lymphoma* 2020; 61: 1201-10.
82. Schmidt TM, Barwick BG, Joseph N, et al. Gain of Chromosome 1q Is Associated With Early Progression in Multiple Myeloma Patients Treated With Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone. *Blood Cancer J* 2019; 9: 94.
83. Grzasko N, Hus M, Pluta A, et al. Additional genetic abnormalities significantly worsen poor prognosis associated with 1q21 amplification in multiple myeloma patients. *Hematol Oncol* 2013; 31:41-8.
84. Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL, et al. Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm

- 1q. Genes Chrom Cancer 2005; 42: 95-106.
85. Teoh PJ, An O, Chung T-H, et al. Aberrant hyperediting of the myeloma transcriptome by ADAR1 confers oncogenicity and is a marker of poor prognosis. Blood 2018; 132: 1304-17.
86. Samo AA, Li J, Zhou M, et al. MCL1 gene co-expression module stratifies multiple myeloma and predicts response to proteasome inhibitor-based therapy. Genes Chrom Cancer 2018; 57: 420-9.
87. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. Nature 2011; 471: 467-72.
88. Kulkarni MS, Daggett JL, Bender TP, Kuehl WM, Bergsagel PL, Williams ME. Frequent inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p18 by homozygous deletion in multiple myeloma cell lines: ectopic p18 expression inhibits growth and induces apoptosis. Leukemia 2002; 16: 127-34.
89. Leone PE, Walker BA, Jenner MW, et al. Deletions of *CDKN2C* in multiple myeloma: biological and clinical implications. Clin Cancer Res 2011; 14: 6033-41.
90. Hebraud B, Leleu X, Lauwers-Cances V, et al. Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. Leukemia 2014; 28: 675-9.
91. Dickens NJ, Walker BA, Leone PE, et al. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. Clin Cancer Res 2010; 16: 1856-64.
92. Chng WJ, Huang GF, Chung TH, et al. Clinical and biological implications of *MYC* activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. Leukemia 2011; 25: 1026-35.
93. Holien T, Sundan A. Oncogene addiction to *c-MYC* in myeloma cells. Oncotarget 2012; 3: 739-40.
94. Chiecchio L, Dagrada GP, White HE, et al. Frequent upregulation of *MYC* in plasma cell leukemia. Genes Chrom Cancer 2009; 48: 624-36.
95. Affer M, Chesi M, Chen WD, et al. Promiscuous *MYC* locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate *MYC* expression in multiple myeloma. Leukemia 2014; 28: 1725-35.
96. Walker BA, Wardell CP, Brioli A, et al. Translocations at 8q24 juxtapose *MYC* with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. Blood Cancer J 2014; 4: e191-7.

97. Møller HEH, Preiss BS, Pedersen P, et al. Myc protein overexpression is a feature of progression and adverse prognosis in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2018; 101:585- 90.
98. Dang CV. *MYC* on the path to cancer. *Cell* 2012; 149: 22-35.
99. Dib A, Gabrea A, Glebov OK, et al. Characterization of *MYC* translocations in multiple myeloma cell lines. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008; 39: 25-31.
100. Walker BA, Wardell CP, Murison A, et al *APOBEC* family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun* 2015; 6: 6997.
101. Chesi M, Bergsagel PL. Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(S1): 108-14.
102. Guash LG, Zurita S, Lannutti L, Pantuso F, Slavutsky I, Stella F. Evaluación de desbalances genómicos en desórdenes de células plasmáticas. *Rev Inv Científicas Univ de Morón (RICUM)* 2020; 7: 33-46.
103. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4585-90.
104. Jiang N, Qi C, Yu L, et al. Analysis of chromosome 12p deletion in plasma cell dyscrasias. *Leuk Res* 2012; 36: 32-6.
105. Xie P, Kraus ZJ, Stunz LL, et al. Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:199-207.
106. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002; 99:1745–1757.
107. Morgan TK, Zhao S, Chang KL, et al. Low *CD27* expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: An immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 545-51.
108. Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, et al. *CD27* is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low *CD27* expression in patients with high-risk disease. *Br J Haematol* 2003; 121: 36-43.
109. Krzeminski P, Corchete LA, García JL, et al. Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse. *Oncotarget* 2016; 7: 80664-79.
110. Alaterre E, Raimbault S, Goldschmidt H, et al *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* gene expression for outcome prediction in patients with multiple myeloma. *Oncotarget* 2017; 8: 98931-44.

111. Rabani H, Ziv M, Lavi N, et al. Deletions and amplifications of the IGH variable and constant regions: a novel prognostic parameter in patients with multiple myeloma. *Leuk Res* 2020; 99: 106476.
112. Stella F, Pedrazzini E, Rodríguez A, et al. New recurrent chromosome alterations in patients with multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cytogenet Genom Res* 2011; 134: 249-59.
113. Nemeč P, Zemanova Z, Kuglik P, et al. Complex karyotype and translocation t(4;14) define patients with high-risk newly diagnosed multiple myeloma: results of CMG2002 trial. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 920-7
114. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* 2019; 33: 159-70.
115. Ashby C, Tytarenko RG, Wang Y, et al. Poor overall survival in hyperhaploid multiple myeloma is defined by double-hit bi-allelic inactivation of *TP53*. *Oncotarget* 2019; 10: 732- 7.
116. Peterson JF, Rowsey RA, Marcou CA, et al. Hyperhaploid plasma cell myeloma characterized by poor outcome and monosomy 17 with frequently co-occurring TP53 mutations. *Blood Cancer J* 2019; 9: 20.
117. Sawyer JR, Tian E, Shaughnessy JD Jr, et al. Hyperhaploidy is a novel high- risk cytogenetic subgroup in multiple myeloma. *Leukemia* 2017; 31: 637-44
118. Hoctor VT, Campbell LJ. Hyperhaploid plasma cell myeloma. *Cancer Genet* 2012; 205: 414-8.
119. Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Disease-associated patterns of disomic chromosomes in hyperhaploid neoplasms. *Genes Chrom Cancer* 2012; 51: 536- 44.
120. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, 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.
121. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood* 2018; 132: 587-97.

Capítulo 2

Inestabilidad genómica en mieloma múltiple

Estela Pedrazzini^{1,2}, Flavia Stella^{1,3}, Irma Slavutsky¹

De:

1. Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.
2. Departamento Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Buenos Aires, Argentina
3. Área de Genética, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Posadas, Buenos Aires, Argentina

Palabras clave: Mieloma múltiple; Inestabilidad genómica; Inestabilidad cromosómica

Correspondencia: Dra. Irma Slavutsky
Laboratorio de Genética e Neoplasias Linfoides
Instituto de Medicina Experimental,
CONICET- Academia Nacional de Medicina
Pacheco de Melo 3081
1425 - Ciudad de Buenos Aires
Argentina

e-mail. islavutsky@hematologia.anm.edu.ar

Resumen

La inestabilidad genómica es una característica observada en casi todos los tipos de cáncer y se define como una tendencia aumentada del genoma a adquirir diferentes tipos de cambios. El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por una importante heterogeneidad genética evidenciada por las numerosas alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales recurrentes primarias y secundarias presentes al diagnóstico o adquiridas durante la evolución de la enfermedad, que sustentan una importante inestabilidad genómica en la patología. En el presente capítulo analizamos diferentes mecanismos de inestabilidad genómica y sus implicancias en la progresión de los desórdenes de células plasmáticas y la resistencia al tratamiento. Entre ellos, inestabilidad cromosómica, disfunción telomérica, asincronía de replicación, inestabilidad de microsatélites, eventos mutacionales asociados a inestabilidad genómica y alteraciones epigenéticas. Sin duda, la participación de estos mecanismos en el desarrollo y progresión del MM permitirá ahondar en el conocimiento de las características biológicas de la patología, constituyendo un aporte a la generación de nuevas estrategias terapéuticas.

Inestabilidad genómica

La inestabilidad genómica es una característica observada en casi todos los tipos de cáncer y se define como una tendencia aumentada del genoma a adquirir cambios (1, 2). Incluye diversos cambios genéticos capaces de causar alteraciones de naturaleza temporaria o permanente en el genoma, cuya frecuencia, causas subyacentes y relevancia en la enfermedad varían significativamente entre los distintos tipos de neoplasias (2-4). Existen diferentes formas de inestabilidad genómica que abarcan: inestabilidad cromosómica (CIN; *chromosome instability*), de microsatélites y nucleotídica. CIN constituye la forma más común en cáncer humano y se caracteriza por la existencia de una tasa acelerada de alteraciones cromosómicas que resultan en: ganancias o pérdidas de cromosomas enteros o la presencia de aberraciones estructurales no balanceadas, durante las sucesivas divisiones celulares. La primera es numérica y varía dentro y entre las poblaciones de células tumorales, en tanto que la segunda es estructural y se define como variaciones en el número de copias de regiones subcromosómicas (5, 6). Si bien ambos tipos de alteraciones se originan a través de diferentes mecanismos celulares, los mismos se encuentran relacionados entre sí de manera tal que la presencia de CIN numérica puede inducir o acelerar CIN estructural y viceversa (7, 8). Al presente, diferentes estudios han relacionado el fenotipo CIN a defectos en diferentes procesos: reparación del ADN, control del ciclo celular, duplicación de los centrosomas, unión de los cromosomas a los microtúbulos, replicación, estabilidad de la telomerasa y modificaciones epigenéticas entre otros (9). Asimismo, la CIN contribuye a la transformación maligna mediante la alteración del número de copias génicas, ya sea generando amplificación de oncogenes o pérdida de genes supresores de tumor, favoreciendo la progresión tumoral, la recaída y resistencia al tratamiento (10, 11).

Inestabilidad en mieloma múltiple

Como vimos en el capítulo anterior, el mieloma múltiple (MM) se caracteriza

por una importante heterogeneidad genética evidenciada por las numerosas alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales recurrentes primarias y secundarias presentes al diagnóstico o adquiridas durante la evolución de la enfermedad, que sustentan una importante inestabilidad genómica en la patología (12-14). Diferentes estudios han demostrado alteraciones citogenéticas similares en la entidad predisponente, la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) y el MM sintomático, sugiriendo un modelo para la evolución de MGUS a MM basado en la inestabilidad genómica manifestada por aneuploidía como un evento de origen de alteraciones cromosómicas (15, 16). Asimismo, la acumulación de estas anomalías durante la progresión tumoral permite la expansión de clones resistentes y contribuye al desarrollo de enfermedad de alto riesgo (17, 18). En este contexto, Shammas et al. (19) reportan una elevada recombinación homóloga en líneas celulares y células de pacientes con MM, asociada a un aumento de la tasa de mutaciones y a la acumulación progresiva de eventos genéticos, determinantes de inestabilidad genómica.

Uno de los mecanismos relacionados con el desarrollo de CIN en MM es la presencia de **rupturas de ADN a nivel de 1q12**, que se asocian a la presencia de translocaciones “jumping”, capaces de inducir un alto número de rearrreglos transitorios y clonales, particularmente ganancias de 1q21 (20-23). Dicha región corresponde a la ubicación de la heterocromatina pericentromérica del brazo largo del cromosoma 1 que evidencia una importante habilidad para duplicarse a sí misma y a regiones adyacentes generando alteraciones desbalanceadas con diferentes cromosomas receptores. Una posible causa de estas duplicaciones directas o inversas y de translocaciones “jumping” ha sido atribuida a una descondensación de dicha heterocromatina pericentromérica (secuencias SatII/III) ubicada en 1q12, que permitiría mediante ciclos de ruptura y fusión (BFB; *breakage-fusion-bridges*) la recombinación y formación de trirradiales, isocromosomas, translocaciones desbalanceadas y micronúcleos conteniendo 1q. Si bien no se conoce la causa de este fenotipo citogenético, se especula que podría estar asociado a una hipometilación región-específica de 1q12 (22, 23),

región que contiene un sitio frágil y se asocia a expansiones de repeticiones de ADN satélite en diferentes neoplasias (24). En las células normales esta región permanece altamente condensada, pero en las células tumorales se descondensa y resulta propensa a rupturas y translocaciones “jumping”. Una situación similar se observa en el síndrome ICF (*immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies*) que tiene una mutación en el gen *DNMT3B* (*DNA methyltransferase 3B*) que se considera responsable de la hipometilación de la heterocromatina pericentromérica de 1q12 y de la inestabilidad de esta región (25). Si bien, en MM esta mutación no ha sido detectada, sí es conocida la presencia de un patrón de metilación aberrante asociado a progresión de la enfermedad (26, 27). Más recientemente se han sugerido otras modificaciones de la región 1q12, entre ellas una reprogramación epigenética del dominio de ADN satélite, que coincide con una demetilación global inducida por la inhibición de *DNMT* (28). Otra causa posible de esta inestabilidad se relaciona con la sobreexpresión de la enzima modificadora de la cromatina KDM4A (*Lysine Demethylase 4a*), una histona demetilasa que se une al locus BCL9, causando replicación y aumento del número de copias de 1q12 y 1q21, alterando la expresión de microRNAs y la presión selectiva (29-31). Otros estudios han relacionado esta inestabilidad con alteraciones en el procesamiento del ARN a través de la amplificación y sobreexpresión del gen *ILF2* (*Interleukin Enhancer Binding Factor 2*) que promueve tolerancia a la inestabilidad genómica y la estabilización de transcritos involucrados en recombinación homóloga, determinando un aumento de puentes nucleoplásmicos y la formación de micronúcleos (19, 32) así como el aumento de expresión del gen *ADAR1* (*Adenosine Deaminase RNA Specific*) que actúa sobre 1q21 promoviendo progresión del MM y corta sobrevida (SV) (33).

Otros mecanismos de CIN relativamente nuevos detectados en pacientes con MM son **cromotripsis, cromoplexia y ciclos de inserciones con cambio de templado** (2). **Cromotripsis** (del griego *Chomo*: cromosoma y *Thripsis*: romperse en pedazos) se define como el fenómeno en el cual se producen decenas e incluso cientos de reordenamientos cromosómicos que ocurren en un

solo evento catastrófico (34) (Figura 2.1a). Este proceso ha sido relacionado con la formación de cromosomas doble diminutos observados en diferentes tipos de neoplasias, que representan amplificación oncogénica y se manifiestan como cientos de copias en una misma célula. También puede ocurrir como resultado de una segregación errónea de cromosomas dicéntricos originados a partir de fusiones telomérica (35). El fenómeno de cromotripsis se observa en el 2%-3% de los tumores primarios, y constituye un modelo alternativo en el desarrollo tumoral frente a la adquisición progresiva de mutaciones. Empleando la técnica de array de SPN (*single nucleotide polymorphism*) se observó la presencia de cromotripsis en el 1,3% de los pacientes con MM, los que representarían una entidad biológica diferente de alto riesgo (36), probablemente relacionada con la desregulación de un gran número de genes. Estudios posteriores, efectuando el análisis secuencial del genoma mediante NGS (*next generation sequencing*) (37) permitieron observar la presencia de cromotripsis en el 36% de los genomas analizados, siendo un evento temprano en la patogénesis del MM. No obstante, en algunos casos se encontraron evidencias de cromotripsis tardía, asociada a progresión de la enfermedad. Un estudio reciente (38) asocia por primera vez la presencia de cromotripsis con pronóstico adverso, observando una significativa corta supervivencia libre de progresión y global en los pacientes con MM con esta variante genómica estructural respecto de aquellos que no la presentan. Por su parte, **cromoplexia** es un evento genético catastrófico que lleva a rearrreglos de segmentos desordenados de múltiples cromosomas (Figura 2.1b). El mismo resulta de la ocurrencia simultánea de DSB (*doble strand breaks*) en numerosos cromosomas, que se reordenan incorrectamente, originando una cadena de rearrreglos balanceados (2). La cromoplexia se observa en el 10% de los MM y constituye un evento tardío asociado a progresión de la enfermedad (37). En cuanto a los **ciclos de inserciones con cambio de templado**, es un mecanismo de reparación de la replicación del ADN en el que la ADN-polimerasa repetidamente cambia su cadena molde de replicación obstaculizando la progresión de la horquilla de replicación, determinando múltiples translocaciones concatenadas que originan alteraciones en el número de copias en numerosos

cromosomas (2). Este mecanismo determinaría que las diferentes copias sean ubicadas juntas en el ADN de uno de los cromosomas involucrados, originando ordenamientos génicos defectuosos y con deleciones en los puntos de fusión. Este mecanismo ha sido observado en el 20% de los genomas de MM analizados (37).

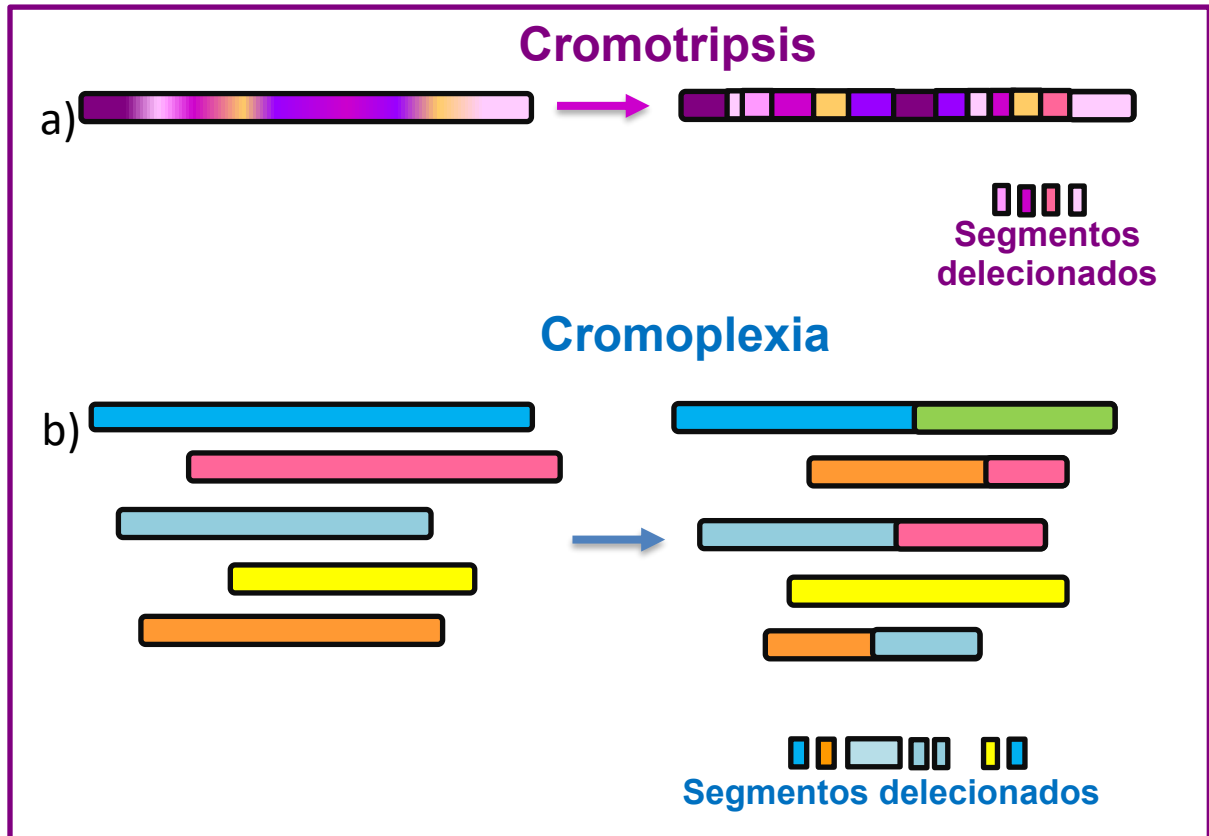


Figura 2.1: Representación esquemática de los rearrreglos cromosómicos que ocurren como consecuencia de: a) cromotripsis y, b) cromoplexia. Modificado de Shen (39).

Disfunción telomérica

Los **telómeros** son regiones de ADN no codificante ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están constituidos por secuencias de ADN altamente conservadas, repetidas en tándem (TTAGGG) y asociadas a proteínas específicas. Cumplen un rol fundamental en la protección del ADN de

la acción de enzimas degradativas y de las fusiones terminales, preservando la estabilidad e integridad cromosómica. Por otra parte, determinan importantes interacciones entre los cromosomas y la matriz nuclear, influyendo en la localización de los mismos en el núcleo, el apareamiento de los cromosomas homólogos y su movimiento durante la división celular. Asimismo, ejercen efectos sobre la transcripción de genes situados en regiones subteloméricas e interactúan con los mecanismos regulatorios del ciclo celular (40).

Los telómeros disfuncionales, críticamente acortados, determinan la activación de los mecanismos de respuesta del daño al ADN, siendo considerados una de las causas de inestabilidad genómica (41). Diferentes estudios han demostrado que el acortamiento telomérico contribuye directamente a la presencia de alteraciones cromosómicas usualmente encontradas en diversos tipos de cáncer. Datos de la literatura identifican numerosos factores que aumentan la probabilidad de que los telómeros cortos se fusionen o asocien a otros extremos cromosómicos, incluyendo la reducción crítica en el número de repeticiones teloméricas y la presencia de mutaciones en los genes que codifican para proteínas que regulan la longitud telomérica (LT) (42-44). Precisamente, esta reducción telomérica conduciría a la formación de fusiones entre cromosomas mediante ciclos de BFB (*breakage-fusion-bridge*) que finalmente resultarán en nuevos rearrreglos genéticos característicos de las células neoplásicas (45, 46).

En este contexto, el mantenimiento de la LT es de suma importancia en la tumorigénesis y la inmortalización celular y se encuentra fuertemente implicado en el origen de CIN. El mismo depende de la interacción entre la enzima telomerasa y la maquinaria de replicación del ADN. La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico que se encuentra constituido por dos subunidades: TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) que presenta actividad catalítica de transcriptasa reversa y TERC (*Telomerase RNA Component*) que provee el molde para la adición de nuevas repeticiones teloméricas al extremo 3' de simple cadena (47, 48). En humanos, la telomerasa se encuentra ausente en la mayoría

de las células somáticas normales, presenta bajos niveles en poblaciones celulares con alto potencial proliferativo como linfocitos activados, células de las criptas intestinales, entre otras, y muestra altos niveles de expresión en células germinales, *stem* y tumorales, así como en líneas celulares inmortalizadas (49). La estabilización de la LT por activación de la telomerasa se observa en el 85% de todas las formas de cáncer humano, sugiriendo un rol para esta enzima durante la progresión tumoral. No obstante, existen células tumorales telomerasa deficientes que presentan un mecanismo alternativo de alargamiento telomérico, denominado ALT (*alternative lengthening of telomeres*) basado en recombinación homóloga (50, 51). Recientemente, el hallazgo de mutaciones en la región promotora del gen *TERT* en tejidos tumorales con bajo índice de replicación, provee un nuevo mecanismo de reactivación de la telomerasa en cáncer. Se cree que estas mutaciones generan un sitio de unión para el factor de transcripción ETS (*E- twenty-six*), causando un aumento en la expresión de *TERT* y afectando a la LT (52).

Diferentes trabajos han evaluado la LT y la actividad de telomerasa en pacientes con MM (53-58). Distintos autores (55, 56) muestran la presencia de acortamiento telomérico en MM y su asociación significativa con la presencia de cariotipos anormales. Cotliar et al. (55) también detectan asociación significativa con la presencia de asociaciones teloméricas en tanto que Wu et al. (56) encuentran correlación entre el aumento de la actividad de telomerasa, la reducción del tamaño telomérico y la presencia de anomalías cromosómicas, particularmente alteraciones del cromosoma 13 y duplicación del cromosoma 3 (en cuyo brazo largo mapea el gen *TERC*: 3q26.2). Estos reportes sugieren que la combinación de telómeros cortos y aumento de la actividad de telomerasa definiría a un subgrupo de pacientes con mal pronóstico. En este contexto, la asociación de cariotipos anormales con reducción telomérica sustenta la importancia de este mecanismo en el desarrollo y progresión de la enfermedad (56, 58). En concordancia con estos datos, Hyatt et al. (57) demostraron, a través de un modelo multivariado, que la LT y la edad serían factores pronóstico importantes a incluir en el ISS (*International Staging System*) para una mejor

estadificación del MM, considerando a la LT como un crítico determinante de la SV en esta patología. Datos de nuestro grupo muestran también asociación entre acortamiento telomérico e integrantes de los complejos protector (*shelterin*) y no protector (*no-shelterin*) de los telómeros. Particularmente, Panero et al. (59, 60) encuentran asociación inversa entre la expresión de *TRF2* (*Telomeric Repeat Binding Factor 2*), *TANK1* (*Tankyrase*) y *DKC1* (*Dyskerin 1*) con la LT, sustentando la participación de otros mecanismos, además de la telomerasa, en el mantenimiento del tamaño e integridad telomérica en MM, y sus implicancias en el desarrollo de inestabilidad genómica.

Asincronía de replicación (AR)

Como sabemos, la replicación del genoma es un proceso esencial que garantiza la copia precisa de la información genética antes de la división celular. Cada ciclo de replicación representa una oportunidad de error que conduce a la adquisición de mutaciones y de alteraciones del número de copias (61). La sincronización del programa de replicación del ADN es un proceso altamente organizado con algunos locus de replicación temprana y otros de replicación tardía durante la fase S del ciclo celular (62). Asimismo, existe una estrecha asociación entre el intervalo específico de tiempo durante la fase S en el cual una secuencia particular de ADN se replica en un determinado tejido y su actividad transcripcional, considerándose de replicación temprana los loci que se están expresando en ese tejido y de replicación tardía los que no se expresan (63). Diferentes estudios muestran que las neoplasias están acompañadas de una disrupción del orden temporal de la replicación alélica, observándose que algunos genes implicados en el desarrollo maligno replican sincrónicamente en células diploides normales, en tanto que evidencian un marcado grado de asincronía de replicación (AR) en células neoplásicas (64, 65). Dicha AR, entendida como la pérdida temporal del control de la replicación puede generar cambios genéticos como aneuploidías y epigenéticos, como inactivación alélica, equivalente a la pérdida de heterocigosidad, que llevarían al silenciamiento de genes supresores de tumor o a la activación oncogénica (64-66). La AR puede

ser detectada mediante la técnica de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*), constituyendo una herramienta sensible para evaluar el momento de replicación de segmentos específicos del genoma. Por lo tanto, es factible distinguir una secuencia de ADN no replicada en un núcleo interfásico como una única señal fluorescente (S) mientras que la secuencia replicada se visualiza como una señal doble (D). De esta manera, en una población de células en división, una alta frecuencia de núcleos con dos señales de hibridación similares indicaría que el par de alelos replica sincrónicamente, en tanto que aquellos núcleos que contienen dos diferentes señales de hibridación (SD) muestran la presencia de AR (Figura 2.2). Esta metodología permite estimar la sincronización de la replicación de un alelo respecto de su contraparte en una misma célula.

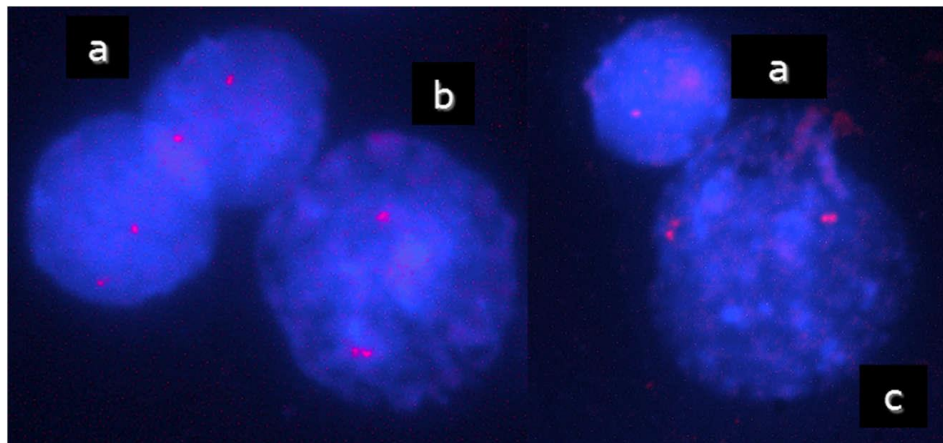


Figura 2.2: Núcleos interfásicos hibridados con la sonda RB1 13q14 (Live-Lexel, Buenos Aires, Argentina) mostrando asincronía de replicación: a) replicación sincrónica temprana: dos señales simples (SS); b) replicación asincrónica: una señal simple y una doble (SD); c) replicación sincrónica tardía: dos señales dobles (DD).

Existe poca información en la literatura respecto de la presencia de AR en pacientes con desórdenes de células plasmáticas. Amiel et al. (67) evaluaron AR en los loci *TP53* (17p13), *RB1* (13q14) y 21q22 en pacientes con MM y MGUS encontrando un aumento significativo del porcentaje de células asincrónicas en MM respecto de controles, con valores intermedios para el MGUS, indicando un

rol para la AR en la progresión de MGUS a MM. Un trabajo reciente de nuestro grupo (68), analiza la AR en los loci *TP53* y *RB1* en pacientes con MM con cariotipo y FISH normal respecto de aquellos con delección de estos genes y de pacientes con cariotipo anormal. Este análisis permitió detectar un aumento significativo del porcentaje de células asincrónicas en los casos con delección de *TP53* y *RB1* respecto de pacientes con cariotipo y FISH normal, así como en aquellos con cariotipo anormal respecto de controles (Figura 2.3a y 2.3b), sustentando una estrecha asociación entre las modificaciones en la AR y la adquisición de alteraciones genéticas e inestabilidad genómica en esta patología.

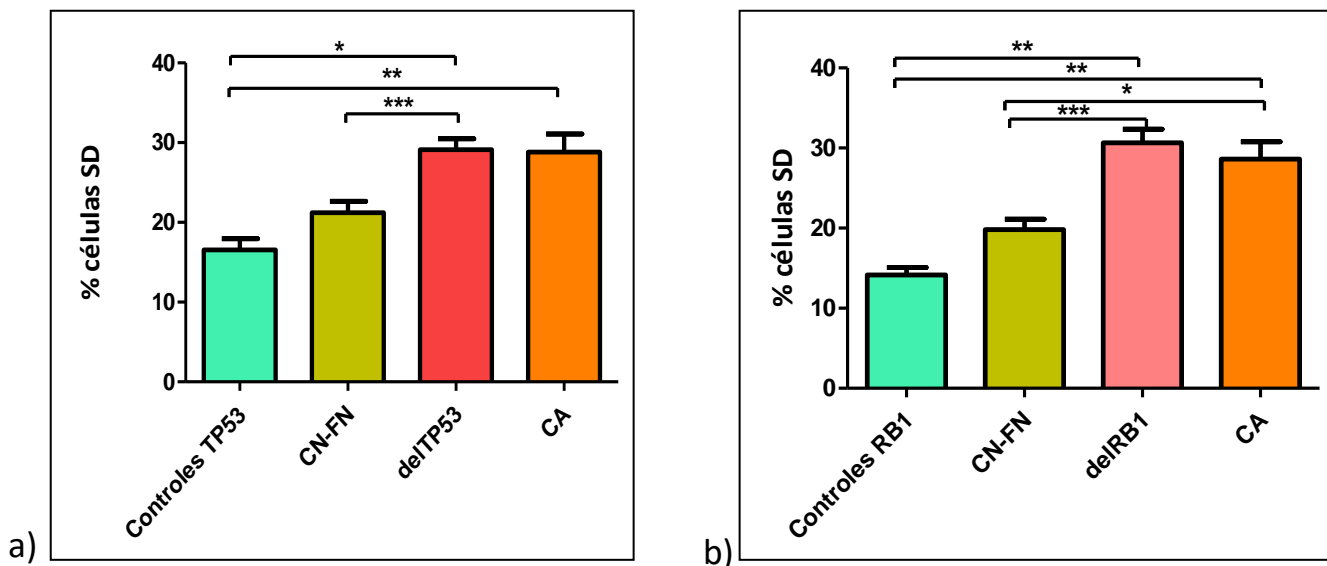


Figura 2.3: Histogramas mostrando la distribución de células con asincronía de replicación (AR) en pacientes con MM con y sin alteraciones citogenéticas y/o citomoleculares y controles. a) Análisis de AR del gen *TP53*. Diferencias significativas entre: * Pacientes con delección de *TP53* (delTP53) respecto de controles ($p < 0,001$); ** Pacientes con cariotipo anormal (CA) respecto de controles ($p < 0,005$), *** pacientes con delTP53 respecto de aquellos con cariotipo y FISH normal (CN-FN) ($p < 0,0015$). b) Análisis de AR del gen *RB1*. Diferencias significativas entre: * Pacientes con CA respecto de aquellos con CN-FN ($p < 0,0025$); ** Pacientes con delección de *RB1* (delRB1) respecto de controles ($p < 0,002$); ** Pacientes con CA respecto de controles ($p < 0,002$); *** Pacientes con delRB1 respecto de aquellos con CN-FN ($p < 0,00025$).

Inestabilidad de microsatélites

Otra forma de inestabilidad genómica es la denominada **inestabilidad de microsatélites (MSI)**. Los microsatélites son secuencias cortas de ADN, de uno a seis pares de bases, repetidas en tándem a lo largo del genoma eucariota. La MSI se caracteriza por una disminución o aumento en la longitud de los microsatélites en el ADN tumoral, en comparación con el ADN normal. y se asocia a un incremento en la frecuencia de mutaciones puntuales (69, 70). Esta alteración puede ser corregida por las enzimas codificadas por los genes de reparación del ADN (*MMR: mismatch repair*), por lo que la detección de MSI es considerada un desorden de los genes MMR, que impide que los errores de replicación cometidos por la ADN-polimerasa sean reparados, lo que determina una mayor tasa de mutación, particularmente en las regiones de microsatélites, y la aparición de un fenotipo mutador.

MSI ha sido relativamente poco estudiado en MM. Un primer reporte de Velangi et al. (71) detectó la presencia de MSI en el 7,7% de los casos con MGUS/MM asintomático, en el 20,7% en aquellos con MM sintomático/leucemia de células plasmáticas y en el 12,5% de los pacientes en recaída, indicando un incremento de la inestabilidad genómica durante la progresión de la enfermedad. Por su parte, Timurağaoğlu et al. (72) observaron MSI en el 54% de los pacientes con MM al momento del diagnóstico, aunque sin encontrar asociación con factores pronóstico de la patología. Un trabajo más reciente (73) empleando la técnica HRFMA (*high resolution fluorescent microsatellite analysis*), detecta una frecuencia mucho menor (10%) en pacientes con MM, siendo en todos los casos alteraciones de Tipo A (con cambios de hasta 6 pares de bases) (74). Si bien, el número de casos evaluados al presente es limitado, los resultados obtenidos confirman que el fenotipo mutador está presente en el MM, siendo necesario más estudios para confirmar estos hallazgos.

Eventos mutacionales asociados a inestabilidad genómica

Además de los mecanismos previamente expuestos, en MM también

resulta de importancia la inestabilidad genómica a nivel nucleotídico, caracterizada por sustituciones de base y pequeñas inserciones/delecciones (indels) que involucran tanto el genoma codificante como el no-codificante (75). En algunos casos estas mutaciones generan firmas mutacionales distintivas que pueden afectar diferentes caminos de señalización, cuyo desarrollo lleva a progresión de la enfermedad y promueve la resistencia al tratamiento. El desarrollo de las técnicas de NGS junto con la aplicación de modernos algoritmos computacionales ha permitido ahondar en el conocimiento de las firmas mutacionales del MM, habiéndose identificado al menos 17 firmas, algunas de las cuales resultan de particular importancia en relación al desarrollo de inestabilidad genómica: 1) la desaminación de metilcitosinas en el contexto de dinucleótidos CpG; 2) un patrón localizado de hipermutaciones en regiones adyacentes a rearrreglos genómicos, denominado kataegis; 3) mutaciones relacionadas a la actividad aberrante de *APOBEC* (*apolipoprotein B mRNA editing, catalytic polypeptide-like*); 4) mutaciones relacionadas a la actividad aberrante de *AID* (*activation-induced cytidine deaminases*) (76-78).

La primera firma mutacional mencionada es frecuente en numerosos tipos de neoplasias y se encuentra enriquecida en transiciones C>T en el contexto de dinucleótidos CpG, que ocurren como resultado de la desaminación de citosinas metiladas a timinas, y es observada con alta frecuencia en los pacientes con MM (76, 79, 80).

Kataegis se define como un patrón de hipermutación localizado en una determinada región de rearrreglo genómico, y se caracteriza por la presencia de clústeres de transiciones C>T y/o transversiones C>G en el contexto de trinucleótidos TpCpN, que se producen sobre la misma cadena de ADN (76). Los focos pueden ser desde unos pocos a varios miles y se localizan en la vecindad de rearrreglos genómicos. Si bien no está totalmente clarificado, se considera que uno de los miembros de la familia APOBEC estaría involucrada en la generación de kataegis. En MM se observó una asociación con las translocaciones que involucran principalmente al oncogén *MYC*, pero también se detectó en

rearrreglos de los cromosomas 1, 10, 11, 16 y 17 (80). En las translocaciones que involucran *MYC*, se observó kataegis en los dos loci participantes, particularmente los correspondientes a las cadenas pesada y livianas de las inmunoglobulinas (Igs), sustentando la co-ocurrencia del rearrreglo y la participación de este mecanismo en su desarrollo. Se considera un evento temprano en el desarrollo del MM, asociado a la actividad de las vías canónica y no canónica de *AID*, lo que sugeriría un rol causal de la actividad aberrante de esta enzima en el mecanismo de kataegis (81, 82).

APOBEC es una familia de enzimas de edición del ADN que fundamentalmente actúan sobre el ADN simple cadena a través de la desaminación de citosina a uracilo (83), llevando a mutaciones que pueden ser oncogénicas. Esta firma molecular tiene un patrón característico que resulta en el enriquecimiento de sustituciones C>T y C>G en un contexto de trinucleótidos TpCpA, y ha sido descrita en numerosos tumores sólidos y neoplasias hematológicas, entre ellas la leucemia linfocítica crónica (76, 84). En MM, el 3,8% de los pacientes presenta esta característica, asociada a las translocaciones que involucran a los genes *MAF*: t(14;16)(q32;q23) y t(14;20)(q32;q11), con sobreexpresión de las isoformas *APOBEC3A* y *APOBEC3B*, respectivamente, y a una alta carga mutacional (80). Esta firma mutacional es de adquisición tardía (81, 82), y se asocia a pronóstico adverso con corta supervivencia libre de progresión y global, en concordancia con lo observado para los casos con las translocaciones t(14;16) y t(14;20) (85). Un trabajo reciente (86), observa un incremento de la actividad de *APOBEC* durante la progresión de las diferentes fases de los desórdenes de células plasmáticas, desde el MGUS/MM indolente al MM sintomático y la leucemia de células plasmáticas primaria, y encuentra un valor pronóstico adverso independiente para esta firma mutacional. Asimismo, estos autores detectaron un 23% de casos con aumento de actividad de *APOBEC*, particularmente *APOBEC3B*, que no presentaban translocaciones que involucraran a los genes *MAF*, indicando la participación de otros factores en la modulación de este proceso aberrante. Estos hallazgos sugieren que el análisis de la actividad de *APOBEC* al momento del diagnóstico podría ayudar a identificar

pacientes de alto riesgo que se beneficiarían con tratamientos más específicos.

En cuanto a *AID*, miembro de la familia de ADN deaminasas APOBEC, es una enzima esencial en la activación de los linfocitos B a nivel del centro germinal, responsable de los procesos de SHM (*somatic hypermutation*) y CSR (*class switch recombination*) de los genes de Igs, generando cambios de citosina a uracilo en la región variable de la cadena pesada (IGHV) y cambio de isotipo de IgM a IgG o IgE (87). *AID* también puede producir mutaciones en otros genes y su activación aberrante es capaz de generar activación oncogénica, rupturas del ADN de doble cadena, translocaciones e inestabilidad genómica (88). Particularmente en MM, está involucrada en la translocación t(11;14)(q13;q32) que determina la yuxtaposición de los genes *CCND1* (*ciclina D1*) e *IGH* (80), teniendo un rol importante en la adquisición temprana de mutaciones *driver* en esta patología (78, 81, 82). Bolli et al. (81) detectaron un importante rol de *AID* en la progresión de MM indolente a MM sintomático, así como la presencia de una nueva firma mutacional que involucra la participación de la vía no canónica de *AID* observada en el 28% de los genomas analizados, más prevalente en las regiones no codificantes, y también de adquisición temprana. Estos datos resultan de importancia en la patogénesis del MM, así como también en la toma de decisiones terapéuticas.

Alteraciones epigenéticas

Además de las alteraciones genéticas características del MM, las modificaciones epigenéticas juegan también un rol importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Dichas modificaciones epigenéticas constituyen cambios heredables en la expresión génica que se producen sin modificaciones en la secuencia de ADN (89). Los mecanismos más comunes de regulación epigenética son la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la expresión de ARNs no codificantes. La metilación del ADN consiste en una modificación covalente postreplicativa que agrega un grupo

metilo al anillo de citosina formando 5-metil citosina. La misma se produce sólo en las citosinas que preceden a guaninas, formando el dinucleótido CpG, que se agrupa en regiones pequeñas de 0,5-4 Kb, denominadas islas CpG que, a menudo, involucran a los promotores génicos, usualmente no metilados. La falta de metilación en las islas CpG permite la expresión del gen. La metilación aberrante del ADN es característica de las células tumorales humanas, particularmente la hipermetilación de los promotores de los genes supresores de tumor que determina el silenciamiento génico, y la hipometilación del ADN asociada a inestabilidad genómica. Diferentes estudios han mostrado que el MM se caracteriza por alteraciones en la metilación del ADN que son específicas en diferentes estadios de la enfermedad (99, 91). Concretamente, se observó una hipometilación global en MGUS y una progresiva hipermetilación en el MM sintomático y en los pacientes en recaída, sugiriendo que las modificaciones en el patrón de metilación contribuirían a la patogénesis de esta enfermedad (92-94). En este aspecto, resulta de interés el rol del gen *MAFB*, involucrado en la t(14;20), en la oncogénesis del MM. Estudios en ratones transgénicos mostraron el desarrollo de una neoplasia de células plasmáticas asociada a alta expresión de *MAFB*. El análisis molecular de estos ratones mostró una reprogramación del perfil de metilación de las células *stem* hematopoyéticas/progenitoras, que se mantenía en las células plasmáticas tumorales, demostrando un nuevo mecanismo molecular de la carcinogénesis (95). Por otra parte, Walker et al. (90) reportaron una alta hipermetilación en los pacientes que presentaban la t(4;14) respecto de los otros grupos citogenéticos. Como se mencionó en el capítulo anterior, estos pacientes sobreexpresan *MMSET*, que tiene actividad de histona metiltransferasa e interactúa con co-represores tipo HDACs (*histone deacetylases*) regulando la transcripción génica (96). La sobreexpresión *MMSET* lleva a la metilación de H3K36 y H3K27 y regula el ensamblaje de 53BP1 (*p53-binding protein 1*) a los sitios de lesiones del ADN (97). De esta manera, la sobreexpresión debida a la t(4;14) determina modificaciones de histonas que promueven la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular y causan una respuesta aberrante al daño al ADN, alterando la maquinaria de reparación del

ADN y promoviendo la inestabilidad genómica, lo cual podría explicar el pronóstico adverso de los pacientes con esta translocación. Asimismo, Walker et al. (90) observa un aumento de metilación a nivel de los promotores de diferentes genes en la transición de MM a leucemia de células plasmáticas, sustentando la participación de este mecanismo en la progresión de la enfermedad.

Sin duda, el estudio de la participación de estos mecanismos de inestabilidad genómica en el desarrollo y progresión del MM permitirá ahondar en el conocimiento de las características biológicas de la patología, pudiendo constituir un aporte a la generación de nuevas estrategias terapéuticas.

Agradecimientos

El presente trabajo se efectuó con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Buenos Aires, Argentina.

Referencias

1. Lee JK, Choi Y-L, Kwon M, Park PJ. Mechanisms and consequences of cancer genome instability: lessons from genome sequencing studies. *Annu Rev Pathol* 2016; 11: 283-312.
1. Alagpulinsa DA, Szalat RE, Poznansky MC, Shmookler Reis RJ. Genomic instability in multiple myeloma. *Trends Cancer* 2020; 6: 858-73.
2. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006; 88: 1515-31.
3. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis T D. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 220-8.
4. Roschke AV, Rozenblum E. Multi-layered cancer chromosomal instability phenotype. *Front Oncol* 2014; 3: 302.
5. Bakhoun SF, Silkworth WT, Nardi IK, Nicholson JM, Compton DA, Cimini D. The mitotic origin of chromosomal instability. *Curr Biol* 2014; 24: R148-9.
6. Crasta KK, Ganem NJ, Dagher RR, et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 2012; 482: 53-8.
7. Bakhoun SF, Kabeche L, Murnane JP, Zaki BI, Compton DA. DNA-damage response during mitosis induces whole-chromosome missegregation. *Cancer Discov* 2014; 4: 1281-9.
8. Bakhoun SF, Compton DA. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *J Clin Invest* 2012; 122: 138-43.
9. Bakhoun SF, Landau DA. Chromosomal Instability as a Driver of Tumor Heterogeneity and Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017; 7: a029611.
10. Sansregret L, Vanhaesebroeck B, Swanton C. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15: 139-50.
11. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009; 23: 2210-21.

12. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol* 2017; 14: 100-13.
13. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2018; 93: 1091-110.
14. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomics abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417-24.
15. Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW, et al. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood* 2008; 111: 4700-5.
16. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 335-348.
17. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306-13.
18. Shamma MA, Shmookler Reis RJ, Koley H, Batchu RB, Li C, Munshi NS. Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma. *Blood* 2009; 113: 2290-7.
19. Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL, et al. Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes Chrom Cancer* 2005; 42: 95-106.
20. Sawyer JR, Tian E, Heuck CJ, et al. Jumping translocations of 1q12 in multiple myeloma: a novel mechanism for deletion of 17p in cytogenetically defined high-risk disease. *Blood* 2014; 123: 2504-12.
21. Sawyer JR, Tian E, Heuck CJ, et al. Evidence of an epigenetic origin for high- risk 1q21 copy number aberrations in multiple myeloma. *Blood* 2015; 125: 3756-9.
22. Sawyer JR, Tian E, Walker BA, et al. An acquired high-risk chromosome instability phenotype in multiple myeloma: Jumping 1q Syndrome. *Blood Cancer J* 2019; 9: 62.
23. Bersani F, Lee E, Kharchenko PV, et al. Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA derived DNA intermediates in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 15148-53.

24. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402: 187-91.
25. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1330-5.
26. Stanganelli C, Arbelbide J, Fantl DB, Corrado C, Slavutsky I. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Ann Hematol* 2010; 89: 191-9.
27. Brückmann NH, Pedersen CB, Ditzel HJ, Gjerstorff MF. Epigenetic reprogramming of pericentromeric satellite DNA in premalignant and malignant Lesions. *Mol Cancer Res* 2018; 16: 417-27.
28. Black JC, Manning AL, Van Rechem C, et al. KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. *Cell* 2013; 154: 541-55.
29. Black JC, Atabakhsh E, Kim J, et al. Hypoxia drives transient site-specific copy gain and drug resistant gene expression. *Genes Dev* 2015; 29: 1018-31.
30. Black JC, Zhang H, Kim J, Getz G, Whetstine JR. Regulation of transient site-specific copy gain by microRNA. *J Biol Chem* 2016; 291: 4862-71.
31. Marchesini M, Ogoti Y, Fiorini E, et al. ILF2 is a regulator of RNA splicing and DNA damage response in 1q21-amplified multiple myeloma. *Cancer Cell* 2017; 32: 88-100.
32. Lazzari E, Mondala PK, Santos ND, et al. Alu-dependent RNA editing of GLI1 promotes malignant regeneration in multiple myeloma. *Nat. Commun* 2017; 8: 1922.
33. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144: 27-40.
34. Maciejowski J, Li Y, Bosco N, Campbell PJ, de Lange T. Chromothripsis and kataegis induced by telomere crisis. *Cell* 2015; 163: 1641-54.
35. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Minvielle S. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood*. 2011; 118: 675-8.

36. Maura F, Bolli N, Angelopoulos N, et al. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat. Commun* 2019; 10: 3835.
37. Rustad EH, Yellapantula VD, Glodzik D, et al. Revealing the impact of structural variants in multiple myeloma. *Blood Cancer Discov* 2020; 1: 258-73.
38. Shen MM. Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome. *Cancer Cell* 2013; 23: 567-9.
39. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11:1921-9.
40. Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution to complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:12683-8.
41. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:677-85.
42. Karlseder J, Smogorzewska A, De Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 2002; 295:2446-9.
43. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 2007; 448:1068-71.
44. Gisselsson D, Jonson T, Yu C, et al. Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres. *Br J Cancer* 2002; 87: 202-7.
45. Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Sähl T, Mitelman F. Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. *Cancer Res* 2003; 63:3378-85.
46. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
47. Cairney CJ, Keith WN. Telomerase redefined: Integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie* 2008; 90: 13-23.
48. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood* 2008; 111: 4446-55.

49. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, et al. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995; 14: 4240-8.
50. Cerone MA, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1945-52.
51. Heidenreich B, Kumar R. TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutat Res* 2017; 771:15-31.
52. Xu D, Zheng C, Bergenbrant S, et al. Telomerase activity in plasma cell dyscrasias. *Br J Cancer* 2001; 84:621-5.
53. Shiratsuchi M, Muta K, Abe Y, et al. Clinical significance of telomerase activity in multiple myeloma. *Cancer* 2002; 94: 2232-8.
54. Cottliar A, Pedrazzini E, Corrado C, Engelberger MI, Narbaitz M, Slavutsky I. Telomere shortening in patients with plasma cell disorders. *Eur J Haematol* 2003; 71: 334-40.
55. Wu KD, Orme LM, Shaughnessy J Jr, Jacobson J, Barlogie B, Moore MA. Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. *Blood* 2003; 101: 4982-9.
56. Hyatt S, Jones RE, Heppel NH, et al. Telomere length is a critical determinant for survival in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2017; 178: 94-8.
57. Aref S, Al Saeed A, El Menshawy N, Abdalla D, El Ashery M. Prognostic relevance of telomere length and telomerase reverse transcriptase variant (rs2242652) on the multiple myeloma patients. *J Clin Lab Anal* 2020; 34: e23133.
58. Panero J, Arbelbide J, Fantl DB, García Rivello H, Kohan D, Slavutsky I. Altered mRNA expression of telomere-associated genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Mol Med* 2010; 16: 471-8.
59. Panero J, Stella F, Schutz N, Fantl DB, Slavutsky I. Differential Expression of Non-Shelterin Genes Associated with High Telomerase Levels and Telomere Shortening in Plasma Cell Disorders. *PLoS One* 2015; 10: e0137972.
60. De S, Michor F. DNA replication timing and long-range DNA interactions predict mutational landscapes of cancer genomes. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 1103-8.

61. Rhind N, Gilbert DM. DNA replication timing. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3: 1-26.
62. Goren A, Cedar H. Replicating by the clock. *Nature Rev* 2003; 4: 25-32.
63. Dotan ZA, Dotan A, Litmanovich T, et al. Modification in the inherent mode of allelic replication of lymphocytes of patients suffering from renal cell carcinoma: a novel genetic alteration associated with malignancy. *Genes Chrom Cancer* 2000; 27: 270-77.
64. Korenstein-Ilan A, Amiel A, Lalezari S, Lishner M, Avivi L. Allele-specific replication associated with aneuploidy in blood cells of patients with hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 139: 97-103.
65. Du Q, Bert SA, Armstrong NJ, et al. Replication timing and epigenome remodelling are associated with the nature of chromosomal rearrangements in cancer. *Nature Comm* 2019; 10: 416.
66. Amiel A, Kirgner I, Gaber E, Manor Y, Fejgin M, Lishner M: Replication pattern in cancer: asynchronous replication in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 108: 32-7.
67. Stella F, Pedrazzini E, Slavutsky I. Análisis citogenético y asincronía de replicación en pacientes con delección 6q en mieloma múltiple. *J Basic & Appl Genet* 2019; XXX N° 1 (Suppl): 98.
68. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215-25.
69. Li YC, Korol AB, Fahima T, et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 2002; 11:2453-65.
70. Velangi MR, Matheson EC, Morgan GJ, et al. DNA mismatch repair pathway defects in the pathogenesis and evolution of myeloma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1795-1803.
71. Timurağaoğlu A, Demircin S, Dizlek S, Alanoğlu G, Kiriş E. Microsatellite instability is a common finding in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9: 371-4.
72. Miyashita K, Fujii K, Suehiro Y, et al. Heterochronous occurrence of microsatellite instability in multiple myeloma – an implication for a role of defective DNA mismatch repair in myelomagenesis. *Leuk Lymphoma* 2018; 59: 2454-9.

73. Oda S, Maehara Y, Ikeda Y, et al. Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:1628-36.
74. Janz S, Zhan F, Sun F, et al. Germline risk contribution to genomic instability in multiple myeloma. *Front Genet* 2019; 10: 424.
75. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500: 415-21.
76. Hoang PH, Cornish AJ, Dobbins SE, Kaiser M, Houlston RS. Mutational processes contributing to the development of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2019; 9: 60.
77. Maura F, Rustad EH, Yellapantula V, et al. Role of AID in the temporal pattern of acquisition of driver mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 2019; 34: 1476- 80.
78. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014; 5: 2997.
79. Walker BA, Wardell CP, Murison A, et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun* 2015; 6: 6997.
80. Bolli N, Maura F, Minvielle S, et al. Genomic patterns of progression in smoldering multiple myeloma. *Nat Commun* 2018; 9: 3363.
81. Rustad EH, Yellapantula V, Leongamornlert D, et al. Timing the initiation of multiple myeloma. *Nat Commun* 2020; 11: 1917.
82. Bacolla A, Cooper DN, Vasquez KM. Mechanisms of base substitution mutagenesis in cancer genomes. *Genes* 2014; 5: 108-46.
83. Rebhand, S, Huemer M, Gassner FJ, et al., APOBEC3 signature mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014. 28: 1929-32.
84. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2020; 95: 548-67.
85. Maura F, Petljak M, Lionetti M, et al. Biological and prognostic impact of APOBEC-induced mutations in the spectrum of plasma cell dyscrasias and multiple myeloma cell lines. *Leukemia* 2018; 32: 1044-8.
86. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000; 102:

553-63.

87. Robbiani DF, Bunting S, Feldhahn N, et al. AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell*. 2009; 36: 631-41.
88. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-92.
89. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* 2011; 117: 553-62.
90. Heuck CJ, Mehta J, Bhagat T, et al. Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *J Immunol* 2013; 190: 2966-75.
91. Moreaux J, Reme T, Leonard W, et al. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 2685-92.
92. De Smedt E, Lui H, Maes K, et al. The epigenome in multiple myeloma: Impact on tumor cell plasticity and drug response. *Front Oncol* 2018; 8: 566.
93. Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H. Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Semin Cancer Biol*. 2018; 51:101-15.
94. Vicente-Duenas C, Romero-Camarero I, Gonzalez-Herrero I, et al. A novel molecular mechanism involved in multiple myeloma development revealed by targeting MafB to haematopoietic progenitors. *EMBO J* 2012; 31: 3704-17.
95. Martinez-Garcia E, Popovic R, Min DJ, et al. The MMSET histone methyltransferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* 2011; 117: 211-20.
96. Pei H, Zhang L, Luo K, et al. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 2011; 470: 124-8.

Capítulo 3

Macroglobulinemia de Waldenström. Estudios citogenéticos y moleculares.

Carmen Stanganelli¹, Juana Cabrera¹, Irma Slavutsky²

De:

1. División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.
2. Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Palabras clave: Macroglobulinemia de Waldenström; *MYD88*; *CXCR4*;
Mutaciones

Correspondencia: Dra. Carmen Stanganelli
División Patología Molecular
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina
Pacheco de Melo 3081
1425 - Ciudad de Buenos Aires
Argentina

e-mail: medicinanuclear270@gmail.com

Resumen:

La Macroglobulinemia de Waldenström (MW) es un linfoma linfoplasmocítico con compromiso de la médula ósea (MO) y presencia de una gammapatía monoclonal IgM. La alteración citogenética más frecuente es la deleción de parte del brazo largo del cromosoma 6 observada en el 30-54% de los casos, asociada a factores de pronóstico adverso en la patología. Los estudios de secuenciación masiva permitieron detectar la presencia de mutaciones de los genes *MYD88* y *CXCR4*, de valor diagnóstico y pronóstico en la patología. La mutación activante del gen *MYD88*, que determina el cambio del aminoácido leucina por prolina en la posición 265 de la proteína (*MYD88^{L265P}*), se observa en el 93-97% de los pacientes con MW y en el 40-60% de los casos de MGUS-IgM, en tanto que las mutaciones de *CXCR4* se encuentran en el 30-40% de los pacientes con MW, siendo menos frecuentes en el MGUS-IgM (4-20%). *CXCR4^{S338X}* es la variante más común (50% de las mutaciones); genera un codón *stop* que determina la pérdida de 15 aminoácidos en el dominio C-regulador, conduce a una proteína truncada en el aminoácido 338, y a la pérdida de 15 aminoácidos en el dominio C-regulador. Algunos pacientes presentan múltiples mutaciones en distintos subclones. Los casos con *MYD88^{WT}/CXCR4^{WHIM/WT}* tienen el peor pronóstico con corta sobrevida libre de progresión y global. Los pacientes con *MYD88^{L265P}/CXCR4^{WHIM/WT}* tienen buena respuesta al tratamiento, en tanto que aquellos con ambos genes mutados presentan un pronóstico intermedio. Sin duda, el análisis de estas mutaciones ha permitido profundizar la caracterización biológica de la MW permitiendo en un futuro ampliar la posibilidad de disponer de nuevos blancos terapéuticos.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud define a la Macroglobulinemia de Waldenström (MW) como un linfoma linfoplasmocítico (LPL) con compromiso de la médula ósea (MO) y la presencia de una gammapatía monoclonal IgM de cualquier concentración (1, 2). La MW corresponde al 95% de los LPL (<5% son secretores de IgG, IgA o no secretores) y presenta un patrón de infiltración de la MO predominantemente intratrabecular con un incremento en el número de mastocitos. Es una enfermedad rara, que representa aproximadamente el 1-2% de las neoplasias hematológicas, con una incidencia aproximada de 0,57/100000 personas por año (3, 4), siendo mayor en caucásicos (0,41/100000 por año) que en afrodescendientes (0,18/100000 por año) (5). La edad media de presentación es 63-68 años con predominio del sexo masculino. Los pacientes menores de 70 años tienen una media de supervivencia (SV) mayor de 10 años, aquellos entre 70 y 79 años de aproximadamente 7 años y los mayores de 80 años de alrededor de 4 años (6). La mayoría de los casos se originarían a partir de una célula B de memoria caracterizada por un fenotipo CD27⁺, IgM⁺, IgD⁻, CD25⁺ CD22^{low}, arrestada después de sufrir hipermutación somática en el centro germinal y antes de alcanzar la diferenciación a célula plasmática (7-10).

El principal factor de riesgo de desarrollo de una MW es la preexistencia de MGUS (*monoclonal gammapatía of undetermined significance*) IgM, seguido de la presencia de una historia familiar de MW u otra neoplasia linfocítica a células B y factores inmunológicos. En particular, el MGUS-IgM confiere un riesgo relativo 46 veces más alto que el de la población general de desarrollar MW (11). Si bien en la mayoría de los casos es una enfermedad esporádica, diferentes trabajos refieren agregación familiar, con un riesgo hasta 20 veces superior en los familiares de primer grado de presentar MW u otro desorden linfoproliferativo respecto de la población general (12, 13), sugiriendo una susceptibilidad genética en el desarrollo de esta entidad. Asimismo, diferentes reportes detectan menor edad de comienzo de la enfermedad, mayor nivel de infiltración de la MO y menos supervivencia en los casos con historia familiar de MW o de algún proceso

linfoproliferativo (14, 15).

Los síntomas clínicos más comunes son debilidad y fatiga, generalmente secundarios a anemia, y síntomas B (pérdida de peso, sudoración excesiva y fiebre baja), y afectan a una cuarta parte de los pacientes. En el 15-30% de los casos se observa hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatía (4, 16-18). Asimismo, los niveles elevados de IgM circulante producen manifestaciones clínicas vinculadas a las propiedades fisicoquímicas de la proteína monoclonal IgM, como hiperviscosidad, neuropatía periférica, crioglobulinemia o enfermedad de aglutininas frías (4, 19). El depósito de agregados amorfos de IgM se asocia a disfunción orgánica, particularmente a nivel gastrointestinal y renal, así como a alteraciones en la piel. En cuanto al inmunofenotipo, las células de la MW expresan CD19, CD20, CD22^{low}, CD25, CD27, CD79b, CD81, FMC7, IgMs, son CD5, CD10, CD11c y CD103 negativas (1, 10), y presentan restricción de cadena liviana κ o λ con una relación 5:1 (20), siendo de importancia para distinguir una MW de otras neoplasias linfoides.

En referencia al gen *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*), el mismo se encuentra fuertemente mutado en la mayoría de los casos de MW y MGUS IgM, con un rango de desviación de la línea germinal de 2,1% a 16,2%. La comparación con el repertorio de genes presentes en células B normales, evidencia una sobre-representación de la familia VH3, baja frecuencia de VH1 y VH4, asociado a un uso sesgado de genes IGHV, con aumento de expresión de IGHV3-23, IGHV3-64, IGHV3-7 y IGHV3-74, y disminución de IGHV4-39. Estos datos, en concordancia con el inmunofenotipo, sustentan la hipótesis que los eventos transformantes ocurren por presión selectiva en células de memoria post centro germinal (21-23). En cuanto al análisis de la secuencia de aminoácidos en la región VH CDR3, a diferencia de lo encontrado en leucemia linfocítica crónica (LLC), la MW no evidencia la presencia de *subsets* o grupos de homología que permitan identificar receptores estereotipados (22, 24).

Alteraciones citogenéticas

Al presente, y en comparación con otros desórdenes linfoproliferativos, es poca la información existente respecto de las anomalías cromosómicas presentes en la MW debido fundamentalmente, al bajo índice mitótico de las células tumorales *in vitro*. No obstante, si bien esta patología no presenta alteraciones específicas, la frecuencia de las anomalías encontradas difiere de lo observado en otras neoplasias linfoides. Asimismo, el análisis de CNA (*copy number aberrations*) muestra una media de 4 alteraciones por caso, similar a lo observado en LLC o linfomas de la zona marginal, pero mucho menor que lo detectado en el linfoma de células del manto o el mieloma múltiple (25, 26).

En particular, la alteración más frecuente es la delección (del) de parte del brazo largo del cromosoma 6 (del6q) observada en el 30-54% de los casos, seguida por: trisomía 18 (15-23%), del13q (13-15%), del17p (8-23%), trisomía 4 (8-12%), del11q (7%) y trisomía 12 (<5%) (26-31). Nguyen-Khac et al. (31) observaron una asociación significativa entre las trisomías 4 y 18. Simultáneamente, son muy poco frecuentes las translocaciones que involucran el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*) (3%) (31, 32). En cuanto a su significado clínico, las delecciones 6q y 11q, así como la trisomía 4 se asocian a factores de pronóstico adverso en la patología, pero no presentan impacto sobre su evolución clínica (31, 33, 34), en tanto que la del17p y la trisomía 12 se relacionan a una corta supervivencia libre de progresión (SLP) (31).

En referencia a la del6q, se han descrito dos regiones de mínima delección (MDR): 6q21 y 6q23, que determinan la pérdida de genes con importantes funciones regulatorias que modulan la actividad de NF-κB (*TNFAIP3*, *HIVEP2*), apoptosis (*FOXO3*), proteínas de la familia BCL2 (*BCLAF1*), BTK (*IBTK*) y diferenciación plasmocítica (*PRDM1*, *ARID1B*) (26, 35-37). Un trabajo reciente (38) compara los perfiles de expresión de pacientes con y sin del6q, observando que los casos con la delección presentan aumento de la expresión de los genes de la vía de señalización del receptor de células B (BCR; *B-cell receptor*) (*CD79a*,

SYK, BLNK, PLC γ 2, CARD11) y de *IL-2 (interleukin 2)*. Los autores postulan que la activación del BCR estaría posiblemente asociada a la pérdida de *BLIMP-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1)* (6q21) cuya función en condiciones normales se encuentra relacionada con la inhibición de la proliferación y activación de los linfocitos B, incluyendo el camino de señalización del BCR, así como con la diferenciación de las células plasmáticas (39). Por su parte, en MW *IL-2* contribuye a la secreción de IgM y a la proliferación celular vía la activación del camino de señalización JAK/STAT (40).

Rearreglos moleculares

Mutaciones de *MYD88 (myeloid differentiation primary response 88)*

Estudios de secuenciación masiva de última generación (NGS; *next generation sequencing*) permitieron detectar una mutación activante en el gen *MYD88*, ubicado a nivel de 3p22.2, que determina el cambio del aminoácido leucina por prolina en la posición 265 de la proteína (L265P) (*MYD88^{L265P}*) (41). La misma se observa en aproximadamente el 93-97% de los pacientes con MW y en el 40-60% de los casos de MGUS-IgM, dependiendo de la metodología empleada para su detección (35, 41). El gen *MYD88* codifica una proteína adaptadora citosólica que desempeña un papel central en la respuesta inmune innata y adaptativa. Dicha proteína funciona como un transductor de señal esencial en las vías de señalización de los receptores de interleuquina-1 y de tipo Toll (41). *MYD88^{L265P}* induce la activación de las quinasas IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) y BTK (*Bruton's tyrosine kinase*), llevando a la activación de NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) y al desarrollo neoplásico (42, 43) (Figura 3.1). El reclutamiento y activación de las moléculas IRAK y BTK puede ser bloqueado por inhibición de *MYD88*, llevando a la apoptosis de las células MW con *MYD88* mutado. La ausencia de mutación (*MYD88^{WT}*) se asocia a mayor edad, menor infiltración de la MO y compromiso extramedular, un curso clínico más agresivo con menor SV, así como un riesgo de muerte diez veces más alto que los casos portadores de *MYD88^{L265P}* (36, 44, 45). Asimismo, los pacientes con *MYD88^{WT}*

pueden presentar mutaciones somáticas recurrentes que impactan en la vía de señalización de NF- κ B, en reguladores epigenómicos y en los genes DDR (*DNA damage responsive*) así como una alta incidencia de linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) (37, 46). Las mutaciones más comunes afectan la vía de señalización de NF- κ B e incluyen los genes *TBL1XR1*, *NFKBIB*, *NFKBIZ*, *NFKB2*, *MALT1*, *BCL10* y *UDRLIF*, y el complejo de genes CBM (*CARD11-BCL10-MALT1*). Adicionalmente, se han identificado mutaciones diferentes de la L265P, que incluyen S219C, M232T y S243N, aunque sus frecuencias son mucho más bajas (1-2%) (45).

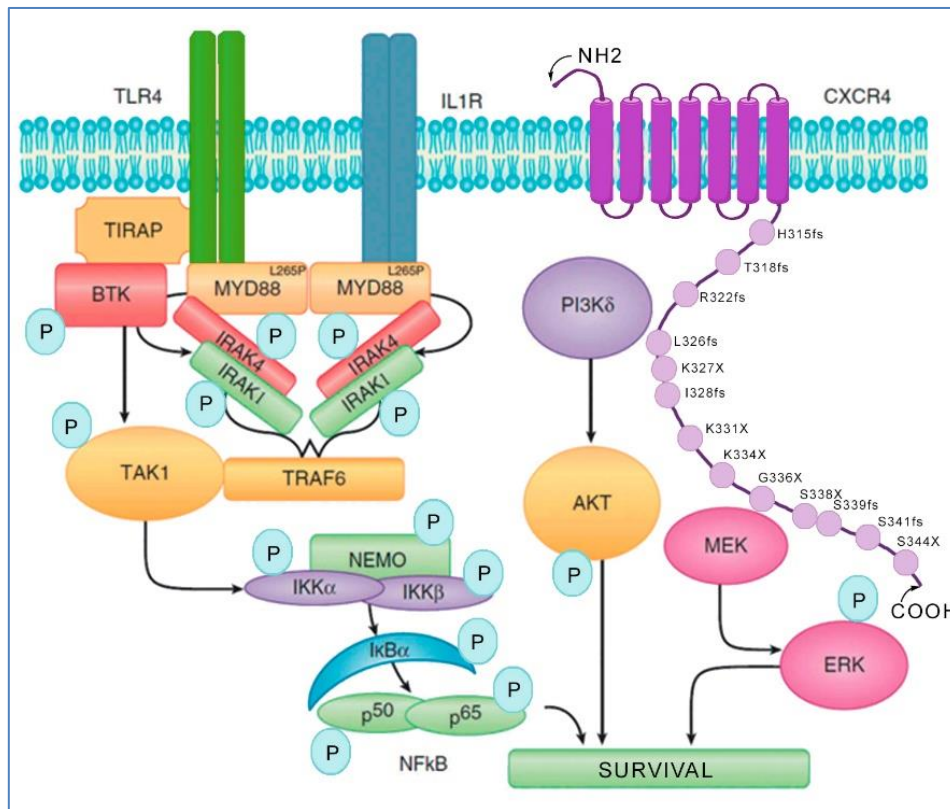


Figura 3.1: Vías metabólicas de *MYD88* y de *CXCR4* en Macroglobulinemia de Waldenström. Se detallan las mutaciones somáticas encontradas con mayor frecuencia en el extremo c-terminal de *CXCR4*. fs: frameshift. Modificada de Castillo et al. (43).

En cuanto a la metodología, en los pacientes con sospecha de MW, el análisis por ASO-PCR (PCR-alelo específica) en MO representa el ensayo de elección para la detección de la mutación *MYD88*^{L265P} (22, 47, 48). No obstante, la misma puede también detectarse por ASO-PCR en sangre periférica de pacientes sin tratamiento previo (49). Como la sensibilidad disminuye en los pacientes tratados, en estos casos se recomienda usar solo muestras de MO para identificar de manera confiable la mutación (13, 36). En pacientes con MGUS-IgM, Varettoni et al. (36) observaron resultados discordantes en la identificación de la mutación *MYD88*^{L265P} entre las técnicas de secuenciación masiva paralela de última generación (NGS: *next generation sequencing*) y PCR en tiempo real alelo específica (*Taqman Allele-Specific Genotyping Assay*), detectándose la mutación sólo con la última metodología, que tendría mayor sensibilidad diagnóstica cuando el clon de células B es pequeño (36).

Simultáneamente, en MW no se observaron diferencias en el porcentaje de casos mutados efectuando el análisis en células mononucleares totales de MO respecto de células CD19+ seleccionadas (36, 50). Otra alternativa para la detección confiable de la mutación *MYD88*^{L265P} y el monitoreo de enfermedad mínima residual es el método de ddPCR (*droplet digital PCR*), de sensibilidad superior a la ASO-PCR, especialmente útil para el estudio de muestras con bajo porcentaje de infiltración, tales como MO no seleccionadas o sangre periférica. La PCR digital podría utilizarse también para la detección de la mutación *MYD88*^{L265P} en ADN tumoral circulante en plasma (51).

Resulta interesante destacar que las alteraciones estructurales del brazo corto del cromosoma 3 pueden modificar la carga alélica de *MYD88*^{L265P}, debido a la delección del alelo WT (WT: *wild type* o no mutado), amplificación del alelo mutado o disomía uniparental adquirida resultando en homocigocidad (35, 41). Esta mutación también se ha observado, aunque con frecuencias más bajas, en otras neoplasias hematológicas, como LDGCB, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) y LLC (41, 47, 52, 53), pero está ausente en el mieloma múltiple (41).

Asimismo, se ha encontrado asociación entre la presencia de *MYD88*^{L265P} y la del6q, sugiriendo roles compartidos de ambos eventos genómicos. En este aspecto, los casos con las dos alteraciones muestran con mayor frecuencia pérdida del gen *BCLAF1* (*BCL2 Associated Transcription Factor 1*), seguido por *TNFAIP3*, *HIVEP2*, *IBTK*, y *FOXO3*. Simultáneamente, el análisis de la región comprendida entre las bandas 6q14 y 6q27 muestra dos patrones diferentes de delección, el 40% de los casos presenta pérdidas clonales y contiguas abarcando todos los genes involucrados en la región, en tanto que el 60% restante tiene delecciones más focales y subclonales (37).

Por otra parte, sabemos que el riesgo de progresión de MGUS-IgM a MW u otros desórdenes linfoproliferativos es de 1,5% por año (54) y que tanto la presencia de la mutación *MYD88*^{L265P} como su nivel de expresión están asociadas a la transformación maligna (53, 55). Considerando que la progresión de MGUS-IgM (condición premaligna) a MW (neoplasia) ocurre en un proceso de múltiples pasos, la alta prevalencia de *MYD88*^{L265P} en MGUS-IgM confirma que esta mutación es un evento oncogénico temprano. Por su parte, la presencia de otras mutaciones y/o CNA (*Copy number aberrations*) determinaría una expresión génica anormal que promovería la progresión de la enfermedad (35).

Mutaciones de *CXCR4* (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*)

Además de la mutación del gen *MYD88*, estudios de NGS mostraron la presencia de mutaciones en el gen *CXCR4*, localizado a nivel de 2q22, en el 30-40% de los pacientes con MW, siendo menos frecuentes en MGUS-IgM (4-20%) (35, 36, 42, 56, 57). Las mutaciones de *CXCR4* son esencialmente exclusivas de la MW, ya que no se han descrito hasta ahora en otras enfermedades, con la excepción de unos pocos linfomas de células B de zona marginal y casos de LDGCB subtipo ABC (*Activated B-cells*). La ubicación de las mutaciones somáticas en el dominio C terminal en pacientes con MW es similar a lo observado en la línea germinal de pacientes con síndrome de WHIM (*Warts*,

Hypogammaglobulinaemia, Infections and Myelokathexis), una inmunodeficiencia congénita caracterizada por neutropenia crónica no cíclica (58).

CXCR4 es un receptor de quemoquinas que promueve la supervivencia, migración y adhesión de las células tumorales al estroma de la MO a través de interacciones con el ligando CXCL12 (59). En condiciones normales, después de la unión a su ligando, *CXCR4* se activa, se une a proteínas G y se producen una serie de eventos que activan la tirosina quinasa de la familia Src, seguido de *PI3K* (*phosphatidylinositol-3-kinase*), la vía JAK/STAT independientemente de las proteínas G, seguido de *ERK* (*extracellular signal-regulated kinases*) por β -arrestinas, causando la migración, adhesión y transcripción de genes. Después de su unión a *CXCL12*, *CXCR4* se internaliza rápidamente, es ubiquitinado y degradado (60). Se han descrito más de 40 tipos diferentes de mutaciones somáticas en *CXCR4* en pacientes con MW, incluyendo las variaciones con corrimiento del marco de lectura (*CXCR4^{WHIM/FS}*) que comprometen una región de más de 40 aminoácidos del dominio C-terminal y mutaciones sin sentido (*CXCR4^{WHIM/NS}*) que truncan 15-20 aminoácidos de la región distal (35, 44) (Figura 3.1). Al igual que en el síndrome de WHIM, dichas mutaciones dejan intactas las siete hélices de transmembrana involucradas en la señalización y unión del ligando, pero resultan en el truncamiento de la cola citosólica de la proteína que contiene las fosfoserinas regulatorias, alterando la internalización y produciendo una activación prolongada (61). La variante más común es *CXCR4^{S338X}*, que representa más del 50% de las mutaciones de este gen en pacientes con MW. Consiste en una transversión C>A o C>G en el nucleótido 1013 de *CXCR4*, que da como resultado la generación de un codón *stop* que conduce a una proteína truncada en el aminoácido 338, y la pérdida de 15 aminoácidos en el dominio C-regulador. Asimismo, entre las mutaciones *CXCR4^{S338X}*, C>G es más frecuente que C>A (42). Ambas variantes sin sentido (*CXCR4^{S338X}* C>A y C>G) se asocian con formas más agresivas de la enfermedad al diagnóstico. Los pacientes con *MYD88^{L265P}/CXCR4^{WHIM/NS}* tienen mayor compromiso de la MO y altos niveles séricos de IgM, más riesgo de hiperviscosidad, mayor

requerimiento de tratamiento, y son más propensos a padecer enfermedad de Von Willebrand adquirido. Los casos con *MYD88*^{L265P}/*CXCR4*^{WHIM/FS} o *MYD88*^{L265P}/*CXCR4*^{WHIM/WT} presentan compromiso de la MO y niveles séricos de IgM intermedios, mientras que aquellos con *MYD88*^{WT}/*CXCR4*^{WHIM/WT} (5%-10% de los casos) tienen el peor pronóstico con baja infiltración de la MO y corta sobrevida libre de progresión y SV global. Los pacientes con *MYD88*^{L265P}/*CXCR4*^{WHIM/NS o FS} tienen pocas adenopatías y menores niveles séricos de $\beta 2$ microglobulina respecto de aquellos con *MYD88*^{L265P}/*CXCR4*^{WHIM/WT} (44, 62-65). Las mutaciones del gen *CXCR4* acortan la sobrevida libre de tratamiento (SLT) de los pacientes con MW asintomática pero no tienen efecto en la SV global. Por su parte, la mutación *MYD88*^{L265P} no influencia la SLT (44, 65).

Las técnicas de secuenciación de Sanger o NGS son la mejor opción para el análisis del gen *CXCR4* debido a la variedad de mutaciones reportadas en el mismo; sin embargo, en pacientes con baja carga tumoral en MO pueden obtenerse falsos-negativos. Dado que la mutación *CXCR4*^{S338X} es la más frecuente, su búsqueda con la técnica de ASO-PCR mejora la sensibilidad diagnóstica (56), para esta mutación en particular (56), pero debe combinarse con la secuenciación de Sanger que permite detectar las otras mutaciones posibles de encontrar en un mismo paciente (66). Hasta el presente, el método de detección de mutaciones de *CXCR4* no ha sido estandarizado, sin embargo, en todos los casos la condición ideal incluye pacientes no tratados, uso de células mononucleares de MO y selección de células CD19+ (42). Asimismo, la mutación *CXCR4*^{S338X} se ha detectado con alta eficiencia por ASO-PCR en tiempo real en DNA tumoral circulante (67). Hunter et al. (68) han demostrado que *CXCR4*^{WHIM} disminuye la expresión de genes que se transcriben en respuesta a la mutación de *MYD88*.

El estudio de las mutaciones del gen *CXCR4* por clonado y secuenciación en pacientes con MW reveló que la mutación es subclonal, en tanto que el análisis de la frecuencia alélica mostró que en la mayoría de los casos estarían presentes en el clon dominante. Asimismo, se observó la existencia de pacientes con

múltiples mutaciones en subclones distintos y se detectó también la presencia de doble heterocigotas. Se observaron además clones homocigotas para una mutación determinada. La presencia de mutaciones subclonales en MW y su baja frecuencia en el MGUS-IgM revelan que las mismas ocurrirían después de la mutación *MYD88*^{L265P}, durante la oncogénesis de la patología, aunque por su presencia en MGUS seguiría siendo un evento temprano (36, 55). Simultáneamente, la detección de múltiples mutaciones de *CXCR4* en un mismo paciente sería indicativa de inestabilidad genómica (36, 42, 66). Es importante destacar que, aunque usualmente los pacientes que tienen mutaciones del gen *CXCR4* también portan la mutación *MYD88*^{L265P}, pueden observarse pocos casos con *MYD88*^{WT} y *CXCR4* mutado (5%) (69).

Otras mutaciones:

Además de las ya descritas, se han detectado otras mutaciones en la MW, entre ellas las mutaciones somáticas en *ARID1A* (*AT-rich interactive domain 1A*) están presentes en 17% de los casos e incluyen mutaciones puntuales que producen una proteína truncada o mutaciones con corrimiento del marco de lectura. Este gen puede modular *TP53* y actuaría como un gen supresor epigenético (70). Asimismo, se observaron mutaciones de *CD79A* y *CD79B* en el 8% a 12% de los pacientes con MW, preferentemente en casos con *MYD88*^{MUT}, aunque mutaciones en *CD79B* se encontraron también en pacientes con *MYD88*^{WT}. *CD79A* y *CD79B* son componentes de la vía del BCR, ambos forman un heterodímero que se asocia con IGHV, proceso necesario para la expresión de superficie del BCR (71). Además, la pérdida del número de copias de *LYN* (*LYN proto-oncogene*) está presente en el 60% de los casos y puede favorecer la respuesta del BCR. Si bien las células B clonales de la MW exhiben factores funcionales de activación crónica del BCR (72), la contribución de las mutaciones de *CD79A* y *CD79B* y las deleciones de *LYN* a la presentación clínica y respuesta al tratamiento debe ser evaluada en detalle.

Nuestra experiencia

En cuanto a nuestra experiencia, al presente efectuamos el análisis de mutaciones de los genes *MYD88* y *CXCR4* en una cohorte de 31 pacientes con MW: 22 al momento del diagnóstico, 4 en recaída, 5 durante el control post-tratamiento (13 varones; edad media 67,5 años, rango: 52-85) y 12 con MGUS-IgM (5 varones; edad media 76,9 años, rango: 68-88). En el 60% de los casos se efectuó la evaluación en muestras de MO, en tanto que en los restantes se empleó sangre periférica. Para el análisis de la mutación *MYD88*^{L265P} se usó la técnica de ASO-PCR acorde a lo previamente descrito (47). Se realizaron dos reacciones de PCR que comparten el mismo *primer* sentido *MYD88*s, en una se amplificó la banda control de 160 pares de base (pb) que contiene el sitio L265P de la mutación empleando el *primer* antisentido *MYD88*as y en la otra se amplificó el alelo mutado de 122pb con el *primer* antisentido *MYD88*as-mut (Figura 3.2).

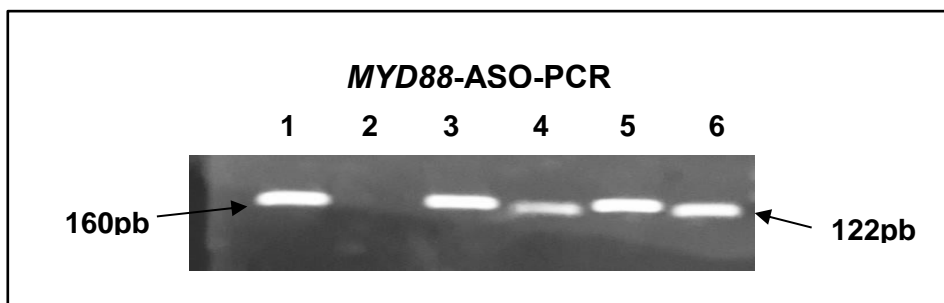


Figura 3.2: **ASO-PCR de *MYD88***. Gel de agarosa al 2% mostrando una banda control de 160pb (Calles 1, 3 y 5) y una banda de 122pb que amplifica el alelo con la mutación *MYD88*^{L265P} (Calles 4 y 6). Calle 2: control negativo; Calles 3 y 4: paciente con la mutación *MYD88*^{L265P}; Calles 5 y 6: control positivo para la mutación *MYD88*^{L265P}.

Por otra parte, se efectuó la búsqueda de la mutación *CXCR4*^{S338X} en 22 pacientes con MW y 11 con MGUS-IgM mediante ASO-PCR según lo previamente reportado (42). Se realizaron tres reacciones de PCR que comparten el mismo *primer* sentido *CXCR4*s. En la primera se amplificó el alelo normal con el *primer* antisentido *CXCR4*as, en la segunda se amplificó la mutación *CXCR4*^{S338X} C>G

con el *primer* antisentido CXCR4as C>G, y en la tercera se amplificó el alelo *CXCR4*^{S338X} C>A con el *primer* antisentido CXCR4as C>A. En los tres casos se amplificaron fragmentos de 162pb (Figura 3.3I). Para la detección de otras mutaciones del gen se utilizó la secuenciación bidireccional de Sanger (35). Los pacientes con MGUS-IgM evaluados resultaron negativos, dos pacientes con MW presentaron mutaciones de *CXCR4*: *CXCR4*^{S338X} C>G y R334X, c.1000C<T (Figura 3.3II).

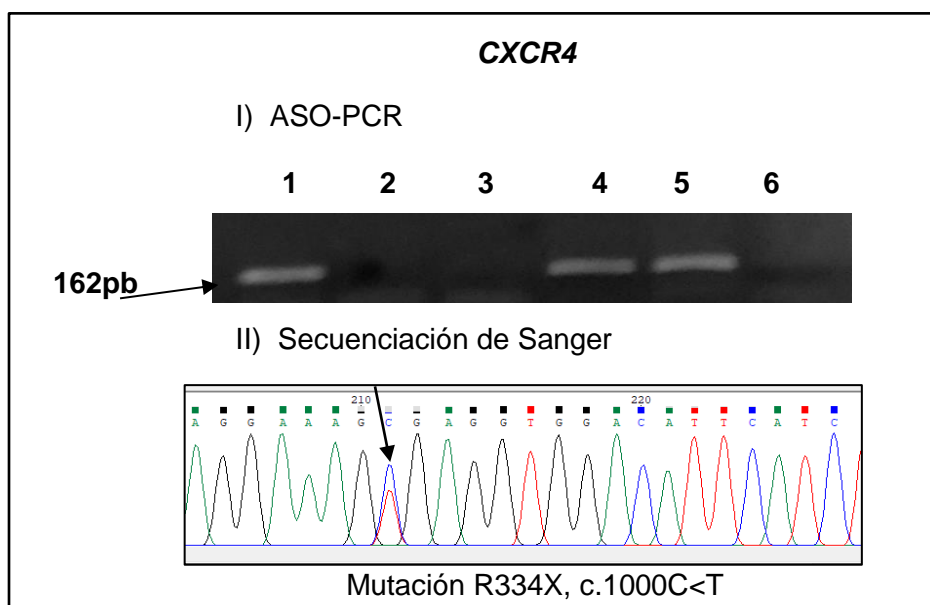


Figura 3.3. **Análisis mutacional de *CXCR4*. I) ASO-PCR para la mutación *CXCR4*^{S338X}.** Gel de agarosa al 2%. Calles 1, 2 y 3: paciente negativo para las mutaciones C>G y C>A, se observa sólo la banda WT (wild type) (Calle 1); Calles 4, 5 y 6: paciente portador de la mutación C>G (Calle 4: alelo WT, Calle 5: alelo C>G positivo; Calle 6: alelo C>A negativo). **II) Secuenciación de Sanger** mostrando la mutación R334X, c.1000C<T del gen *CXCR4*.

En la Tabla 3.1 se detallan los resultados obtenidos en el análisis de las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* en pacientes con MGUS-IgM y MW en diferentes momentos de la enfermedad.

Tabla.3.1: Mutación de *MYD88*^{L265P} y *CXCR4*

Grupo	<i>MYD88</i> ^{L265P}	<i>CXCR4</i>
MW		2/22 (9%)
-Al diagnóstico	81.8%	1/17 (5.9%)
-En recaída	100%	1/4 (25%)
-Control postratamiento	0%	0/1 (0%)
MGUS-IgM	41.6%	0/11 (0%)

El análisis de los datos mostró la siguiente distribución: *MYD88*^{MUT}/*CXCR4*^{WT} (85,7%), *MYD88*^{MUT}/*CXCR4*^{MUT} (9,5%) y *MYD88*^{WT}/*CXCR4*^{WT} (4,8%). Nuestra cohorte mostró positividad para *MYD88* dentro de los valores reportados, en cambio encontramos una baja frecuencia de mutaciones en *CXCR4*. A nuestro conocimiento, este es el primer análisis de ambas mutaciones en pacientes con WM y MGUS-IgM de nuestro país.

Al presente existen distintos esquemas de tratamiento, siendo de destacar la utilización de nuevos agentes tales como inhibidores de *BTK*, *PI3K*, *BCL2* y del proteasoma (56, 63, 73). Diferentes estudios muestran que el Ibrutinib (inhibidor de *BTK*) resulta eficaz en el tratamiento de MW sintomática en pacientes *MYD88*^{L265P}/*CXCR4*^{WHIM/WT}. No obstante, se observa resistencia en los casos con mutaciones de *CXCR4* particularmente en aquellos con *CXCR4*^{WHIM/NS} (46, 74-77), mientras que los pacientes con *CXCR4*^{WHIM/FS} no presentan diferencias respecto de aquellos con *CXCR4*^{WHIM/WT} (77). Estos datos muestran la importancia del análisis de la presencia de mutaciones en MW, tendiente a refinar el diagnóstico y pronóstico de esta patología, y profundizar la caracterización biológica de la enfermedad. La búsqueda de nuevas mutaciones permitirá ampliar en un futuro la posibilidad de disponer de nuevos blancos terapéuticos.

Agradecimientos

El presente trabajo se efectuó con del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Fundación “Alberto J. Roemmers”, Buenos Aires, Argentina.

Referencias

1. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003; 30: 110-5.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
3. Kyle RA, Larson DR, McPhail ED, et al. Fifty-year incidence of Waldenström Macroglobulinemia in Olmsted County, Minnesota, from 1961 through 2010: a population-based study with complete case capture and Hematopathologic review. *Mayo Clin Proc.* 2018; 93: 739-46.
4. Gertz, MA. Waldenström macroglobulinemia: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2019; 94: 266-76.
5. Wang H, Chen Y, Li F, et al. Temporal and geographic variations of Waldenström macroglobulinemia incidence: a large population-based study. *Cancer* 2012; 118: 3793-800.
6. Castillo JJ, Olszewski AJ, Kanan S, Meid K, Hunter ZR, Treon SP. Overall survival and competing risks of death in patients with Waldenström macroglobulinaemia: an analysis of the surveillance, epidemiology and end results database. *Br J Haematol* 2015; 169:81-9.
7. Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, et al. Typical Waldenström macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood* 2002; 100:1505-7.
8. Kriangkum J, Taylor BJ, Strachan E, et al. Impaired class switch recombination (CSR) in Waldenström macroglobulinemia (WM) despite apparently normal CSR machinery. *Blood* 2006; 107: 2920-7.
9. Paiva B, Corchete LA, Vidriales MB, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2015; 125: 2370- 80.
10. García-Sanz R, Jiménez C, Puig N, et al. Origin of Waldenström's Macroglobulinaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016; 29: 136-47

11. Ghobrial IM. Are you sure this is Waldenström macroglobulinemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012; 2012: 586-94.
12. Kristinsson SY, Bjorkholm M, Goldin LR et al. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood* 2008; 112: 3052-6.
13. Kapoor P, Paludo J, Ansell S. Waldenström Macroglobulinemia: Familial predisposition and the role of genomics in prognosis and treatment selection. *Curr Treat Options Oncol* 2016; 17: 16.
14. Treon SP, Hunter ZR, Aggarwal A, et al. Characterization of familial Waldenström's macroglobulinemia. *Ann Oncol* 2006; 17: 488-94.
15. Steingrímsson V, Lund SH, Turesson I, et al. Population-based study on the impact of the familial form of Waldenström macroglobulinemia on overall survival. *Blood* 2015; 125: 2174-5.
16. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A. Waldenström's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18, 747-65.
17. Treon SP. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009; 114:2375-85.
18. Kapoor P, Paludo J, Vallumsetla N, Greipp PR. Waldenström macroglobulinemia: what a hematologist needs to know. *Blood Rev* 2015; 29:301–19.
19. Castillo JJ, Treon S. Initial evaluation of the patient with Waldenström Macroglobulinemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018; 32: 811-20.
20. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, et al. Immunophenotypic analysis of Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 187-95.
21. Martín-Jiménez P, García-Sanz R, Balanzategui A, et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2007; 92: 635-42.
22. Varettoni M, Zibellini S, Capello D, et al. Clues to pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia and immunoglobulin M monoclonal gammopathy of undetermined significance provided by analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement and clustering of B-cell receptors. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 2485-9.

23. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* 2013; 27: 183-9.
24. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012; 119: 4467- 75.
25. Braggio E, Keats JJ, Leleu X, et al. Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenström's macroglobulinemia. *Cancer Res* 2009; 69: 3579-88.
26. Braggio E, Fonseca R. Genomic abnormalities of Waldenström Macroglobulinemia and related low-grade B-cell lymphomas. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13: 198-201.
27. Schop RF, Jalal SM, Van Wier SA, Ahmann GJ, Bailey RJ, Kyle RA, et al. Deletions of 17p13.1 and 13q14 are uncommon in Waldenström macroglobulinemia clonal cells and mostly seen at the time of disease progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 132: 55-60.
28. Rivera A, Li M, Beltran G, Krause J. Trisomy 4 as the sole cytogenetic abnormality in a Waldenström macroglobulinemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 133: 172–3.
29. Terre C, Nguyen-Khac F, Barin C, Mozziconacci MJ, Eclache V, Leonard C, et al. Trisomy 4, a new chromosomal abnormality in Waldenström's macroglobulinemia: a study of 39 cases. *Leukemia* 2006; 20: 1634-6.
30. Braggio E, Dogan A, Keats JJ, et al. Genomic analysis of marginal zone and lymphoplasmacytic lymphomas identified common and disease-specific abnormalities. *Mod Pathol* 2012; 25: 651-60.
31. Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* 2013; 98: 649-54.
32. Schop R, Kuehl W, Van Wier S, Ahmann G, Price-Troska T, Bailey R, et al. Waldenström macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood* 2002; 100: 2996–3001.
33. Ocio EM, Schop RF, Gonzalez B, Van Wier SA, Hernandez-Rivas JM,

- Gutierrez NC, et al. 6q deletion in Waldenström macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *Br J Haematol.*2007; 136: 80- 6.
34. Chang H, Qi C, Trieu Y, Jiang A, Young KH, Chesney A, et al. Prognostic relevance of 6q deletion in Waldenström's macroglobulinemia: a multicenter study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2009; 9: 36-8.
 35. Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. The genomic landscape of Waldenström's Macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 2014; 123: 1637-46.
 36. Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2017; 102: 2077- 85.
 37. Guerrero ML, Tsakmaklis N, Xu L, et al: MYD88 mutated and wild-type Waldenström's Macroglobulinemia: Characterization of chromosome 6q gene losses and their mutual exclusivity with mutations in CXCR4. *Haematologica* 2018; 103: e408-e11.
 38. Sekiguchi N, Nomoto J, Nagata A, et al. Gene expression profile signature of aggressive Waldenström Macroglobulinemia with chromosome 6q deletion. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 6728128.
 39. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002; 17: 51-62.
 40. Hodge LS, Ziesmer SC, Yang ZZ, et al. IL-21 in the bone marrow microenvironment contributes to IgM secretion and proliferation of malignant cells in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2012; 120: 3774-82.
 41. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012; 367: 826-33.
 42. Xu L, Hunter ZR, Tsakmaklis N, et al: Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2016; 172:735-44.
 43. Castillo JJ, Hunter ZR, Yang G, Treon SP. Novel Approaches to targeting MYD88 in Waldenström Macroglobulinemia. *Expert Rev Hematol* 2017; 10: 739-44

44. Treon S, Cao Y, Xu L et al. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2014; 123: 2791-6.
45. Poulain S, Roumier C, Decambron A, et al: MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013; 121: 4504-11.
46. Treon SP, Gustine J, Xu L, et al: MYD88 wild-type Waldenström macroglobulinaemia: Differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *Br J Haematol* 2018; 180: 374-80.
47. Xu L, Hunter Z, Guang Y, et al. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* 2013; 121: 2051-8.
48. Capaldi I, May A, Schmitt-Graeff A et al. Detection of MYD88 L265P mutations in formalin-fixed and decalcified BM biopsies from patients with lymphoplasmacytic lymphoma. *Exp Mol Pathol* 2014; 97: 57-65.
49. Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2014; 28: 1698-704.
50. Gustine J, Meid K, Xu L, Hunter ZR, Castillo JJ, Treon SP. To select or not to select? The role of B- cell selection in determining the MYD88 mutation status in Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2017; 176: 822-4.
51. Drandi D, Genuardi E, Dogliotti I, et al. Highly sensitive *MYD88L265P* mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica* 2018; 103: 1029-37.
52. Greco A, Tedeschi A, Varettoni M, et al. Factors predicting transformation of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk* 2011; 11, 77-9.
53. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood* 2013; 121, 2522-8.
54. Kyle RA, Benson JT, Larson DR, et al. Progression in smoldering

- Waldenström macroglobulinemia: long-term results. *Blood* 2012; 119: 4462-6.
55. Yang G, Zhou Y, Liu X, et al. A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013; 122: 1222-32.
 56. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood* 2014; 123: 4120-31.
 57. Hunter ZR, Yang G, Xu L, et al: Genomics, signaling, and treatment of Waldenström macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2017; 35: 994-1001.
 58. Dotta L, Tassone L, Badolato R. Clinical and genetic features of warts, hypogammaglobulinemia, infections and myelokathexis (WHIM) syndrome. *Current Mol Med* 2011; 11, 317-25.
 59. Ngo HT, Leleu X, Lee J, et al. SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2008; 112: 150-8.
 60. Busillo J and Benovica J. Regulation of CXCR4 Signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 952-63.
 61. Lagane B, Chow KYC, Balabanian K, et al. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 2008; 112: 34-44.
 62. Schmidt J, Federmann B, Schindler N, et al. MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol* 2015; 69: 795-803.
 63. Castillo JJ, Treon SP. Toward personalized treatment in Waldenström macroglobulinemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017; 2017: 365-70.
 64. Jimenez C, Prieto-Conde MI, Garcia-Alvarez M, et al. Unraveling the heterogeneity of IgM monoclonal gammopathies: a gene mutational and gene expression study. *Ann Hematol* 2018; 97: 475–84.
 65. Treon SP, Gustine J, Meid K, et al: Ibrutinib monotherapy in symptomatic, treatment-naïve patients with Waldenström macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2018; 36: 2755-61.
 66. Xu L, Zachary R, Hunter N et al. Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like

- mutations in Waldenström Macroglobulinemia. *British J of Hematol* 2016; 172: 735-44.
67. Wu YY, Jia M, Cai H et al. Detection of MYD88^{L265P} and CXCR4^{S338X} mutations by cell-free DNA in Waldenström Macroglobulinemia. *Annals of Hematology* 2020; 99: 1763-9.
 68. Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2016; 128: 827-38.
 69. Castillo JJ, Moreno D, Arbelaez M, Hunter Z, Treon S. CXCR4 mutations affect presentation and outcomes in patients with Waldenström macroglobulinemia: A systematic review. *Expert Rev Hematol* 2019; 12: 1-9.
 70. Hunter Z, Yang G, Xu L, Liu X, Castillo J, Treon S. Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2017; 35: 994-1001.
 71. Seda V, Mraz M: B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol* 2015; 94:193-205.
 72. Argyropoulos KV, Vogel R, Ziegler C, et al. Clonal B cells in Waldenström's macroglobulinemia exhibit functional features of chronic active B-cell receptor signaling. *Leukemia* 2016; 30: 1116–25.
 73. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, et al. The WHIM-like CXCR4 (S338X) somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia* 2015; 29: 169-76.
 74. Treon SP, Tripsas, CK, Meid, K. et al. Ibrutinib in previously treated Waldenström's macroglobulinemia. *N Eng J Med* 2015; 372: 1430-40.
 75. Treon SP, Xu L. & Hunter, Z. MYD88 Mutations and response to ibrutinib in Waldenström's macroglobulinemia. *N Eng J Med* 2015; 373: 584-6.
 76. Dimopoulos MA, Trotman J, Tedeschi A, et al. Ibrutinib for patients with rituximab-refractory Waldenström's macroglobulinaemia (iINNOVATE): an open-label substudy of an international, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18:241–50.
 77. Castillo JJ, Xu L, Gustine J, et al. CXCR4 mutation subtypes impact response and survival outcomes in patients with Waldenström macroglobulinaemia treated with ibrutinib. *Br J Haematol* 2019; 187:356-3