



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

El riesgo de transformación maligna y los mecanismos involucrados en la progresión de las gammopatías monoclonales IgM asintomáticas

David Fernando Moreno Fajardo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



El riesgo de transformación maligna y los mecanismos involucrados en la progresión de las gammopatías monoclonales IgM asintomáticas

Memoria de tesis doctoral presentada por

David Fernando Moreno Fajardo

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por

Carlos José Fernández de Larrea Rodríguez

(Universidad de Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona)

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona.

Marzo, 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que he tenido el placer de conocer en el camino y me han aportado el conocimiento y consejos para poder finalizar esta tesis doctoral. Gracias a todo el servicio de Hematopatología y Hematología del Hospital Clínic de Barcelona, en especial a Laura Rosiñol, Joan Bladé y Dolors Colomer. Muchas gracias a Carlos Fernández de Larrea, por ser guía durante estos años y fomentar una carrera asistencial e investigadora. Gracias a todos mis amigos de Barcelona y Lima. Gracias a Nina, a mis padres y hermanos.

FINANCIAMIENTO

Los trabajos incluidos en esta tesis doctoral fueron financiados en parte por las becas de investigación PI19/00669 (Instituto de Salud Carlos III; cofinanciado por la Unión Europea), 2017SGR00792 (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya), Lab_AECC2021 (Asociación Española Contra el Cáncer), Emili Letang 2020 (Hospital Clínic de Barcelona), IIS-N-IBR-21-ESP-0065-V01 (Janssen-Cilag) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	19
1. Criterios diagnósticos y célula de origen.....	20
1.1 Definición de macroglobulinemia de Waldenström	20
1.2 Evolución de la definición de la gammapatía de significado incierto IgM	22
1.3 Enfermedades relacionadas con el componente monoclonal IgM ..	23
1.4 Célula de origen de la macroglobulinemia de Waldenström	24
2. Epidemiología de las gammapatías monoclonales IgM.....	26
2.1 Incidencia y prevalencia	26
2.2 Asociación con enfermedades autoinmunes e infecciones	26
2.3 Factores hereditarios.....	27
2.4 Supervivencia	28
3. Criterios y opciones de tratamiento para los pacientes con gammapatías monoclonales IgM.....	29
4. Perfil genómico de las gammapatías monoclonales IgM	31
4.1 Mutaciones en <i>MYD88</i>	31
4.2 Mutaciones en <i>CXCR4</i>	33
4.3 Relación clonal entre las mutaciones de <i>MYD88</i> y <i>CXCR4</i>	35
4.4 Otras mutaciones somáticas	36
4.5 Alteraciones cromosómicas.....	37
4.6 Evolución clonal de las gammapatías monoclonales IgM	38
5. Impacto del perfil genómico en la macroglobulinemia de Waldenström	38
5.1 Presentación clínica y respuesta al tratamiento	38

5.2 Impacto en la supervivencia global	39
6. Técnicas de detección de las mutaciones en <i>MYD88</i> y <i>CXCR4</i>	40
6.1 Reacción en cadena de polimerasa alelo específica	40
6.2 Reacción en cadena de polimerasa digital	42
7. Factores pronósticos en las gammopatías monoclonales IgM asintomáticas	44
7.1 Factores pronósticos clínicos	44
7.2 Factores pronósticos genéticos	46
HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	54
MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS	56
Trabajo 1.....	56
Trabajo 2.....	70
Trabajo 3.....	96
DISCUSIÓN	144
CONCLUSIONES	156
BIBLIOGRAFÍA	157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos propuestos por el Consorcio Europeo de la Macroglobulinemia de Waldenström.....25

Tabla 2. Impacto clínico de las mutaciones de *CXCR4*.....40

Tabla 3. Estudios que evaluaron el riesgo de progresión de pacientes con gammopatías monoclonales IgM asintomáticas.....48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Señalización de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*.....34

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABC: Célula B activada

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AKT: Proteína serina-treonina cinasa alfa (*Alpha serine/threonine-protein kinase*)

ARID1A: Gen del dominio de interacción rico en AT de la proteína A1 (*AT-Rich interaction domain 1A*)

ARN: Ácido ribonucleico

AS-PCR: Reacción en cadena de polimerasa alelo específica

BCL2: Gen de la proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B (*B-cell lymphoma 2*)

BCR: Receptor de células B

BCWM.1: Línea celular inmortalizada de macroglobulinemia de Waldenström en el Centro Bing del Instituto Dana Farber de Boston

BTK: Tirosina cinasa de Bruton

CD19: Antígeno del linfocito B CD19

CD79A: Gen de la cadena alfa de la proteína asociada al complejo del receptor de antígeno de células B (*B-Cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain*)

CD79B: Gen de la cadena beta de la proteína asociada al complejo del receptor de antígeno de células B (*B-Cell antigen receptor complex-associated protein beta chain*)

cfDNA: ADN libre circulante (*cell free deoxyribonucleic acid*)

CM: Componente monoclonal

CNA: Alteraciones numéricas cromosómicas (*copy number alterations*)

CXCL12: Ligand 12 de la quimiocina C-X-C (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*)

CXCL13: Ligand 13 de la quimiocina C-X-C (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 13*)

CXCR4: Receptor 4 de la quimiocina C-X-C (*C-X-C motif chemokine receptor 4*)

CXCR5: Receptor 5 de la quimiocina C-X-C (*C-X-C chemokine receptor type 5*)

CXCR7: Receptor 7 de la quimiocina C-X-C (*C-X-C chemokine receptor type 7*)

ddPCR: Reacción en cadena de polimerasa digital en gotas

ERK: Cinasa de señalización extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)

EXOC2: Gen del componente 2 del complejo de exociste (*exocyst complex component 2*)

FLC: Cadenas ligeras libres (*free light chains*)

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto

ICC: Consenso Internacional para la Clasificación de Neoplasias Linfoides Maduras

IL-1: Interleucina 1

IRAK1: Cinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1*)

IRAK3: Cinasa 3 asociada al receptor de interleucina 1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 3*)

IRAK4: Cinasa 4 asociada al receptor de interleucina 1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4*)

IRF4: Gen del factor 4 regulador del interferón (*interferon regulatory factor 4*)

LP: Linfoplasmocítico

MM: Mieloma múltiple

MO: Médula ósea

mTOR: Diana de la rapamicina en los mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

MW: Macroglobulinemia de Waldenström

MWQ: Macroglobulinemia de Waldenström quiescente

MWS: Macroglobulinemia de Waldenström sintomática

MYD88: Gen de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (*myeloid differentiation primary response 88*)

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor kappa B*)

OCI-Ly3: Línea celular 3 inmortalizada de linfoma difuso de células grandes B en el Instituto del Cáncer de Ontario

OCI-Ly19: Línea celular 19 inmortalizada de linfoma difuso de células grandes B en el Instituto del Cáncer de Ontario

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa

SPI1: Protooncogén Spi1 (*Spi-1 proto-oncogene*)

TCL1: Gen de la proteína 1 de la leucemia/linfoma de células T (*T-Cell Leukemia/Lymphoma 1*)

TLR: Receptor de tipo Toll (*toll-like receptor*)

TLR7: Receptor 7 de tipo Toll (*toll-like receptor 7*)

TP53: Gen de la proteína tumoral 53 (*tumor protein p53*)

VDJ: Recombinación de regiones variables, de diversidad y de unión (*variable, diversity and joining recombination*)

WES: Secuenciación completa del exoma (*whole exome sequencing*)

WGS: Secuenciación completa del genoma (*whole genome sequencing*)

WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)

Tesis en formato de compendio de publicaciones.

La tesis consta de 3 objetivos y 3 artículos.

- **David F Moreno**, Arturo Pereira, Natalia Tovar, María Teresa Cibeira, Laura Magnano, María Rozman, Mónica López-Guerra, Dolors Colomer, Beatriz Martín-Antonio, Raquel Jiménez-Segura, Ignacio Isola, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato, Aina Oliver-Caldés, Mari Pau Mena, Laura Rosiñol, Joan Bladé, Carlos Fernández de Larrea. Defining an Ultra-Low Risk Group in Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 23;13(9):2055. doi: 10.3390/cancers13092055.

Factor de impacto JCR 2021: 6,575

Cuartil: Q1 (Oncología)

- **David F Moreno**, Mónica López-Guerra, Sara Paz, Aina Oliver-Caldés, Mari-Pau Mena, Juan G Correa, Anthony M Battram, Miguel Osuna, Alfredo Rivas-Delgado, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato, Oriol Cardús, Natalia Tovar, María Teresa Cibeira, Raquel Jiménez-Segura, Joan Bladé, Laura Rosiñol, Dolors Colomer, Carlos Fernández de Larrea. Prognostic impact of MYD88 and CXCR4 mutations assessed by droplet digital polymerase chain reaction in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol*. 2023 Jan;200(2):187-196. doi: 10.1111/bjh.18502.

Factor de impacto JCR 2023: 6,5

Cuartil: Q1 (Hematología)

- **David F. Moreno**, Cristina Jiménez, Fernando Escalante, Elham Askari, Marta Castellanos Alonso, Mario Arnao, Ángela Heredia, Miguel Ángel Canales, Magdalena Alcalá, Arancha Bermúdez, Ana Saus Carreres,

María Casanova, Luis Palomera, Cristina Motlló, Ricarda García-Sánchez, Pablo Ríos Rull, Ramón García Sanz, Carlos Fernández de Larrea. Prognostic Risk and Survival of Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy: Results from a Spanish Multicenter Registry.

Enviado a publicación

INTRODUCCIÓN

La macroglobulinemia de Waldenström (MW) es un subtipo de linfoma B no Hodgkin caracterizado por la infiltración en médula ósea de linfoplasmocitos clonales productores de una inmunoglobulina M (IgM) en el suero^{1,2}. Tiene una prevalencia de 0,36 casos por 100.000 habitantes, siendo considerado una neoplasia hematológica rara³. Tras la secuenciación completa del genoma de la MW, se han identificado también mutaciones somáticas recurrentes, tales como el cambio de una leucina por una prolina en la posición 265 del aminoácido del gen *MYD88* (*MYD88* L265P) en el 90% de los casos^{4,5}. En el 40% de los casos se han identificado distintas mutaciones en *CXCR4*, algunas produciendo un codón de terminación⁵⁻⁷. Si bien las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4* son frecuentes en la MW, también se pueden observar en otros síndromes linfoproliferativos; por lo tanto, no son exclusivas^{8,9}.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la MW son aquellas ocasionadas por la infiltración medular por las células tumorales, como la anemia o trombocitopenia no inmunes. Entre las originadas por la cuantía o actividad del componente monoclonal (CM) sérico IgM destacan la hiperviscosidad, la neuropatía periférica, la crioglobulinemia y la anemia hemolítica por crioglobulinas^{1,10,11}. Al tratarse de un linfoma de bajo grado, la enfermedad suele tener un curso indolente. Aproximadamente el 20% de los pacientes de nuevo diagnóstico con MW son asintomáticos¹².

La MW asintomática o quiescente (MWQ) ha estado sujeta a numerosos estudios con el interés de identificar factores predictores de progresión a MW sintomática (MWS), permitiendo también la creación de escalas de riesgo a la progresión que orienten a una toma de decisión en la consulta médica. Según la serie de pacientes más amplia, la incidencia acumulada de progresión es aproximadamente del 30% a los dos años, valor que varía según la presencia o no de factores predictores de peor supervivencia libre de progresión¹³.

Debido a la necesidad de predecir el desarrollo de MWS y la facilidad de detectar un CM IgM en suero desde el punto de vista técnico, la gammapatía monoclonal

de significado incierto (GMSI) de isotipo IgM se considera el evento más inicial durante la evolución de un paciente con MW^{14,15}. La GMSI se caracteriza por la presencia de un CM IgM en ausencia de infiltración medular por el linfoma, y desde el punto de vista genómico, también puede presentar la mutación *MYD88* L265P, aunque en menor proporción^{1,16}. A pesar de que la GMSI IgM es considerada una entidad benigna, la tasa de progresión anual a MW u otra neoplasia linfoproliferativa suele ser de 1 al 2% anual, de acuerdo a la serie de pacientes con mayor seguimiento^{14,15,17-19}.

Por lo tanto, existen dos entidades clínico-patológicas pre-sintomáticas de la MW denominadas GMSI IgM y MWQ, ambas con un riesgo de progresión distinto, pero que comparten características biológicas similares y con un riesgo de progresar a MWS. Este concepto evolutivo de la MW representa un modelo de estudio único, donde es posible la identificación de biomarcadores iniciales con el objetivo de establecer un diagnóstico más preciso, así como el pronóstico de los pacientes.

1. Criterios diagnósticos y célula de origen

1.1 Definición de macroglobulinemia de Waldenström

El Dr. Jan Waldenström fue el primero en describir una enfermedad en el año 1944, caracterizada por la presencia de anemia, trombocitopenia, signos de hiperviscosidad del plasma en forma de epistaxis y alteraciones retinianas; todo ello asociado con un aumento de una proteína de elevado peso molecular, que posteriormente se identificó como IgM²⁰. Fue a partir del año 1970 en el que se asocia esta enfermedad, hasta entonces conocida como macroglobulinemia, con la presencia concomitante de linfomas B²¹. Posteriormente, se evidenció la presencia de un CM sérico IgM en varias neoplasias B maduras; sin embargo, se describió una que característicamente presentaba una infiltración por linfocitos B con diferenciación plasmocelular y de cuantía variable. De forma sistemática, estos linfocitos B expresaban las moléculas CD19 y CD20 en su superficie y eran negativos para CD5, CD10 y CD23, mientras que el

componente plasmocelular expresaba CD138²². De esta manera, se logró definir a la MW como un linfoma linfoplasmocítico en presencia de una gammapatía monoclonal IgM. Debido a que no existe una relación entre el porcentaje de infiltrado medular linfoplasmocítico y el CM sérico IgM, no se establece un punto de corte del CM IgM para la definición de MW¹. Tampoco se exige un punto de corte de infiltrado medular, ya que existen casos con un porcentaje inferior al 10% pero presentan características morfológicas, inmunofenotípicas y clínicas de una MWS. En ello se basa el criterio que se usa en la actualidad (Segundo Consenso Internacional de Waldenström del año 2003, actualizado por el Consenso Internacional para la Clasificación de Neoplasias Linfoides Maduras o ICC, por sus siglas en inglés) y que no ha variado desde su introducción: el diagnóstico de linfoma linfoplasmocítico se basa en la presencia de un agregado linfoide linfoplasmocítico y evidencia de linfocitos B y células plasmáticas clonales². A partir del descubrimiento de la mutación L265P en el gen *MYD88* en linfomas B indolentes y agresivos, y de forma más recurrente en casi el 90% de pacientes con MW, la presencia de esta alteración molecular puede orientar el diagnóstico. Sin embargo, la ausencia de la mutación no excluye el diagnóstico de la MW².

Dado que no todos los pacientes con MW presentan síntomas al diagnóstico, la lenta evolución de muchos de los pacientes, y la práctica incurabilidad de la enfermedad, se clasifica como un linfoma B de bajo grado o indolente. Por lo tanto, y como otros síndromes linfoproliferativos, al menos un 20% de pacientes no requieren tratamiento al diagnóstico según la experiencia clínica de la Clínica Mayo¹². Para definir a estos pacientes se usó el término anglosajón “*smoldering*”, que puede traducirse al castellano como latente o quiescente, por hacer una comparación con el mieloma múltiple (MM). Si bien no existe un consenso para la definición de MWQ, se extrapola a partir de la ausencia de síntomas^{13,23,24}. De este último, tampoco se exige un mínimo de tiempo de seguimiento con ausencia de síntomas para que un paciente sea considerado como MWQ.

1.2 Evolución de la definición de la gammapatía de significado incierto IgM

El término GMSI fue mencionado por primera vez en el año 1972 por Dr. Robert Kyle tras el análisis de una población de Minnesota de 1.200 adultos mayores de 50 años, encontrando que 15 (1,25%) pacientes presentaban un pico monoclonal en suero de isotipo IgG, IgA o IgM, sin tener ninguna evidencia de MM o MW²⁵. Con un mayor tiempo de seguimiento, la gran mayoría de los pacientes que presentaban un CM sérico inferior a 30 g/L no desarrollaron una transformación maligna^{14,15,26,27}. Otras series validaron estos resultados, además de encontrar que un subgrupo de pacientes con GMSI tenían un riesgo de transformación maligna durante el seguimiento. Más específicamente, los pacientes que presentaban un isotipo IgG o IgA progresaban a un MM o amiloidosis de cadenas ligeras, mientras que aquellos con isotipo IgM lo hacían de forma más frecuente a una MWS²⁶.

En la actualidad, la GMSI se define según los criterios establecidos por la Clínica Mayo (adoptado por la Organización Mundial de la Salud o WHO, por sus siglas en inglés)²⁸⁻³⁰ y la ICC^{1,2}. Los criterios de la WHO indican que se deben cumplir tres criterios: CM sérico IgM menor de 30 g/L, ausencia de síntomas y un infiltrado medular linfoplasmocítico inferior al 10%. Sin embargo, la Clínica Mayo recomienda únicamente realizar un estudio medular en pacientes con GMSI IgM que presenten factores predictores de progresión como un cociente de cadenas ligeras libres en suero alterado y un CM sérico mayor a 15 g/L¹⁴. Debido a que los pacientes con GMSI IgM que presentan una transformación maligna representan solamente una pequeña proporción, no se dispone de un estudio medular en forma de aspirado o biopsia de forma sistemática en todos estos pacientes.

Por otro lado, la ICC define a la GMSI IgM en el caso que exista un CM sérico IgM independiente de su cuantía junto con un infiltrado medular inferior al 10% de células plasmáticas, sin que haya evidencia de agregados linfoides B de tipo linfoplasmocítico. La ICC va más allá y plantea la definición de dos subgrupos de

GMSI IgM. El primero se denomina como “subtipo de célula plasmática”, definida por la presencia de células plasmáticas clonales en ausencia de una población linfoide B clonal y sin la mutación *MYD88* L265P. El segundo se denomina “no especificado”, incluyendo aquellos que tienen una población linfoide B clonal con mutación *MYD88* L265P, no presentan agregados linfoides de tipo linfoplasmocítico, y no cumplen criterios de otra neoplasia linfoide B madura². Debido a que no se menciona una cuantía de CM sérico IgM como punto de corte para orientar el diagnóstico de GMSI IgM, la ICC recomienda un estudio medular para descartar la presencia de un infiltrado linfoplasmocítico, y además evaluar la clonalidad por citometría de flujo.

Como se puede ver, existe cierta controversia en los aspectos diagnósticos, dado que algunos pacientes diagnosticados de GMSI IgM según los criterios de la WHO podrían no serlo según la ICC. La situación más compleja resulta al momento de diferenciar a pacientes con sospecha de GMSI IgM y MWQ, debido a que ninguno de los dos presenta síntomas. En cualquier caso, ambos criterios coinciden en el carácter asintomático de la GMSI IgM. Asimismo, se abren nuevas oportunidades para una continua evaluación de los parámetros diagnósticos.

1.3 Enfermedades relacionadas con el componente monoclonal IgM

Durante el Segundo Consenso de la Macroglobulinemia de Waldenström se añadió un nuevo concepto denominado “enfermedad relacionada con la IgM”, debido a la presencia de síntomas relacionados al CM sérico IgM sin evidencia de un linfoma subyacente. Los síntomas habitualmente están relacionados con la presencia de crioglobulinemia, amiloidosis por cadenas ligeras, y fenómenos autoinmunes como neuropatía periférica y la enfermedad por crioaglutininas^{1,31,32}.

La tabla 1 resume los criterios diagnósticos de las distintas entidades clínico-patológicas en presencia de un CM sérico IgM, propuesta por el Consorcio

Europeo de la Macroglobulinemia de Waldenström³³. En este nuevo consenso, y de forma similar a la ICC, no se considera un punto de corte de CM sérico para diferenciar la GMSI IgM de la MW, aunque destacan que raras veces excede los 30 g/L en la GMSI IgM. Sin embargo, se hace hincapié en que algunos pacientes pueden tener infiltrados medulares dudosos sin confirmación fenotípica. Éstos deberían considerarse como GMSI IgM, y recomiendan seguir el criterio de la WHO. Por lo tanto, el estudio medular resulta indispensable para hacer el diagnóstico diferencial entre la GMSI IgM y la MWQ, especialmente por sus implicaciones pronósticas y en el seguimiento.

1.4 Célula de origen de la macroglobulinemia de Waldenström

El linfocito B maduro con transformación maligna en los pacientes con MW se ha caracterizado por expresar los antígenos CD19, CD20, CD22, CD25, CD27 e IgM de superficie, junto con una restricción de cadena ligera. Más específicamente y comparando distintos perfiles de expresión génica entre subgrupos de linfocitos B de maduración normal y linfocitos B clonales de MW, aquellos con expresión normal de CD25 y expresión baja de CD22 estaban muy relacionados con el clon maligno en la MW, sugiriendo un probable origen clonal a partir de linfocitos B de memoria. Se describió también la negatividad para otros marcadores, tales como CD5, CD10, CD11 y CD23, ayudando a descartar otras neoplasias linfoides B como la leucemia linfocítica crónica, el linfoma folicular, la tricoleucemia y el linfoma de zona marginal^{34,35}.

Por otro lado, la expresión de CD38 y la presencia de células plasmáticas también están presentes, con el mismo tipo de restricción de cadena ligera que el clon de linfocitos. A pesar de ello, las células plasmáticas tanto en GMSI IgM y MW se caracterizan por tener una expresión antigénica distinta a la del MM. Se observa una diferenciación más bien plasmablástica durante la transición desde la GMSI IgM hasta la MW, debido a la positividad de CD19, CD20 y CD45, asociado a restricción de cadena ligera^{35,36}.

Desde el punto de vista genómico, se ha descrito que la mutación de *MYD88* L265P tiene un papel muy inicial en la transformación maligna de un linfocito B de memoria para el desarrollo final de la MW, ya que otras alteraciones numéricas cromosómicas (*copy number aberrations* o CNAs, por sus siglas en inglés) como las ganancias del cromosoma 4, 12 y 18 y la pérdida del brazo largo del cromosoma 6 (del6q) también pueden estar presentes e incluso aumentan a medida que progresa la enfermedad³⁷.

Por todo ello, la GMSI IgM, la MWQ y la MWS representan distintos estadios del mismo clon tumoral, motivo por el que, de forma conjunta, se hará referencia a las “gammapatías monoclonales IgM”, incluyendo estas tres entidades clínico-patológicas.

Tabla 1. Criterios diagnósticos propuestos por el Consorcio Europeo de la Macroglobulinemia de Waldenström, adaptado de Dogliotti *et al*³³.

	CM IgM	Infiltración medular	Síntomas por la IgM	Síntomas por la infiltración tumoral
MWS	+	+	+	+
MWQ	+	+	-	-
Enfermedades relacionadas con IgM	+	-	+	-
GMSI IgM	+	-	-	-

CM: componente monoclonal; MWS: macroglobulinemia de Waldenström sintomática; MWQ: macroglobulinemia de Waldenström quiescente; GMSI: gammapatía de significado incierto; IgM: inmunoglobulina de isotipo M.

2. Epidemiología de las gammapatías monoclonales IgM

2.1 Incidencia y prevalencia

Según los registros más grandes de pacientes procedentes de Estados Unidos y Suecia, la incidencia de MW es de 0,36 y 1,05 casos por cada 100.000 habitantes en los últimos 20 años, respectivamente. Del total de linfomas no Hodgkin, la MW representa el 2% de casos de nuevo diagnóstico en Estados Unidos. Es más frecuente en varones, especialmente a partir de los 60 años, y se ha descrito una mayor incidencia en pacientes estadounidenses de origen étnico caucásico³. En este mismo registro norteamericano, la incidencia de MW aumentó un 65% desde el año 1990 hasta el 2019, probablemente debido a su definición más precisa como una neoplasia linfoide B durante esos años y la mejora en las técnicas diagnósticas^{3,38}. Respecto de la GMSI IgM, no existen datos fidedignos debido a los sesgos metodológicos que pueden surgir para evaluar su incidencia real. Mientras tanto, la prevalencia se ha estimado aproximadamente entre un 0,4 y 0,6% en una serie de 21.463 habitantes de Minnesota²⁷. Aunque aún no se disponen de datos definitivos procedentes del registro prospectivo de Islandia, se ha encontrado una prevalencia de GMSI IgM en torno al 0,8% a partir de un total de 75.422 habitantes analizados³⁹. Por lo tanto, la prevalencia de GMSI IgM es mucho mayor que la de la MW.

2.2 Asociación con enfermedades autoinmunes e infecciones

Se ha sugerido una estimulación antigénica crónica como posible causa de la GMSI IgM y de la MW, no solo por una relación epidemiológica sino también molecular. La primera está basada en un estudio de 361 pacientes con MW en Estados Unidos, que tras una mediana de seguimiento de 12 años, se observó un elevado riesgo relativo de presentar la enfermedad en aquellos con historia de enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren y la enfermedad de Crohn, o aquellos con infecciones como el virus de la hepatitis C, el virus de la inmunodeficiencia humana y la rickettsiosis⁴⁰. Otro estudio poblacional en Suecia de 2.470 casos con MW y 9.698 controles identificó una asociación significativa entre la MW y la presencia de

enfermedades autoinmunes como la esclerosis sistémica, el síndrome de Sjögren, la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes, e infecciones como la neumonía, pielonefritis, sinusitis, infección por herpes zóster e influenza⁴¹.

El mecanismo detrás de la asociación de enfermedades autoinmunes e infecciones con la MW se ha podido esclarecer gracias a la introducción de la secuenciación de células individuales o *single cell sequencing*. Se ha descrito la expansión de una subpoblación CD19+ CXCR5 negativa de linfocitos B extrafoliculares con capacidad autorreactiva en pacientes con GMSI IgM y MW, similares a los que se encuentran en enfermedades autoinmunes⁴². Se ha considerado que la mutación *MYD88* L265P podría estar detrás de este proceso, al activar la señalización del receptor de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), mecanismo que a su vez se ha descrito como parte de la respuesta inmune frente a patógenos^{43,44}.

2.3 Factores hereditarios

El primer registro de agregación familiar en la MW fue en el año 1962, tras identificar dos hermanos con la enfermedad y la madre con una gammapatía monoclonal IgM asintomática⁴⁵. Un estudio de 257 pacientes con MW describió que el 18,7% tenían un familiar de primer grado con antecedente de MW, y en menor medida, con otras neoplasias linfoproliferativas. Este subgrupo de pacientes con antecedente familiar se diagnosticaba a una edad más temprana y con mayor carga tumoral. A nivel citogenético, se detectaron deleciones en 6q21-22.1 en la mitad de los casos, pero sin presentar diferencias entre aquellos que tenían historia familiar o no⁴⁶. Por otro lado, un estudio poblacional en Suecia describió también una elevada agregación familiar en pacientes con MW a comparación de otros linfomas, tras investigar casi 4.544 pacientes con linfomas no Hodgkin. De forma similar al estudio previo, la edad de presentación era menor en pacientes con MW y antecedente familiar⁴⁷. Desde entonces se han seguido describiendo hallazgos similares en MW y también en otras neoplasias hematológicas, sugiriendo un posible evento genético de base⁴⁸.

En este sentido, los estudios de asociación del genoma completo identificaron locus susceptibles en los cromosomas 1q y 4q en 11 familias que tenían alguno de sus miembros con GMSI IgM o MW y antecedentes en familiares de primer grado⁴⁹. Tras ampliar la serie, se encontraron también polimorfismos en los genes IL6 e IL10 de forma recurrente, pudiendo explicar en parte una predisposición genética hereditario en pacientes con antecedentes familiares de MW⁵⁰. Más recientemente, se ha podido identificar otra asociación de las regiones cromosómicas 6p25.3 (cercano a genes como *IRF4* y *EXOC2*) y 14q32.13 (cercano a *TCL1*) con el riesgo de presentar MW comparado con una población control de ancestro europeo, especialmente en casos con antecedentes familiares⁵¹. Sin embargo, queda aún por esclarecer la aplicación en forma rutinaria de estos resultados, dado la necesidad de ampliar dichos estudios en otras poblaciones con mayor diversidad étnica.

2.4 Supervivencia

Debido a la mayor prevalencia de GMSI IgM y MW con la edad, estimar la supervivencia y mortalidad de estos pacientes resulta muy complejo. Se ha descrito que los pacientes con GMSI IgM podrían tener una supervivencia relativa superior a los que tienen un isotipo IgG o IgA, siendo la causa más frecuente de muerte la progresión a MW. También se han encontrado mayor número de infecciones y comorbilidades respiratorias, digestivas, cardiovasculares y la presencia de tumores sólidos⁵². Con todo ello, los pacientes con MW tenían un 20% más riesgo de morir que la población general en un estudio poblacional usando un registro norteamericano con 7.289 casos⁵³. Otro estudio describió una supervivencia relativa del 73% y 57% a 5 y 10 años del diagnóstico de MW, respectivamente, siendo superior en los pacientes diagnosticados a partir del año 2001⁵⁴. De forma similar, un registro sueco de 1.555 pacientes con MW observó una mejora progresiva en la supervivencia relativa desde el año 1980 hasta 2005, alcanzando el 78% durante los años 2000 a 2005⁵⁵. De hecho, está descrito que en la era pre-rituximab, los pacientes con MWS presentaban más frecuentemente segundas neoplasias e infecciones como principales causas

de muerte, con una supervivencia global del 55% a 10 años⁵⁶. Tras la introducción del rituximab en los esquemas de tratamiento, el escenario cambió, prolongado la mediana de supervivencia global después del año 2000, siendo el rituximab el único factor independiente de menor mortalidad⁵⁷. Más recientemente, en la última década parece haber incluso mejorado la supervivencia de pacientes con MWS, ya que un registro holandés con 6.234 casos estableció una supervivencia relativa del 86% a 5 años, disminuyendo hasta el 75% a los 15 años del diagnóstico⁵⁸. El exceso de mortalidad progresivo en los últimos 30 años, por tanto, continúa observándose en los pacientes con MW, reforzando la idea que se trata de una neoplasia actualmente incurable.

Como se ha mencionado, los registros utilizados para analizar la supervivencia relativa no han detallado si los pacientes presentaban síntomas al diagnóstico. Además, debido a los cambios en los criterios diagnósticos y las diferencias entre ellos, existe un sesgo añadido al momento de estimar la supervivencia relativa de pacientes con MW, ya que algunos pacientes con GMSI IgM y MWQ pudiesen haber estado incluidos.

3. Criterios y opciones de tratamiento para los pacientes con gammapatías monoclonales IgM

Los criterios para seleccionar a los pacientes que requieran tratamiento fueron establecidos en el Segundo Consenso Internacional de Macroglobulinemia de Waldenström: la aparición de sintomatología constitucional (síntomas B, fatiga, pérdida de peso), la presencia de adenopatías o esplenomegalia progresiva y sintomática, la anemia (hemoglobina inferior a 100 g/L) o trombocitopenia (cifra plaquetaria inferior a $100 \times 10^9/L$) infiltrativas, y las complicaciones relacionadas con el componente monoclonal IgM (síndrome de hiperviscosidad, neuropatía periférica sintomática, amiloidosis AL sistémica, insuficiencia renal, crioglobulinemia sintomática o anemia hemolítica por crioaglutininas)⁵⁹. A pesar de que no existe un consenso sobre el valor de CM sérico o nivel de IgM a partir del cual tratar a un paciente con MWQ, se recomienda una mayor vigilancia, y

ante la sospecha de hiperviscosidad, tratar a un paciente con un CM sérico superior a 60 g/L^{10,11}.

Las opciones de tratamiento para la MWS han pasado desde los agentes alquilantes, el rituximab y combinaciones con alquilantes, el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos e inhibidores de proteasoma a los inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK, por sus siglas en inglés). Según las recomendaciones del último consenso internacional, la primera línea de tratamiento para un paciente con MWS incluye la inmunquimioterapia basada en rituximab y el uso de inhibidores de BTK. El esquema de rituximab con bendamustina se considera como tratamiento de elección en aquellos casos que requieran una disminución rápida de la carga tumoral, dada una probable supervivencia libre de progresión más larga frente al esquema de rituximab con ciclofosfamida y dexametasona^{60,61}. Los inhibidores de BTK se prefieren en pacientes con comorbilidades o mayor fragilidad. También se consideran en pacientes jóvenes, en los que la exposición a agentes alquilantes a largo plazo pueda facilitar el desarrollo de segundas neoplasias⁶⁰. No existe un consenso para determinar el grado de fragilidad ni la edad, por lo que la decisión finalmente será dependiente del médico tratante. La decisión entre ibrutinib o zanubrutinib depende de las comorbilidades del paciente. Se hace hincapié en la menor incidencia de fibrilación auricular en pacientes con zanubrutinib, pero con mayor riesgo de neutropenia e infecciones⁶². En el caso de optar por ibrutinib, la combinación con rituximab también se considera una opción de tratamiento⁶³. Asimismo, se recomienda el análisis de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*, debido a las mejores respuestas observadas en pacientes tratados con zanubrutinib y *CXCR4* mutado⁶⁴.

En caso de presentar síndrome de hiperviscosidad, el recambio plasmático está indicado. Además, se recomienda el recambio plasmático de forma preventiva en ausencia de hiperviscosidad en pacientes con un valor de IgM por encima de 40 g/L y cuya decisión de tratamiento sea una combinación de un agente alquilante o inhibidor de BTK con rituximab, dado el alto riesgo de efecto “flare” ocasionado por el rituximab^{60,65}.

4. Perfil genómico de las gammopatías monoclonales IgM

4.1 Mutaciones en *MYD88*

La mutación de *MYD88* L265P se encuentra de forma recurrente en las gammopatías monoclonales IgM, desde la GMSI IgM, pasando por la MWQ y finalmente en la MWS. También está presente en otras neoplasias linfoides B. Inicialmente descrita en linfomas B de fenotipo activado o ABC (por sus siglas en inglés) y en la línea celular de linfoma difuso de células grandes B OCI-Ly3, en los cuales se describió una dependencia de la vía del factor nuclear kappa B (NF-kB) a la proteína adaptadora MYD88, que a su vez interviene en la señalización del receptor de IL-1 y del receptor de tipo *toll-like*⁸. Dado que la vía NF-kB interviene directamente en la proliferación celular, y tras analizar con más detalle usando ARN de interferencia y secuenciación del transcriptoma, se identificó una mutación en forma de un cambio de aminoácido de leucina a prolina en la posición 265 del dominio del receptor de tipo *toll-like* (TIR) en la proteína MYD88. A nivel funcional, la mutación promovía el ensamblaje de lo que posteriormente se conoció como *myddosome*, o el conjunto de IRAK1, IRAK4 y la proteína BTK, causando finalmente la fosforilación y activación del NF-kB. Del total de casos con linfoma difuso de células grandes B de fenotipo ABC, un 29% de los pacientes presentaban la mutación *MYD88* L265P⁸.

Posteriormente, la secuenciación completa del genoma (WGS, por sus siglas en inglés) de linfocitos B CD19+ aislados de médula ósea en 30 pacientes con MW identificó una variante somática recurrente en la posición 38182641 (genoma humano de referencia versión 37) de la región cromosómica 3p22.2 que resultaba en un cambio del nucleótido timina (T) a citosina (C) en el gen *MYD88*. Casi el 90% de los pacientes presentaba esta mutación, cuyo valor predictivo además era el de un cambio de aminoácido de leucina a prolina, similar al estudio descrito en el linfoma de células grandes B activado⁴. Otras mutaciones que se han descrito en el gen *MYD88* son S243N, M232T, V217F y S219C, aunque no superan el 2% del total de casos, y se desconoce su impacto funcional en la MW^{4,5}.

Tras la identificación de esta mutación y con el objetivo de ampliar la detección usando técnicas más dirigidas, se desarrolló un ensayo para analizar *MYD88* L265P usando una reacción en cadena de polimerasa alelo específica (AS-PCR). Con ello, se replicaron los mismos resultados en distintos centros y con una sensibilidad del 0,1% en muestras enriquecidas de linfocitos B CD19+. Asimismo, se identificó la mutación en el 54% de pacientes con GMSI IgM. Ningún paciente con MM presentó la mutación¹⁶.

Dada la presencia de la mutación en estadios pre-malignos, se consideró que *MYD88* L265P podría ser un evento inicial en el desarrollo tumoral de la MW. Mediante el uso de *single cell sequencing* sobre ADN de células aisladas en distintos estadios de maduración de linfocitos B, dos estudios describieron consecutivamente la presencia de la mutación *MYD88* L265P en precursores de linfocitos B de pacientes con GMSI IgM y MW, incluso en aquellas poblaciones B fenotípicamente consideradas como normales^{42,66}. En un modelo murino, la presencia de la mutación en progenitores, precursores B y linfocitos B de centro germinal (CG) genera una expansión de células plasmáticas, plasmablastos, y linfoplasmocitos. El desarrollo de linfoma linfoplasmocítico solo se presentó tras una latencia larga de al menos 12 meses de media, requiriendo concomitantemente la aparición de alteraciones añadidas como otras mutaciones somáticas, CNAs, una activación constitutiva del receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés) y sobreexpresión del gen *BCL2*⁶⁶.

Por lo tanto, se considera que la mutación *MYD88* L265P es un evento inicial, y que la presencia de otras alteraciones redirige el clon hacia un destino con mayor complejidad genética, y eventualmente, al desarrollo de MW. Ello se traduce también en el hecho que prácticamente la mitad de las pacientes con GMSI IgM tienen la mutación, pero solo muy pocos presentan una progresión hacia MWS.

4.2 Mutaciones en *CXCR4*

Después de la mutación *MYD88* L265P, la siguiente alteración somática más recurrente en la MW es un conjunto de mutaciones en el gen *CXCR4*. *CXCR4* es un gen que codifica para una proteína receptora y acopladora de proteína G que lleva el mismo nombre, encargada de la transducción de señales del exterior celular. De forma específica, *CXCR4* liga a *CXCL12*⁶⁷. La unión de *CXCL12* con *CXCR4* está asociado a una respuesta inmune e inflamatoria frente a antígeno y la homeostasis o migración celular, y también en el desarrollo embrionario^{68,69}. Hay múltiples vías de señalización que intervienen tras la activación de *CXCR4*. Una de ellas es la de PI3K, que culmina en la fosforilación de una serie de proteínas y factores de transcripción como NF-κB, permitiendo también mayor proliferación celular⁷⁰.

Las mutaciones descritas en *CXCR4* en aproximadamente el 40% de pacientes con MW incluyen aquellas que generan un codón de terminación o *nonsense*, y por lo tanto con mayor impacto patogénico al modificar una proteína, y otras con menor impacto, en general mutaciones de cambio en el marco de lectura o *frameshift*^{5,7}. Dentro de ellas, el 50% de mutaciones en *CXCR4* incluyen un cambio de los nucleótidos C o adenina (A) por guanina (G) en la posición 1013 del gen (C1013G o C1013A) y que predice un codón de terminación en la posición del aminoácido 338 (serina) de la región C terminal de la proteína. Las mutaciones *frameshift* en *CXCR4* son variadas, entre las que se incluyen la S344, S339 y S341, sin tener un impacto pronóstico negativo^{5,69,70}. El desarrollo posterior de sondas específicas para estas mutaciones en concreto, o el uso de secuenciación Sanger, identificaron también la presencia de *CXCR4* S338* en pacientes con GMSI IgM, en aproximadamente un 20% de casos⁷.

Las mutaciones en *CXCR4* también han sido descritas en células de línea germinal del síndrome WHIM, una enfermedad congénita caracterizada por la presencia de verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones y mielocatexis⁷¹. El desarrollo de fármacos antagonistas de la señalización de *CXCR4* en este síndrome también llevó a estudiar el impacto funcional de las mutaciones de

CXCR4 en la MW. Se demostró que las células BCWM.1, una línea celular de MW con la mutación *CXCR4* S338* C1013G, generaban una diseminación tumoral extramedular y elevada secreción de IgM sérica. A nivel de expresión génica, la mutación C1013G estaba asociado con una sobreexpresión de genes que intervienen en la señalización de BTK y PI3K⁶⁸. Asimismo, las células BCWM.1 presentaban mayor resistencia a inhibidores de mTOR, PI3K y BTK. Un estudio similar reportó que las mutaciones S338* de *CXCR4* estaban asociados a una mayor activación de AKT y ERK, generando también resistencia a inhibidores de BTK⁷². En la figura 1 se puede observar gráficamente la señalización de moléculas tras las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*.

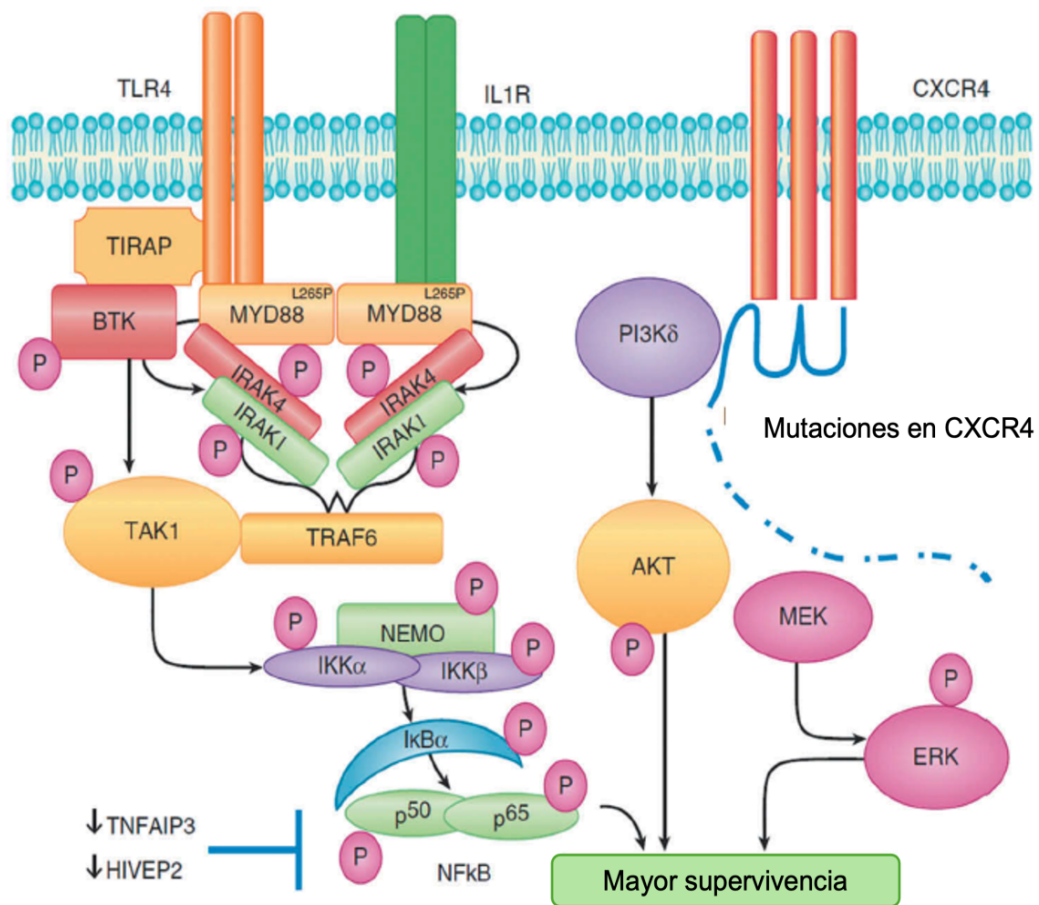


Figura 1. Señalización de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*. Adaptado de Castillo, et al⁶⁹.

4.3 Relación clonal entre las mutaciones de MYD88 y CXCR4

Las mutaciones de *CXCR4* S338* tanto en pacientes con GMSI IgM como en la MW se encuentran, en gran mayoría, en casos que ya presentan la mutación *MYD88* L265P. Además, la carga alélica de las mutaciones en *CXCR4* son inferiores en comparación a la de *MYD88* y con una distribución más heterogénea, sugiriendo una posible relación subclonal y de adquisición posterior durante la evolución del clon tumoral⁵. También se ha descrito más de una mutación de *CXCR4* en el mismo paciente, habitualmente de tipo *frameshift* y cuyo valor patogénico queda aún por dilucidar⁷.

Dos estudios han demostrado la presencia de mutaciones de *CXCR4* en células tumorales de pacientes con MW usando la tecnología de *single cell sequencing* o con secuenciación completa del exoma (WES, por sus siglas en inglés). El momento de adquisición de mutaciones *CXCR4* en pacientes con *MYD88* L265P no está aún determinado por la ausencia de estudios longitudinales; sin embargo, la secuenciación *ex vivo* del modelo murino con la mutación de *MYD88* L265P en distintas poblaciones de linfocitos B no observó la adquisición ulterior de mutaciones en *CXCR4* tras desarrollar el linfoma linfoplasmocítico. Con ello, se sugiere la hipótesis que *CXCR4* sea un evento incluso más tardío, y que la expansión clonal en casos *MYD88* mutados se deba a otras alteraciones como la sobreexpresión de *BCL2* o señalización constitutiva del BCR⁶⁶.

A nivel de expresión génica usando la tecnología de *single cell sequencing* de ARN, existe sobreexpresión de *CXCR4* también en linfocitos B de memoria en pacientes con *MYD88* L265P, pero con *CXCR4* no mutado. Otro estudio haciendo un análisis de expresión diferencial de genes en subgrupos de pacientes con mutación de *MYD88* con o sin mutación de *CXCR4*, encontró que la presencia de ambas mutaciones estaba asociada con una sobreexpresión de *TLR7*, *IRAK3* y *CXCR7*⁷³. Similares resultados fueron descritos tras un análisis de metilación, en el que las mutaciones de *CXCR4* en pacientes con *MYD88* L265P se encontraban más frecuentemente en un subgrupo de linfocitos B de memoria⁷⁴. Todo lo anterior sugiere que ambas mutaciones comparten

mecanismos en común, especialmente aquellos con el aumento de la señalización para activar NF- κ B y mediar en la proliferación tumoral.

4.4 Otras mutaciones somáticas

Más allá de *MYD88* y *CXCR4*, otras mutaciones somáticas están presentes en la MW y sus entidades precursoras. De forma consistente, las mutaciones en *ARID1A* se han descrito entre el 10 y 17% de casos con MW⁵, y solo en el 3% en aquellos con GMSI IgM⁷⁵. *ARID1A* es un gen regulador de la expresión génica al remodelar la cromatina. A nivel de expresión génica, está asociado con una sobreexpresión de *CXCL13*, que a su vez interviene en el reclutamiento tumoral en médula ósea⁷⁶. Las mutaciones en el BCR, como *CD79A* y *CD79B* son las siguientes en frecuencia. En torno a un 12% y 3% de casos con MW y GMSI IgM la presentan, respectivamente^{5,75}. Más específicamente, las mutaciones en *CD79B* están asociadas con mayor riesgo a la transformación a un linfoma B de alto grado a partir de una MW con la mutación *MYD88* L265P⁷⁷.

Las mutaciones en *TP53* se han descrito entre un 7 a 10% de los pacientes con MW, asociado con deleciones en 17p. También se han descrito casos con mutaciones en *TP53* de tipo homocigote, y asociados con pérdida de la heterocigosidad y disomía uniparental. En todos los casos, los estudios describen la co-ocurrencia de mutaciones de *MYD88* y *CXCR4*⁷⁸. En GMSI IgM, solo un estudio ha encontrado un 5% de prevalencia mutaciones en *TP53*⁷⁵.

SPI1 es un gen recientemente descrito en la MW, encargado de codificar a un factor de transcripción del desarrollo mieloide y linfoide B. Hasta el 6% de casos con MW presentan la mutación somática *SPI1* Q226E, generando un cambio de aminoácido de glutamina (Q) a ácido glutámico (E) en la posición 226 (Q226E), tras analizar el exoma y re-secuenciar los mismos casos usando un panel de genes con mayor cobertura. Los casos de MW con la mutación en *SPI1* presentaban un enriquecimiento de genes relacionados con mayor proliferación celular, señalización compartida con *MYC* e *IRF4*, y una menor diferenciación plasmática. *In vitro*, se demostró que los inhibidores del bromodominio BET o la

lenalidomida podrían jugar un papel como fármacos dirigidos a esta mutación. No se han descrito mutaciones de *SPI1* en pacientes con GMSI IgM⁷⁹.

Con todo ello, parece claro que la MW presenta un espectro mutacional amplio, presente incluso en la GMSI IgM, caracterizado principalmente por *MYD88* L265P y *CXCR4* S338* C1013G y C1013A, seguidamente en menor medida de otras, como son *ARID1A*, *CD79A/B*, *TP53* y *SPI1*.

4.5 Alteraciones cromosómicas

Los análisis de secuenciación del genoma, exoma y usando sondas de hibridación de regiones específicas del cromosoma demuestran la presencia de alteraciones numéricas en el cromosoma 6, principalmente en forma de pérdidas del brazo largo (del6q), y en menor medida ganancias del brazo corto. Los genes que se encuentran en la región 6q son *TNFAIP3*, *PRDM1*, *ARID1B*, *HIVEP2*, *FOXO3*, *IBTK*, *PLEKHG1* y *BCLAF1*, y se han asociado previamente con el crecimiento tumoral en neoplasias linfoides B, al estar involucrados en la señalización de NF- κ B^{5,37}. La prevalencia de la del6q fue de un 4% en pacientes con GMSI IgM, 9% en MWQ y hasta un 30% en MWS. Otro estudio describió resultados similares usando otra técnica, en el que las CNAs (ganancias en los cromosomas 4, 6, 12 y 18, y pérdidas en 6q22.3-6q25.3) aumentaban progresivamente en cada estadio de la enfermedad, pasando de un 36% en GMSI IgM a un 82% en MWS. La mayor parte de estudios han encontrado la del6q en pacientes con *MYD88* L265P^{37,80}. En cambio, se describen ganancias del cromosoma 12 en pacientes con *MYD88* wild type. A través de un algoritmo, se logró incluso identificar que las ganancias del cromosoma 12 se adquirirían precozmente en estos casos, de manera similar a la leucemia linfocítica crónica⁸¹.

Otras alteraciones cromosómicas complejas se encuentran escasamente en comparación a aquellos casos con MM, como la cromotripsis y cromoplexia. De hecho, un estudio demostró la presencia de cromoplexia en 3 casos de MWS, y que estaba asociada con del6q y otros genes relevantes como *NFKB2*, *MEF2B*,

CDKN2C, *ARID1B* y *PRDM1*. Sin embargo, no se encontró ninguna alteración compleja en pacientes con GMSI IgM y MWQ⁸¹.

4.6 Evolución clonal de las gammopatías monoclonales IgM

Con la información procedente de los análisis del genoma y transcriptoma, tanto a un nivel conjunto como de células individuales, se considera que la mutación *MYD88* L265P es el evento más inicial presente en progenitores linfoides B, y que, durante su maduración, termina adquiriendo mayor número de mutaciones somáticas y CNAs, asimismo presenta una estimulación antigénica en un medio pro-inflamatorio, que confieren finalmente un mayor riesgo de transformación maligna^{42,66}. Queda por esclarecer con más detalle y en estudios longitudinales la dinámica en la que se adquieren las alteraciones somáticas a partir de *MYD88* L265P.

5. Impacto del perfil genómico en la macroglobulinemia de Waldenström

5.1 Presentación clínica y respuesta al tratamiento

La presencia de mutaciones somáticas en *MYD88* y *CXCR4* ha permitido la identificación de genotipos con traducción clínica. Los pacientes con ambas mutaciones representan aproximadamente el 40% de pacientes con MWS y se caracterizan por la presencia de mayor infiltración linfoplasmocítica en médula ósea, niveles más elevados de IgM en suero y mayor incidencia de hiperviscosidad. La mayoría de los pacientes (60%) presentan mutaciones en *MYD88* pero no en *CXCR4* y suelen tener una infiltración moderada linfoplasmocítica en médula ósea⁶. Menos del 10% de casos no tienen mutaciones en *MYD88* ni en *CXCR4*, y se denominan *wild type*. Representan un subgrupo heterogéneo, con mayor componente adenopático y mayor riesgo de transformación a un linfoma B de alto grado⁸².

Se ha descrito que la presencia de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4* modelan también la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, los pacientes con mutaciones

en *MYD88* en ausencia de *CXCR4* son los que alcanzaron una respuesta global superior (entre el 94% y 100%) en los ensayos de ibrutinib^{83,84}. Sin embargo, con un seguimiento más largo y una reciente actualización de la serie, las tasas de respuesta eran similares en los pacientes tratados con ibrutinib y con mutaciones en *CXCR4*. Por otro lado, se ha reportado que los pacientes sin mutaciones en *MYD88* lograban peores respuestas globales; escasamente entre el 50% y 82%⁸⁵. Retrospectivamente, también se identificó que los pacientes con mutaciones de *CXCR4* S338* eran aquellos con menores respuestas globales⁷². De forma similar, el inhibidor de BTK de segunda generación acalabrutinib también logró mayores respuestas en pacientes con mutaciones en *MYD88* en comparación con aquellos *wild type*⁸⁶. En el caso de zanubrutinib y venetoclax, los pacientes con mutaciones en *CXCR4* alcanzaban una menor tasa de respuestas parciales o globales⁸⁷.

5.2 Impacto en la supervivencia global

Los pacientes sin mutaciones en *MYD88* ni *CXCR4* presentaron una supervivencia global más corta en una serie de 174 pacientes con MW (incluyendo pacientes con MWQ). No hubo diferencias significativas entre los otros dos subgrupos (*MYD88* mutado con o sin mutaciones en *CXCR4*)⁶. El seguimiento actualizado de esta serie determinó que la supervivencia estimada a 10 años en pacientes con y sin la mutación *MYD88* L265P era del 90% y 73%, respectivamente⁸². Otra serie de 219 pacientes que incluyó tanto MWQ y MWS demostró que no había diferencias en la mediana de supervivencia global de pacientes con *MYD88* L265P y *MYD88 wild type*, estimada en 10 y 14 años, respectivamente. De ellos, los pacientes con *MYD88 wild type* tenían un mayor riesgo de transformación un linfoma B de alto grado⁸⁸, un evento de pronóstico ominoso en estos casos.

A pesar de que no hay datos concluyentes respecto de la supervivencia global, los pacientes con MW sin mutaciones en *MYD88* representan un porcentaje actualmente inferior al 10%, con una gran heterogeneidad clínica, mayor transformación histológica y, por tanto, la dificultad para modelar la supervivencia

en este subgrupo es alta. Además, analizar la supervivencia global conjuntamente de pacientes con MWQ y MWS puede estar sesgada por el riesgo distinto que hay en ambos grupos. La tabla 2 resume las características clínicas asociadas con los genotipos descritos en *CXCR4*.

Tabla 2. Impacto clínico de las mutaciones de *CXCR4*. Adaptado de Castillo et al⁶⁹.

	<i>CXCR4</i> mutado	<i>CXCR4</i> no mutado
Niveles de IgM en suero	+++	+
Riesgo de hiperviscosidad	+++	+
Adenopatías	+	+++
Esplenomegalia	+	+
Niveles de β 2-microglobulina	+	++
Trombocitopenia	++	+
Leucopenia	+	+
Anemia	+	+
Infiltración en médula ósea	++	+
Enfermedad de von Willebrand adquirida	+++	+
Tiempo hasta tratamiento	Menor	Largo

IgM: inmunoglobulina M

6. Técnicas de detección de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*

6.1 Reacción en cadena de polimerasa alelo específica

Tras la detección de la mutación *MYD88* L265P usando WGS, se han desarrollado cebadores “*primers*” específicos para una reacción en cadena de

polimerasa alelo específica (AS-PCR). El primer estudio diseñó una AS-PCR con un total de 159 pares de bases (pb) y usando el compuesto *SYBR green* reportó una prevalencia de la mutación en el 54% de pacientes con GMSI IgM y el 93% en MW (sin distinguir entre MWS y MWQ), en linfocitos CD19+ aislados de médula ósea. La sensibilidad era del 0,1%, calculado a partir de diluciones seriadas de una muestra conocida con mutación homocigota de *MYD88 L265P* (línea celular de linfoma difuso de células grandes B OCI-LY3) y en otra muestra conocida sin la mutación (línea celular de linfoma difuso de células grandes B OCI-LY19). La sensibilidad era superior usando una AS-PCR en tiempo real, alcanzando el 0,08%. La carga mutacional presentó una correlación significativa con la carga tumoral medida por otros biomarcadores (como el CM sérico IgM y el grado de infiltración medular), solo en pacientes con MW. En cambio, no se encontró una correlación significativa entre la carga mutacional por AS-PCR en tiempo real y la presencia de linfocitos B clonales por citometría de flujo en pacientes con GMSI IgM¹⁶. Otro estudio desarrolló una AS-PCR más específica usando sondas *Taqman*, alcanzando una sensibilidad aproximada del 0,25% para detectar *MYD88 L265P* sin requerir aislamiento CD19+. Tras ella, se evidenció una elevada prevalencia de la mutación, siendo hasta del 87% en GMSI IgM. En cambio, el 86% de los pacientes con MW presentaban la mutación^{89,90}.

Con la mejora de las técnicas de PCR para *MYD88 L265P*, y disponiendo de muestras aisladas CD19+ como médula ósea completa o sangre periférica y confirmando por secuenciación Sanger, actualmente se conoce que más del 90% de pacientes con MW presentan la mutación. Sin embargo, la situación es distinta en la GMSI IgM, con una prevalencia que varía entre el 50% y 87%, usando células aisladas y muestras de sangre periférica o médula ósea completa^{7,16,75,89,91}. La sensibilidad actual ronda en torno al 0,1%.

Dada la patogenicidad de las mutaciones *CXCR4 S338* C1013G* y *C1013A*, también se desarrollaron *primers* específicos para AS-PCR en tiempo real (usando *SYBR green*). La sensibilidad por AS-PCR para estas dos mutaciones fue del 0,4% y del 0,16%, respectivamente. Con ello se obtuvo un 30% de positividad de mutaciones de *CXCR4* en pacientes con MW. Añadiendo

secuenciación Sanger y tras detectar otras mutaciones de *CXCR4*, la prevalencia aumentó a un 43% de pacientes con MW. Sin embargo, se detectó únicamente la mutación *CXCR4* S338* C1013G en el 17% de pacientes con GMSI IgM⁷. Otros estudios usando secuenciación Sanger en linfocitos B CD19+ aislados en pacientes con GMSI IgM mostraron una prevalencia del 4% de mutaciones de *CXCR4*⁷⁵.

Debido a la necesidad del aislamiento CD19 a partir de muestras de sangre periférica o médula ósea para alcanzar una mejor resolución en la detección de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*, se ha propuesto el uso de ADN libre circulante (*cell free DNA*, por sus siglas en inglés). Con ello, se han podido detectar las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4* mediante AS-PCR. En pacientes con MW, *MYD88* L265P pudo ser detectada con una prevalencia entre el 71% y 85%, mientras que las mutaciones de *CXCR4* presentaron mayor variabilidad en torno a un 4% y 17%⁹²⁻⁹⁴.

Otra técnica más reciente basada en AS-PCR es el uso de una PCR competitiva usando sondas *Taqman*, denominada Cast-PCR. Aparte de los *primers* específicos para el alelo mutado, la Cast-PCR incorpora un oligonucleótido que sirve como bloqueante del alelo *wild type*, compitiendo con el *primer* específico para el alelo mutado, y de esta manera se incrementa la especificidad. La sensibilidad de la técnica es similar a la de una AS-PCR convencional, pero con mayor especificidad; también permite la cuantificación de la carga alélica mutada. Usando células tumorales CD19+ aisladas, se ha detectado la mutación *MYD88* L265P en el 89%, 97% y 92% de casos con GMSI IgM, MWQ y MWS, respectivamente. Mientras que usando cfDNA, la positividad de la mutación fue del 80%, 82% y 93%, respectivamente⁹⁵.

6.2 Reacción en cadena de polimerasa digital

La mejora en las técnicas de PCR para alcanzar una mayor sensibilidad en la detección de mutaciones somáticas supuso también el desarrollo de una PCR digital o *droplet digital* PCR (ddPCR, por sus siglas en inglés). La ddPCR, a

diferencia de otros métodos de PCR, requiere la generación de gotas emulsificadas en una solución de aceite y agua donde la muestra original se divide. Por lo tanto, el ADN genómico estará presente en cada una de las submuestras en forma de gotas, para luego pasar por procesos de amplificación por PCR^{96,97}. Esta técnica también requiere el uso de sondas *Taqman*, similar a otros métodos descritos con AS-PCR convencional. La detección del objetivo o *target* de la PCR (por ejemplo, un cambio de nucleótido o mutación) es determinada en cada partición y siguiendo un conteo de números enteros (0 es ausencia de molécula *target* o negativo). Debido a esta distribución y a la probabilidad de que muestras con mayor ADN o *target* se encapsulen en una gota y viceversa, se realiza una corrección de Poisson. Para lograr una especificidad alta, se ha considerado que al menos 10.000 gotas sean incluidas como mínimo para poder estimar un conteo correcto de *targets*. Este procedimiento logra una sensibilidad superior a otros métodos de PCR, con lo cual sirve para detectar mutaciones raras. De hecho, la mutación *BRAF* V600E sirvió como modelo para establecer el protocolo inicial, obteniendo una sensibilidad del 0,001%⁹⁸.

La aplicación en la MW se demostró en un estudio usando muestras de médula ósea, y sangre periférica sin aislamiento celular CD19+ previo. La sensibilidad de la ddPCR para detectar *MYD88* L265P fue del 0,0035%. Con ello se obtuvo una prevalencia de la mutación del 95% en 133 pacientes con MW (sin distinguir entre MWS y MWQ) en médula ósea, y un 71% en sangre periférica. En cfDNA, disponible en 60 casos con MW, se detectó la mutación en el 88% de pacientes⁹⁹. Usando la misma estrategia, se detectó la mutación en el 87% de un total de 62 pacientes con GMSI IgM. Mientras que en cfDNA, *MYD88* L265P pudo ser detectada en 3 de 4 pacientes con GMSI IgM¹⁰⁰. También se propuso como un potencial marcador de seguimiento de enfermedad mínima residual en pacientes en tratamiento, tras detectar una concordancia entre las técnicas para evaluar el reordenamiento de VDJ y la ddPCR, superando a la AS-PCR^{99,100}. Por lo tanto, la ddPCR ofrece una resolución superior a lo establecido por otras técnicas convencionales para detectar la mutación *MYD88* L265P en pacientes con gammapatías monoclonales IgM.

7. Factores pronósticos en las gammopatías monoclonales IgM asintomáticas

Múltiples esfuerzos se han realizado en las últimas dos décadas para determinar el riesgo de progresión de los pacientes con GMSI IgM y MWQ y predecir en qué momento y quiénes van a requerir tratamiento. El riesgo de progresión entre ambas entidades es distinto debido al carácter benigno de la GMSI IgM. Sin embargo, en la consulta médica es frecuente observar pacientes con MWQ con una evolución lenta. Ello se debe, a su vez, en la elevada heterogeneidad clínico-patológica y genómica de las gammopatías monoclonales IgM, y, en segundo lugar, a las dificultades técnicas que supone modelar el riesgo de progresión en entidades raras, prevalentes en pacientes mayores de 60 años, y con necesidad de un seguimiento largo. Además, la presencia de factores pronósticos o biomarcadores ha ido cambiando a lo largo del tiempo. Tras la caracterización genómica de la enfermedad, también es posible incluir factores genéticos como posibles predictores de mayor riesgo de progresión. Por tanto, en este apartado se detallan las escalas de riesgo usando factores clínicos y los que incluyen biomarcadores relativamente nuevos.

7.1 Factores pronósticos clínicos

El primer estudio en describir factores pronósticos fue realizado por un grupo italiano con 452 pacientes con gammopatía monoclonal IgM asintomática, incluyendo por tanto la GMSI IgM y la MWQ. Después de una mediana de seguimiento de 4 años, los principales predictores fueron la cuantía del CM sérico, los niveles de hemoglobina, y la linfocitosis. Al tratarse de valores cuantitativos, se dividió el riesgo en 3 grupos, siendo aquellos de alto riesgo los que tenían un CM sérico superior a 30 g/L, una linfocitosis por encima de $4 \times 10^9/L$ y una hemoglobina inferior a 120 g/L. En este subgrupo, la supervivencia libre de progresión fue del 76% y 59% a 5 y 10 años, respectivamente. El punto de corte de un infiltrado linfoplasmocelular del 10% evaluado por aspirado o biopsia fue significativo en el análisis univariado, pero no mantuvo su poder estadístico posteriormente¹⁰¹. El mismo grupo también dividió la serie en 217

pacientes con GMSI IgM y 201 con MWQ. Los pacientes se diagnosticaron en base a los criterios de la Clínica Mayo y con aspirado medular. Tras una mediana de seguimiento de casi 5 años, la supervivencia libre de progresión no fue alcanzada en pacientes con GMSI IgM, mientras que fue estimada en 12 años para aquellos con MWQ. En el análisis multivariado, los predictores más potentes compartidos en ambos grupos fueron los valores del CM sérico (entre 7 a 13,9 g/L, entre 14 g/L a 20,9 g/L y mayor de 21 g/L), la hemoglobina (entre 130 y 149 g/L, entre 110 y 129 g/L, e inferior a 110 g/L) y el sexo masculino²³.

Debido a la necesidad de distinguir el riesgo de progresión entre GMSI IgM y MWQ, dos estudios analizaron por separado la transformación maligna y la necesidad de tratamiento. El primer estudio describió 52 pacientes con GMSI IgM, y que, tras una mediana de seguimiento de 5 años, identificó como predictores de progresión al infiltrado linfocítico (mayor del 20%) y al infiltrado plasmocelular (mayor al 5%), cuantificados en un aspirado medular. El riesgo de transformación maligna fue del 13% y 27% a 10 y 20 años, respectivamente¹⁹. Por otro lado, el grupo de la Clínica Mayo presentó una serie de 48 pacientes con MWQ de largo seguimiento (mediana de 15 años), en la que los principales predictores de progresión y necesidad de tratamiento fueron el grado de infiltración linfoplasmocítico en médula ósea, el tamaño del CM sérico, la hemoglobina y la inmunoparesia o descenso de los valores de IgA. El riesgo de progresión fue del 59% y 68% a 5 y 10 años, respectivamente¹². El mismo grupo, focalizando su atención únicamente en pacientes con GMSI IgM y el mayor seguimiento hasta la fecha registrado (29 años), observó que un cociente de cadenas ligeras libres en suero anormal y un CM sérico superior a 15 g/L eran los principales predictores de progresión. Sin embargo, este modelo pronóstico no incluyó el grado de infiltración medular, dado que únicamente en el 12% se había realizado un estudio de médula ósea¹⁴. El grupo sueco describió predictores similares en pacientes con GMSI IgM y no IgM, siendo el CM sérico, el cociente de cadenas ligeras alterado y la inmunoparesia aquellos con un pronóstico independiente¹⁷.

A pesar de las ventajas y desventajas de cada modelo de riesgo descrito, se puede deducir que los pacientes con GMSI IgM tienen un menor riesgo de

progresión en comparación con los pacientes con MWQ, y que el grado de infiltración medular resulta indispensable. Sin embargo, este último predictor puede variar según qué criterio diagnóstico se use para definir a pacientes con MWQ.

Con la intención de nuevamente integrar ambos diagnósticos en uno solo, el grupo del Dana Farber (Boston) propuso un modelo preciso que incluía el valor de la IgM en suero, el porcentaje de infiltrado linfoplasmocítico medular y dos nuevos biomarcadores en suero como potentes predictores de riesgo, la albúmina y la β 2-microglobulina. La serie incluyó un total de 439 pacientes con una mediana de seguimiento de casi 8 años, y validada externamente en dos grupos pequeños. El objetivo fue superar la barrera que suponía catalogar a pacientes según un criterio u otro. El sesgo que tuvo este modelo pronóstico fue el elevado número de pacientes con valores perdidos, y la no inclusión de inmunoparesia o valores de IgG o IgA . Del total de 439 pacientes, solo se incluyeron 187 en el análisis multivariado, y otros 95 provenientes de las series de validación externa. Además, no se mencionó cuántos pacientes eran realmente GMSI IgM, con lo cual pudo estar sesgado a favor de pacientes con mayor riesgo de progresión en forma de MWQ¹³.

Por lo tanto, los estudios mencionados determinan que tanto la GMSI IgM y MWQ comparten parámetros clínicos y de laboratorio similares que confieren mayor riesgo de progresión. Asimismo, las principales barreras para mejorar la precisión, sensibilidad, y la aplicación de estos modelos pronósticos en la clínica son las diferencias en los criterios diagnósticos, con la posibilidad de solapamiento de algunos pacientes.

7.2 Factores pronósticos genéticos

Debido a la identificación de las mutaciones y alteraciones cromosómicas en la GMSI IgM y la MWQ, se ha podido evaluar el valor que tienen como predictores

en el riesgo de progresión. Entre ellos se encuentran las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*, y la del6q.

A pesar que un estudio reportó una tendencia a una mediana de tiempo hasta inicio de tratamiento y progresión inferior en 128 pacientes asintomáticos que tenían *MYD88* L265P comparado con 20 *wild type*, las diferencias no fueron significativas⁸⁹. Otro estudio describió que la mutación *MYD88* L265P confería un riesgo de progresión mayor en pacientes con GMSI IgM. Tras una mediana de seguimiento de casi 7 años, la presencia de la mutación era un factor independiente de progresión. La presencia de *MYD88* L265P y de un CM sérico superior a 10 g/L era capaz de modelar el riesgo en pacientes con GMSI IgM, con una incidencia acumulada de progresión del 12% y 38% a 5 y 10 años, respectivamente¹⁸. De forma similar, un estudio también observó una tendencia a mayor riesgo de progresión en los pacientes asintomáticos con la mutación de *MYD88* L265P tras una mediana de seguimiento de 4 años. Además, la presencia de la mutación estaba asociada a un mayor grado de infiltración linfocítica en médula ósea¹⁰².

El estudio del Dana Farber también analizó la mutación *MYD88* L265P en un subgrupo de 106 pacientes con GMSI IgM y MWQ; un 84% de pacientes presentó la mutación. El 16% de pacientes *wild type* tenían un mayor riesgo de progresión, con una mediana de tiempo hasta tratamiento de casi 2 años comparado con 5 años para los pacientes mutados¹³. Resultados muy similares fueron reportados por la Clínica Mayo en una serie de 53 pacientes con MWQ. A pesar de ello, las diferencias no fueron significativas²⁴. Otra serie incluyendo pacientes con MWQ y MWS describió también que los pacientes *wild type* tenían mayor riesgo de transformación histológica a un linfoma B de alto grado¹⁰³. El mismo grupo no observó diferencias en el riesgo de progresión respecto de la presencia de las mutaciones en *CXCR4*, disponible en solo 29 pacientes con MWQ²⁴. Finalmente, la presencia de la del6q en pacientes con gammapatías IgM asintomáticas confirió un mayor riesgo de progresión a enfermedad sintomática, con una mediana de tiempo hasta la progresión de solo 30 meses en ese grupo³⁷.

Como se ha visto, en los últimos años hay una necesidad creciente por incorporar nuevos biomarcadores tanto clínicos como genéticos, abriendo un abanico de posibilidades para aumentar la precisión de modelar el pronóstico en los pacientes con GMSI IgM y MWQ (tabla 3). Las mayores dificultades son la disponibilidad de técnicas sensibles para detectar las mutaciones en *MYD88* y, principalmente, en *CXCR4*, debido a la menor carga tumoral en los pacientes asintomáticos, y la validación en series con un mayor número de pacientes.

Tabla 3. Estudios que evaluaron el riesgo de progresión de pacientes con gammopatías monoclonales IgM asintomáticas.

Estudios	Año	Incidencia de progresión	Predictores de progresión
Baldini, <i>et al</i> ²³ . GMSI IgM (N=217) MWQ (N=201)	2005	6,9% en 20 años (GMSI) 22,4% en 19 años (MWQ)	CM sérico Hemoglobina Sexo
Kyle, <i>et al</i> ¹² . MWQ (N=48)	2012	59% en 5 años 68% en 10 años	% LP en MO Hemoglobina CM sérico Inmunoparesia
Turesson, <i>et al</i> ¹⁷ . GMSI IgM (N=118)	2014	1,5% por año	CM sérico Cociente FLC Inmunoparesia
Kyle, <i>et al</i> ¹⁴ . GMSI IgM (N=210)	2018	2% por año	Ratio FLC CM sérico
Bustoros, <i>et al</i> ¹³ . GMSI IgM y MWQ (N=439)	2019	30,8% en 2 años	IgM sérica % LP en MO β 2-microglobulina Albúmina

Varettoni, <i>et al</i> ¹⁸ . GMSI IgM (N=176)	2019	1,3% por año	CM sérico <i>MYD88 L265P</i>
Zanwar, <i>et al</i> ²⁴ . MWQ (N=143)	2021	55% en 5 años	Hemoglobina β 2-microglobulina

GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto; IgM: inmunoglobulina M;
 MWQ: macroglobulinemia de Waldenström quiescente; CM: componente monoclonal; LP: linfoplasmocítico; FLC: cadenas ligeras libres o *free light chains*;
 MO: médula ósea.

Tabla original del doctorando.

HIPÓTESIS

La gammapatía de significado incierto IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente tienen ambas un riesgo de progresión a macroglobulinemia sintomática, y en menor frecuencia a otros síndromes linfoproliferativos. Las escalas de riesgo para predecir la progresión, incluyendo pacientes con ambas entidades clínico-patológicas, se fundamentan en marcadores clínicos y de laboratorio relacionados con la carga tumoral de la enfermedad. Sin embargo, la inclusión de uno u otro predictor es arbitraria debido a la disponibilidad de los mismos en los modelos multivariantes. Dado que son entidades clínico-patológicas asintomáticas y con un riesgo de progresión lento en algunos casos, existe también la necesidad de generar escalas de riesgo más simplificadas y disponibles en todo el mundo. Un predictor poco evaluado en la gammapatía de significado incierto IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente es la inmunoparesia, definida como la supresión de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas no involucradas (IgG o IgA). La inmunoparesia ha sido descrita de forma limitada en algunas series de pacientes con gammapatías monoclonales IgM, mientras que es un potente predictor de progresión en otras gammapatías monoclonales como el mieloma múltiple, asociado a una desregulación incipiente del microambiente inmune en respuesta al tumor.

Otro biomarcador novedoso, y no evaluado hasta la fecha, es la cuantificación de la carga mutacional de *MYD88* y *CXCR4*. Los estudios describen resultados dispares sobre el riesgo de progresión en los pacientes asintomáticos con la *MYD88*. Por otro lado, las mutaciones de *CXCR4* no han sido evaluadas de forma sistemática debido a la necesidad de una técnica más sensible en pacientes con baja carga tumoral. Más recientemente, se ha descrito una reacción en cadena de polimerasa de alta resolución denominada PCR digital, que consigue una alta sensibilidad para detectar y cuantificar mutaciones somáticas. Sin embargo, la sensibilidad para detectar *CXCR4* aún se desconoce.

Finalmente, se conoce que los predictores de progresión pueden estar sesgados debido al estudio de series de un único centro, especialmente en el caso de

enfermedades raras y con muy baja prevalencia. Por lo tanto, se plantean las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: La inmunoparesia es un factor capaz de predecir la progresión de forma precoz a macroglobulinemia de Waldenström sintomática en la gammapatía de significado incierto IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente.

Hipótesis 2: La elevada frecuencia alélica de las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* se asocia a un mayor riesgo de progresión a enfermedad sintomática e identifica subgrupos de riesgo en la gammapatía de significado incierto IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente.

Hipótesis 3: La inmunoparesia y la mutación de *MYD88* en pacientes con gammapatía de significado incierto IgM y macroglobulinemia de Waldenström quiescente permiten la estratificación del riesgo de progresión en una serie de validación externa.

OBJETIVOS

1. Analizar la prevalencia de inmunoparesia, su impacto con otros factores pronósticos, y su inclusión en una nueva escala de riesgo de progresión a macroglobulinemia de Waldenström sintomática de pacientes con gammapatía de significado incierto IgM y macroglobulinemia de Waldenström quiescente.
2. Evaluar la prevalencia de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4* y el impacto de la carga alélica de las mismas en el riesgo de progresión de la gammapatía de significado incierto IgM y macroglobulinemia de Waldenström quiescente a enfermedad sintomática.
3. Construir un modelo pronóstico de riesgo de progresión en pacientes con gammapatía de significado incierto IgM y macroglobulinemia de Waldenström quiescente, incluyendo la inmunoparesia y la presencia de la mutación en *MYD88*, validado en una serie clínica amplia y multicéntrica.

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

Trabajo 1

Definición de un grupo de muy bajo riesgo de progresión en la gammapatía monoclonal IgM asintomática

La macroglobulinemia de Waldenström sintomática (MWS) está precedida por dos entidades clínico-patológicas denominadas gammapatía de significado incierto (GMSI) IgM y la MW quiescente (MWQ). La GMSI IgM es prevalente en pacientes mayores, muchos de los cuales logran una larga supervivencia libre de progresión a enfermedad sintomática prolongada o fallecen debido a otras causas, mientras que los pacientes con MWQ tienen un mayor riesgo de progresión. Se han descrito múltiples factores predictores de progresión que comparten ambas entidades. Sin embargo, debido a la presencia de dos criterios diagnósticos para la MWQ (Clínica Mayo y el Consenso Internacional), añadido a la baja prevalencia de la enfermedad y el largo tiempo que se requiere en algunos casos para objetivar el evento, los modelos de riesgo de progresión no han sido reproducibles del todo.





Este estudio tiene como objetivo investigar predictores de progresión en pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas, incluyendo nuevos biomarcadores como la inmunoparesia y la presencia de la mutación *MYD88* L265P, con la intención de facilitar la creación de un modelo de riesgo accesible e independiente de los criterios diagnósticos disponibles. Según el criterio de la Clínica Mayo, 64 pacientes fueron diagnosticados de GMSI IgM y 107 de MWQ. No hubo diferencias en la mayoría de predictores excepto por un mayor infiltrado medular, mayor cociente anormal de cadenas ligeras libres en suero y mayor prevalencia de la mutación en *MYD88* en pacientes con MWQ (30% frente a 66%). La presencia de inmunoparesia estuvo asociada significativamente con mayor componente monoclonal sérico, mayor infiltrado linfoplasmocítico medular y a un cociente de cadenas ligeras anormal. Tras una mediana de seguimiento de 4,3 años, 15 pacientes progresaron y 28 fallecieron

sin haber progresado. La inmunoparesia y la presencia de un infiltrado medular superior al 20% fueron los dos predictores independientes de progresión en el análisis multivariado. Con la intención de crear un modelo pronóstico, la cohorte fue dividida en aquellos que no presentaban ninguno de estos dos factores pronósticos, y otra en la que presentaban al menos uno (inmunoparesia y/o infiltrado medular mayor del 20%). De esta manera, se identificó un subgrupo de muy bajo riesgo, con una incidencia acumulada de progresión del 3% y 6% a 10 y 20 años, respectivamente; mientras, aquellos que tenían al menos un factor de riesgo tenían una incidencia acumulada de progresión del 19% y 42% a 10 y 20 años, respectivamente.

Este estudio presenta a la inmunoparesia como un predictor potente de progresión a MWS, junto con el infiltrado medular, en las gammapatías monoclonales IgM asintomáticas, permitiendo identificar también un subgrupo de muy bajo riesgo de progresión.

Article

Defining an Ultra-Low Risk Group in Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy

David F. Moreno ^{1,2}, Arturo Pereira ^{2,3}, Natalia Tovar ^{1,2}, María Teresa Cibeira ^{1,2}, Laura Magnano ^{2,4}, María Rozman ^{2,4}, Mónica López-Guerra ^{2,4,5}, Dolors Colomer ^{2,4,5}, Beatriz Martín-Antonio ^{1,2}, Raquel Jiménez-Segura ^{1,2}, Ignacio Isola ^{1,2}, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato ^{1,2}, Aina Oliver-Caldés ^{1,2}, Mari Pau Mena ^{1,2}, Laura Rosiñol ^{1,2}, Joan Bladé ^{1,2} and Carlos Fernández de Larrea ^{1,2,*}

- ¹ Amyloidosis and Myeloma Unit, Department of Hematology, Hospital Clínic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; dfmoreno@clinic.cat (D.F.M.); ntovar@clinic.cat (N.T.); mcibeira@clinic.cat (M.T.C.); beatriz.antonio@quironsalud.es (B.M.-A.); rjimene1@clinic.cat (R.J.-S.); imisola@sjdhospitalbarcelona.org (I.I.); lgrodriguez@clinic.cat (L.G.R.-L.); oliver@clinic.cat (A.O.-C.); mmenaj@clinic.cat (M.P.M.); lrosinol@clinic.cat (L.R.); jblade@clinic.cat (J.B.)
- ² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; apereira@clinic.cat (A.P.); lsmagnan@clinic.cat (L.M.); mrozman@clinic.cat (M.R.); lopez5@clinic.cat (M.L.-G.); dcolomer@clinic.cat (D.C.)
- ³ Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- ⁴ Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red-Oncología (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: cfernan1@clinic.cat; Tel.: +34-93-227-5428



Citation: Moreno, D.F.; Pereira, A.; Tovar, N.; Cibeira, M.T.; Magnano, L.; Rozman, M.; López-Guerra, M.; Colomer, D.; Martín-Antonio, B.; Jiménez-Segura, R.; et al. Defining an Ultra-Low Risk Group in Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy. *Cancers* **2021**, *13*, 2055. <https://doi.org/10.3390/cancers13092055>

Academic Editor: Aldo M. Roccaro

Received: 9 March 2021

Accepted: 21 April 2021

Published: 23 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathies include IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (IgM MGUS) and smoldering Waldenström macroglobulinemia (SWM), all with some risk of progression to symptomatic Waldenström macroglobulinemia, amyloidosis, or other lymphoproliferative disorder. Due to their low incidence, few studies have focused on the risk of progression, with SWM being the most studied. As both are recognized clinical-pathological entities that share similar clonal and phenotypical features, we focus on defining new biomarkers of progression in this population with long follow-up.

Abstract: We analyzed 171 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathies (64 with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance—MGUS and 107 with smoldering Waldenström macroglobulinemia - SWM) who had a bone marrow (BM) evaluation performed at diagnosis. Abnormal free-light chain ratio (53% vs. 31%) and *MYD88* mutation prevalence (66% vs. 30%) were higher in patients with SWM. No other differences were found among groups. With a median follow-up of 4.3 years, 14 patients progressed to Waldenström macroglobulinemia, 1 to amyloidosis, and 28 died without progression. The *MYD88* mutation was found in 53% of patients (available in 160 patients). Multivariate analysis showed that immunoparesis (subhazard ratio—SHR 10.2, 95% confidence interval—CI: 4.2–24.8; $p < 0.001$) and BM lymphoplasmacytic infiltration $\geq 20\%$ (SHR: 6, 95% CI: 1.6–22.1; $p = 0.007$) were associated with higher risk of progression. We developed a risk model based on these two risk factors. In the absence of both variables, an ultra-low risk group was identified (SHR 0.1, 95% CI 0.02–0.5; $p = 0.004$), with 3% and 6% of cumulative incidence of progression at 10 and 20 years, respectively. Bootstrap analysis confirmed the reproducibility of these results. This study finds immunoparesis and BM infiltration as biomarkers of progression as well as a low-risk group of progression in asymptomatic IgM monoclonal gammopathies.

Keywords: IgM MGUS; smoldering Waldenström macroglobulinemia; immunoparesis; bone marrow

1. Introduction

Waldenström macroglobulinemia (WM) is a lymphoproliferative disorder characterized by the presence of an IgM monoclonal protein (M-protein) and bone marrow (BM)

lymphoplasmacytic infiltration [1,2]. It is preceded by two asymptomatic clinicopathological entities such as IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering WM (SWM) [2–4].

IgM MGUS predominates in the elderly, so most patients may live their remaining lifespan without any sign of progression to WM or other malignant disorder [5,6]. On the other hand, SWM has a clear increased risk of progression but varies between studies [3,4,7]. Regarding the risk of progression, it has been described that the M-protein size, free light chain (FLC) ratio, serum albumin level, and reduction of one or two uninvolved immunoglobulin isotype levels (immunoparesis) as predictors of progression from IgM MGUS [5,8,9]. Moreover, SWM shares some of the risk factors above mentioned, with the addition of BM tumor load and β 2-microglobulin [4]. However, there are two definitions of SWM according to BM disease. The Mayo Clinic criteria established a cut-off of 10% while the Second International Consensus on Waldenström macroglobulinemia defined SWM as any BM lymphoplasmacytic infiltration in the absence of symptoms [1–3]. So far, risk models have been developed under these definitions applied to each clinical entity among centers. Only one study proposed the inclusion of IgM MGUS and SWM in a unique and feasible risk model as both entities share some prognostic determinants but it has not been replicated [7].

As a result of this, the reproducibility of all these prognostic factors across studies is low, at least in part because of the low incidence of the disease and their protracted natural history. The aim of this study was to investigate predictors of progression in patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathies observed over a long period, incorporating immunoparesis, BM infiltration, and the presence of *MYD88* L265P mutation with an intention to find an accessible and reproducible risk model overtaking the definition gap and highlighting a population of patients that may be categorized as IgM MGUS or SWM.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Characteristics

Medical records of 206 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathies diagnosed in our institution from 1982 to 2018 were reviewed. Bone marrow aspirate was available in 171 patients, which was our final study population. The Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona provided institutional review board approval for this study.

IgM MGUS and SWM diagnoses were included in the present study and defined by the Mayo Clinic criteria [1,3]. At the time of diagnosis, there was no evidence of target organ involvement according to international consensus, such as constitutional symptoms, anemia, hyperviscosity, enlarged lymph nodes, or peripheral neuropathy [10,11].

Variables were grouped into categorical (sex, immunoparesis, abnormal FLC ratio, *MYD88* L265P mutation, M-protein size, IgM serum concentration, serum albumin, and β 2-microglobulin levels), continuous (age, calcium, creatinine, hemoglobin), and time-to-event (progression, death). Immunoparesis was defined as a decreased concentration in both uninvolved serum immunoglobulin isotypes below the normal range (IgG < 6.8 g/L, IgA < 0.66 g/L). Standard nephelometry was used to measure immunoglobulins. A normal serum FLC ratio (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK) was defined as 0.26 to 1.65 according to multiple myeloma guidelines.

2.2. Bone Marrow Evaluation

Morphology was reviewed after May-Grunwald-Giemsa staining as stated by standard procedures. A senior cytologist analyzed systematically 200 bone marrow total nucleated cells in two slides from random areas, and the percentages of lymphoplasmacytic and plasma cell infiltration were estimated. Flow cytometry results were not included in this study because of the heterogenous availability of these results over the last 30 years.

2.3. MYD88 L265P Mutation Analysis

DNA samples were obtained from bone marrow mononuclear cells and kept at -80°C . A commercial kit was performed for DNA isolation (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Germantown, MD, USA). BM samples for molecular biology were available in 160 patients. A conventional allele-specific polymerase chain reaction (PCR) was used to evaluate MYD88 L265P mutations as previously described [12].

2.4. Statistical Analysis

The primary study endpoint was progression to symptomatic WM. A secondary endpoint was survival from the diagnosis of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy.

Variables investigated for association with time to progression were selected based on their prognostic relevance in previous studies and clinical meaningfulness. They included patient sex, immunoparesis, IgM concentration (≥ 45 g/L vs. < 45 g/L), abnormal FLC ratio, Bence-Jones proteinuria, $\beta 2$ -microglobulin ≥ 4.5 mg/dL, serum albumin (≤ 35 g/L vs. > 35 g/L), lymphoplasmacytic infiltration $\geq 20\%$ in the bone marrow aspirate, and MYD88 mutation. In previous studies the size of the M-protein had been investigated at several cut-off values, hence, in the present analysis, we dichotomized this variable at the median value in our series (≥ 12 g/L vs. < 12 g/L).

Survival was estimated by the Kaplan–Meier method and factors predicting mortality were investigated by Cox multivariate regression without previous selection by univariable analysis. All the variables met the proportional hazards assumption as tested by the Grambsch-Therneau test [13]. Cumulative incidence was used to estimate the risk of progression to symptomatic WM in the context of death without progression as a competing risk. Multivariate analysis of factors predicting progression was performed by the method of Fine and Gray [14]. In this regression method, the subdistribution hazard ratios (SHR) are equivalent to the HRs in the Cox model. All multivariate models were analyzed by parsimonious stepwise backward elimination and reconsideration of variables, based on association with the endpoint and clinical meaning. Internal validity of models predicting disease progression was evaluated by bootstrapping [15]. In brief, 1000 samples the size of the whole series were taken randomly with reposition so that, in each sample, individual patients may be represented once, more than once, or not represented at all. Prognostic models were then estimated in the 1000 samples and the proportion of samples yielding a significant association with progression was recorded. All the analysis was performed with SPSS version 25 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) and Stata version 11 (StataCorp, College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Baseline Characteristics

The median age of the 171 patients at the diagnosis of IgM MGUS or SWM was 69 years (range: 28–98), and 90 (53%) were males. There were 10 patients younger than 50 years (6%) and only one younger than 30. Table 1 summarizes the main laboratory results at the time of diagnosis. The M-protein size spread over a wide range, from unmeasurable (only detectable by immunofixation but not by conventional serum electrophoresis) to 28.2 g/L. The M-protein size was > 12 g/L in 53% of patients, and > 15 g/L in 23%. 29% of the patients were diagnosed before 2008, and 71% from 2008 to 2018.

According to the Mayo Clinic diagnostic criteria, we found 64 (37%) patients with IgM MGUS and 107 (63%) patients with SWM. Baseline characteristics were similar between potential risk factors, only showing differences in the BM infiltration rate (5% vs. 23%; $p < 0.001$), abnormal serum FLC ratio (31% vs. 53%; $p = 0.04$), and the MYD88 mutation detection (30% vs. 66%; $p < 0.001$) as shown in Table 2.

Table 1. Laboratory values in 171 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy.

	Median (IQR ^a)	Frequencies
Serum M-protein (g/L)	12.2 (9.1–14.7)	≥12 in 53.2% ≥15 in 23.4%
Serum IgM (g/L)	5.4 (3.5–11)	<30 in 97%
Calcium (mg/dL)	9.5 (9.2–9.8)	>10.5 in 3.2%
Creatinine (mg/dL)	0.9 (0.8–1)	>2 in 0.6%
Hemoglobin (g/dL)	13.4 (12.2–14.6)	<12 in 15.8%
Platelets (×10 ⁹ /L)	237 (194–291)	<100 in 1.2%
β2-microglobulin (mg/dL)	2.3 (1.9–3.1)	≥4 in 7%
Albumin (g/L)	43 (40–45)	≤35 in 4.1%
Lymphoplasmacytic infiltration	16 (11–24)	
Immunoparesis ^b (%)		14/167 (8.4)
Abnormal serum FLC ratio ^c (%)		42/92 (45.7)
MYD88 L265P mutation ^d (%)		84/160 (52.5)
Progressive disease (%)		14/171 (8.2)

^a IQR: interquartile range; ^b immunoparesis defined as a reduction in both uninvolved serum heavy chain immunoglobulin (IgG and IgA); ^c FLC: free light chain; ^d MYD88 mutation: available in 160 patients.

Table 2. Laboratory values in patients categorized by diagnosis (IgM MGUS or SWM).

	IgM MGUS ^a (%) <i>n</i> = 64	SWM ^b (%) <i>n</i> = 107	<i>p</i> -Value
Serum M-protein (g/L)	12.1	11.7	0.6
≥12 g/L	51 (48)	37 (58)	0.1
Hemoglobin (g/dL)	13.3	13.4	0.8
Platelets (×10 ⁹ /L)	255	245	0.4
β2-microglobulin (mg/dL)	2.9	2.4	0.1
≥4 mg/dL	6/60 (10)	5/96 (5)	0.25
Albumin (g/L)	42.3	42.5	0.7
≤35 g/L	3 (5)	4 (4)	0.7
Immunoparesis	4/63 (6)	10/104 (10)	0.4
Abnormal serum FLC ratio	10/32 (31)	32/60 (53)	0.04
MYD88 L265P mutation	18/60 (30)	66/100 (66)	<0.001

^a IgM MGUS: IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance; ^b SWM: smoldering Waldenström macroglobulinemia.

3.2. Outcomes and Risk Factors

After a median follow-up of 4.3 years (IQR: 2.3–7.7), 14 patients had progressed to symptomatic WM, 1 to amyloidosis, and 28 had died without progression. The initiation of treatment of each patient who progressed was mainly due to anemia (nine patients), followed by symptomatic lymphadenopathy (three patients) and peripheral neuropathy with progressive increase of the M-protein size (two patients). None of the patients progressed to IgM-related disorder without any other sign of progression to WM. Progressive disease was documented at least after one year of close follow-up and confirmed with pathology and imaging studies. Regarding each diagnosis, progressive disease was present in 5% of patients with IgM MGUS and 10% of patients with SWM.

Eleven patients were lost to follow-up after a median of 2.6 years (IQR: 2.0–4.0) and were censored at the time of the last contact. The projected median overall survival (OS)

was 17.2 years (95% CI: 10.8–28.4), and 38% of patients are expected to survive more than 20 years (Supplementary Figure S1). In the competing risks analysis, the cumulative incidence of progression at 5, 10, and 15 years was 5.2%, 6.5%, and 8.7%, respectively, whereas the equivalent values for death without progression were 10.5%, 27.5%, and 36.0%, respectively (Figure 1). Considering diagnosis, the cumulative incidence of progression at 5 and 10 years from diagnosis were 4% in IgM MGUS compared to 8% and 12% in SWM patients, respectively.

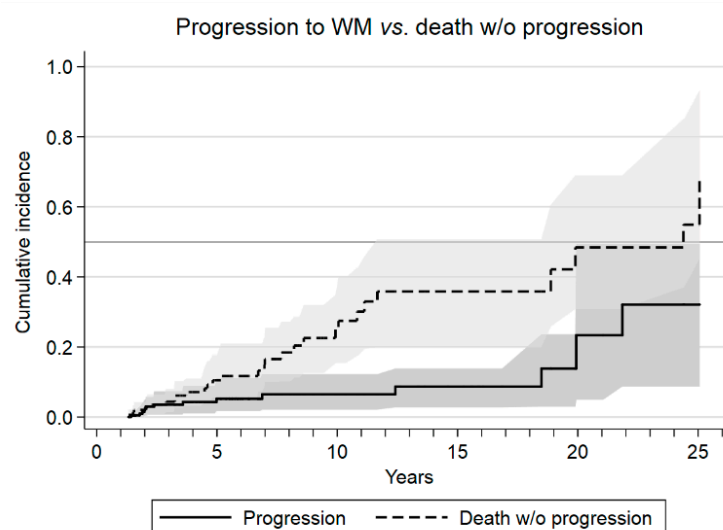


Figure 1. Relative risk of progression to Waldenström macroglobulinemia (WM) or death without (*w/o*) progression evaluated as cumulative incidence in the framework of competing events.

Parsimonious multivariate analysis of factors associated with progression to WM in the context of death as a competing risk identified immunoparesis (SHR: 10.2, 95% CI: 4.2–24.8; $p < 0.001$) and lymphoplasmacytic infiltration $\geq 20\%$ in the BM (SHR: 6, 95% CI: 1.6–22.1; $p = 0.007$) as the only statistically significant predictors of progression (Figure 2a,b). Out of the 171 patients, 167 were introduced in the risk model. One hundred patients did not have any risk factor, 67 at least one, and 8 patients had both at diagnosis. Our risk model concluded that the absence of both immunoparesis and BM lymphoplasmacytosis at diagnosis predicted a very low risk of progression to symptomatic WM as compared with the presence of at least one risk factor (SHR: 0.1, 95% CI 0.02–0.5; $p = 0.004$; Table 3). Cumulative incidence of progression for patients who had none of these risk factors was 3% and 6% at 10 and 20 years, respectively, as compared with 19% and 42% for those with at least one risk factor (Figure 3). The absence of both factors was confirmed as a statistically significant predictor of low risk of progression in 100% of 1000 bootstrap samples giving optimal internal validity not dependent on the specific composition of our series.

BM lymphoplasmacytic infiltration $\geq 20\%$ was associated with shorter survival (11.7 vs. 19.9 years; $p = 0.04$), whereas immunoparesis showed no significant statistical association with this outcome (13.0 vs. 18.9 years; $p = 0.36$). With an *MYD88* mutation prevalence of 52.5% in the whole series, we found a trend for this mutation to be associated with worse OS (21.8 years vs. not reached; $p = 0.06$) and a lower prevalence in patients with less than 20% of lymphoplasmacytic infiltration (38% vs. 77%; $p < 0.001$).

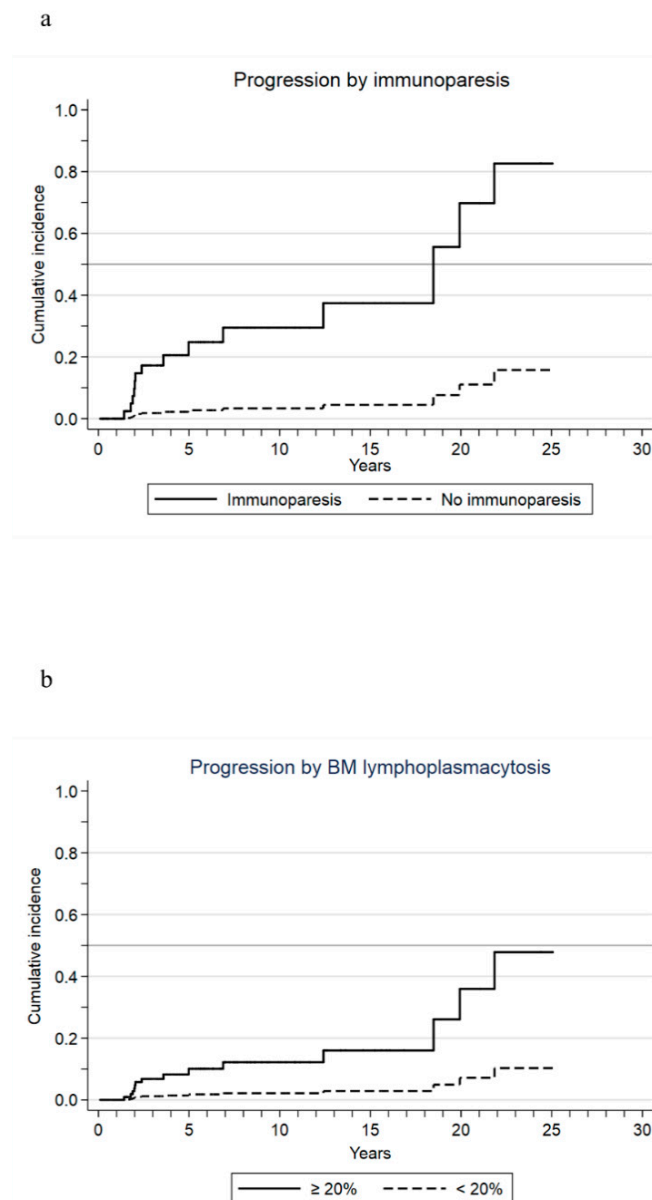


Figure 2. Cumulative incidence of progression in the framework of death as a competing event, according to immunoparesis (a) and bone marrow (BM) lymphoplasmacytic infiltration (b) at diagnosis of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy.

Table 3. Risk stratification model of progression to WM in patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy as determined in the framework of death as a competing event.

Adverse Variables	Subhazard Ratio (95% CI ^a)	<i>p</i> -Value
Immunoparesis	10.2 (4.2–24.8)	<0.001
Lymphoplasmacytic infiltrate $\geq 20\%$ in the bone marrow aspirate	6.0 (1.6–22.1)	0.007
Risk Model	Subhazard Ratio (95% CI)	<i>p</i> -Value
Good prognosis group (no risk factors)	0.1 (0.02–0.5)	0.004

^a CI: Confidence interval.

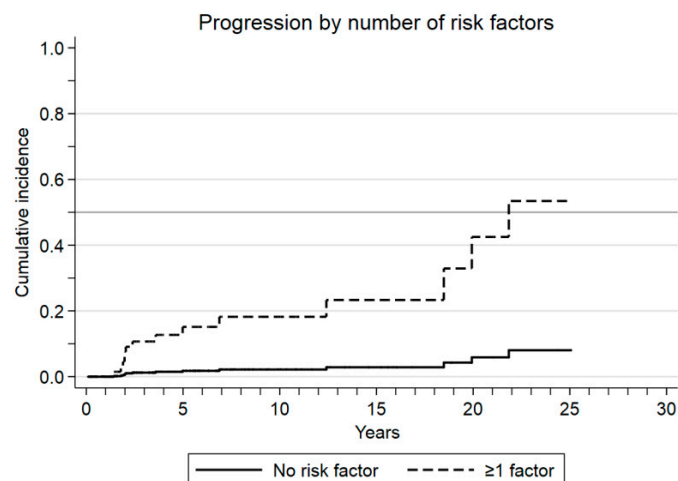


Figure 3. Cumulative incidence of progression in the framework of death as a competing event according to the number of risk factors at the diagnosis of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy (immunoparesis and bone marrow lymphoplasmacytosis $\geq 20\%$).

Due to the relevant prognostic significance of immunoparesis in our series, we investigated the association between this biomarker and risk factors for disease progression previously described in IgM MGUS and SWM. As summarized in Supplementary Table S1, immunoparesis was significantly associated with a larger M-protein size, higher lymphoplasmacytic infiltration in the BM, and abnormal FLC ratio. We also found a trend towards lower serum albumin levels in patients with immunoparesis.

4. Discussion

In the present study, immunoparesis was identified as a strong predictor of progression from asymptomatic IgM monoclonal gammopathy to symptomatic WM. Indeed, absence of immunoparesis together with a BM lymphoplasmacytic infiltration $< 20\%$ defined a particularly good prognosis population with only a 3% cumulative incidence of progression at 10 years and 6% at 20 years, with a 90% reduction in the progression risk compared to patients with at least one of them. To the best of our knowledge, this is the first report on the prognostic significance of immunoparesis in this group of patients with long follow-ups. Furthermore, our risk model may overtake the diagnostic bias, fitting patients with IgM MGUS or SWM whether using the Mayo Clinic or the Second International Consensus diagnostic criteria.

Our study population was uniform regarding initial clinical characteristics as shown in Table 2. Diagnosis was made on the findings of BM aspirate by expert hematopathologists and progressive disease was confirmed by BM biopsy and imaging studies. The BM aspirate is a feasible and reliable tool to diagnose IgM monoclonal gammopathies. In this sense, there are studies from other centers where their diagnostic criteria or their risk models relied on the basis of bone marrow aspirates [3,7,16,17]. While most of our patients were diagnosed in the last two decades of the study; progressive disease was observed at similar rates across the decades.

The initiation of treatment of each patient who progressed was similar to that described by the International Consensus [18,19]. All patients progressed after a close follow-up of at least one year, so no patient could have been considered as early slow-growing symptomatic WM. We highlight that the cumulative incidence of progression in our series is lower, being more comparable to a study reported by Alexanian et al. [20] and closer to a low or intermediate group in the external validation series by Bustoros et al. [4]. In the case of IgM MGUS, our series kept a 4% cumulative incidence of progression at 5 and 10 years, comparable to other series [9].

Regarding risk factors, several have been proposed for IgM MGUS and shared by patients with SWM, such as M-protein size, FLC ratio, serum albumin level, and BM infiltration, among others [3–5,7,8]. All of them parallel the tumoral load and the immune deregulation. As a result, newly prognostic factors with an indirect measure of disease are emerging. Although not all patients with IgM MGUS or SWM harbor the *MYD88* mutation, it is a promising marker already used in risk models of progression [21]. The CXCL13 levels also seemed to be a reliable biomarker that resembles BM tumoral load [22]. Another promising biomarker is immunoparesis, which has previously been reported as a predictor for disease progression in patients with IgM MGUS but not replicated by others [5,8,21]. In the case of SWM, it was also reported as a potential risk factor of progression to symptomatic WM [3,23]; however, it was not included in the study by Bustoros et al. [4].

It is worth noting that, in our study, patients with immunoparesis had significantly larger M-protein size, more frequent abnormal FLC ratios, and a trend to lower serum albumin levels. It can be hypothesized, therefore, that all these prognostic biomarkers emerge from the same pathological process resulting in immunoparesis, and that identification of one or another marker as a statistically significant predictor might be contingent on the composition of each patient series. In this regard, a first step to validate the prediction model in our series was done by bootstrapping internal validation. It confirmed that the good prognosis group from our study (no immunoparesis and less than 20% of BM infiltration) is able to perform well in our center. As the next step implies the use of external series, we consider that our parsimonious prediction model could be easily implemented by other groups in order to confirm and validate these results according to clinical and laboratory practices in other centers.

Other factors may have contributed to explaining the discordance between our results and those previously published on the prognosis of IgM MGUS and SWM. In our series, nearly half the patients lacked information on the FLC ratio at diagnosis because they were first seen before the test was available. This may have reduced the statistical power to detect any influence of this biomarker on the progression rate. Regarding M-protein size, it is the most reproducible predictor of disease progression in patients with IgM MGUS and SWM, and several cut-off values have been put forward as prognostic factors [4,5,7,21,24]. Since the risk of progression parallels the increasing of the M-protein size, choosing one or another cut-off certainly implies some arbitrariness. In our case, we choose the series' median value (12 g/L), which is a relatively low cut-off because of our initial goal of better defining patients with a low risk of progression.

Regarding BM infiltration, there is data that supports its value as a prognostic marker of progression in patients with SWM [3,4]. However, it is overlooked in the case of IgM MGUS as it is usually diagnosed based only on serological criteria and the absence of symptoms. The Mayo Clinic series reported that only 12% of patients with MGUS underwent BM evaluation [5]. The Swedish group also reported that 20% of their study group had a BM assessment [9]. According to all diagnostic criteria used to classify patients either with IgM MGUS or SWM, the value of the BM infiltration as a risk factor may vary. To surpass this problem and with an intention to identify common biomarkers, we included all patients that underwent a BM evaluation so we could investigate whether BM infiltration could complement immunoparesis as predictors for disease progression. We established a 20% cut-off value on the basis of previous studies with SWM [3] and smoldering multiple myeloma [25,26].

The combination of both variables, immunoparesis and lymphoplasmacytic infiltration $\geq 20\%$, allowed us to identify a group of patients who lacked both biomarkers and had a particularly good prognosis, with cumulative incidences of progression of 3% and 6% at 10 and 20 years from diagnosis of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy, showing a very slow and indolent behavior.

Previous studies have associated a higher incidence of the mutated *MYD88* gene and increased allele burden with a transition from IgM MGUS to SWM and symptomatic WM,

and increased lymphoplasmacytic infiltration in the BM [21,27–29]. We found the *MYD88* mutation in half the patients who were tested (30% in IgM MGUS and 66% in SWM). This prevalence varies among different studies, techniques, and the diagnostic criteria used. Using allele-specific PCR, our results are less than expected by other reports, especially in patients with SWM. It may be explained by the fact that our global series had less bone marrow infiltration compared to the series by Bustoros et al. (84% *MYD88* mutation detection) [4] as well as technical issues using DNA extracted from fixed tissues.

Regarding prognosis, we did not find that patients bearing the mutated gene progressed to WM differently from those bearing the wild gene. Interestingly, the *MYD88* mutation was less prevalent in patients with BM lymphoplasmacytic infiltration <20% and had no association with immunoparesis.

Our study has several strengths and weaknesses. Among the latter, the retrospective design and the long timespan led to incomplete data in some cases, mainly a lack of current biomarkers in patients who were first seen long ago. This also led to less *MYD88* mutation prevalence in patients with SWM; technical issues related to samples may have arisen. It is worth noting that the loss to follow-up rate was kept low despite the old age of patients and the long follow-up. Moreover, while the number of patients from our series is 171, it is not the exception from the reported by other groups. The Mayo Clinic described 210 patients, which is the study with the greatest number of patients with IgM MGUS [5]. It is followed by 118 patients from the Swedish group [9]. Regarding SWM, we included 104 patients in our risk model, which is comparable to the DFCI external validation series [4].

One of the strengths of the present study relies on the use of a competing risks framework to estimate the rates of progression. Many more patients died from causes unrelated to the IgM monoclonal gammopathy than progressed to WM, so the standard Kaplan-Meier analysis would have overestimated the progression rate [30]. Another strength is the high internal validity for this extremely low-risk group. This definition can have clinical significance, as this group has only 6% of cumulative incidence of progression at 20 years.

5. Conclusions

In summary, we identified immunoparesis as an important predictor of progression in asymptomatic IgM monoclonal gammopathy and defined a population of particularly good prognosis based on the absence of this biomarker and a small (<20%) lymphoplasmacytic infiltrate as evaluated by BM aspirate. These findings can help in reassuring good prognosis for these patients and to schedule accordingly the follow-up medical visits.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13092055/s1>, Figure S1: Kaplan-Meier projected survival of 171 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy. Table S1: Association between immunoparesis and previously recognized risk factors for disease progression in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance.

Author Contributions: Conceptualization, D.F.M., A.P., and C.F.d.L.; methodology, D.F.M., A.P., and C.F.d.L.; software, D.F.M. and A.P.; validation M.P.M., B.M.-A., M.R., L.M., D.C., M.L.-G., M.T.C., L.R., and J.B.; formal analysis, D.F.M. and A.P.; resources, C.F.d.L.; data curation, N.T., A.O.-C., L.G.R.-L., R.J.-S. and I.I.; writing—original draft preparation, D.F.M. and A.P.; writing—review and editing, L.R., C.F.d.L., and J.B.; supervision, L.R., D.C., and J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been supported in part by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Health (FIS PI19/00669), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and 2017SGR00792 (AGAUR; Generalitat de Catalunya).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Hospital Clínic de Barcelona (protocol code HCB/2020/0210, date of approval 31 March 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article (and supplementary material).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rajkumar, S.V.; Dimopoulos, M.A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Paiva, B.; San Miguel, J.F.; et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, e538–e548. [[CrossRef](#)]
2. Owen, R.G.; Treon, S.P.; Al-Katib, A.; Fonseca, R.; Greipp, P.R.; McMaster, M.L.; Morra, E.; Pangalis, G.A.; San Miguel, J.F.; Branagan, A.R.; et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom’s macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom’s Macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **2003**, *30*, 110–115. [[CrossRef](#)]
3. Kyle, R.A.; Benson, J.T.; Larson, D.R.; Therneau, T.M.; Dispenzieri, A.; Kumar, S.; Melton, L.J.; Rajkumar, S.V. Progression in smoldering Waldenstrom macroglobulinemia: Long-term results. *Blood* **2012**, *119*, 4462–4466. [[CrossRef](#)]
4. Bustoros, M.; Sklaventis-Pistofidis, R.; Kapoor, P.; Liu, C.J.; Kastritis, E.; Zanwar, S.; Fell, G.; Abeykoon, J.P.; Hornburg, K.; Ghobrial, I.M.; et al. Progression Risk Stratification of Asymptomatic Waldenström Macroglobulinemia. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 1403–1411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kyle, R.A.; Larson, D.R.; Therneau, T.M.; Dispenzieri, A.; Kumar, S.; Cerhan, J.R.; Rajkumar, S.V. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 241–249. [[CrossRef](#)]
6. Go, R.S.; Rajkumar, S.V. How I manage monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* **2018**, *131*, 163–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Baldini, L.; Goldaniga, M.; Guffanti, A.; Brogna, C.; Cortelazzo, S.; Rossi, A.; Morra, E.; Colombi, M.; Callea, V.; Gobbi, P.; et al. Immunoglobulin M Monoclonal Gammopathies of Undetermined Significance and Indolent Waldenström’s Macroglobulinemia Recognize the Same Determinants of Evolution Into Symptomatic Lymphoid Disorders: Proposal for a Common Prognostic Scoring System. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 4662–4668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kyle, R.A.; Therneau, T.M.; Rajkumar, S.V.; Remstein, E.D.; Offord, J.R.; Larson, D.R.; Melton, L.J. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* **2003**, *102*, 3759–3764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Turesson, I.; Kovalchik, S.A.; Pfeiffer, R.M.; Kristinsson, S.Y.; Goldin, L.R.; Drayson, M.T.; Landgren, O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood* **2014**, *123*, 338–345. [[CrossRef](#)]
10. Leblond, V.; Kastritis, E.; Advani, R.; Ansell, S.M.; Buske, C.; Castillo, J.J.; Dimopoulos, M.A. Treatment recommendations from the Eighth International Workshop on Waldenstroms Macroglobulinemia. *Blood* **2016**, *128*, 1321–1328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Gertz, M.A. Waldenström macroglobulinemia: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **2019**, *94*, 266–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Xu, L.; Hunter, Z.R.; Yang, G.; Zhou, Y.; Cao, Y.; Liu, X.; Treon, S.P. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* **2013**, *121*, 2051–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Grambsch, P.M.; Therneau, T.M. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* **1994**, *81*, 515–526. [[CrossRef](#)]
14. Fine, J.P.; Gray, R.J. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **1999**, *94*, 496–509. [[CrossRef](#)]
15. Mallett, S.; Royston, P.; Waters, R.; Dutton, S.; Altman, D.G. Reporting performance of prognostic models in cancer: A review. *BMC Med.* **2010**, *8*, 21. [[CrossRef](#)]
16. Paiva, B.; Montes, M.C.; Garcia-Sanz, R.; Ocio, E.M.; Alonso, J.; de Las Heras, N.; San Miguel, J.F. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström’s clone in IgM-MGUS and Waldenström’s Macroglobulinemia: New criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia* **2014**, *28*, 166–173. [[CrossRef](#)]
17. PPaiva, B.; Corchete, L.A.; Vidriales, M.B.; García-Sanz, R.; Perez, J.J.; Aires-Mejia, I.; San Miguel, J.F. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **2015**, *125*, 2370–2380. [[CrossRef](#)]
18. Dimopoulos, M.A.; Kastritis, E.; Owen, R.G.; Kyle, R.A.; Landgren, O.; Morra, E.; Treon, S.P. Treatment recommendations for patients with Waldenstrom macroglobulinemia (WM) and related disorders: IWWM-7 consensus. *Blood* **2014**, *124*, 1404–1411. [[CrossRef](#)]
19. Dimopoulos, M.A.; Kastritis, E. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **2019**, *134*, 2022–2035. [[CrossRef](#)]
20. Alexanian, R.; Weber, D.; Delasalle, K.; Cabanillas, F.; Dimopoulos, M. Asymptomatic Waldenstrom’s macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **2003**, *30*, 206–210. [[CrossRef](#)]

21. Varettoni, M.; Zibellini, S.; Boveri, E.; Klersy, C.; Candido, C.; Rattotti, S.; Ferretti, V.V.; Defrancesco, I.; Nizzoli, M.E.; Arcaini, L.; et al. A risk-stratification model based on the initial concentration of the serum monoclonal protein and *MYD 88* mutation status identifies a subset of patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance at high risk of progression to Waldenström macroglobulinaemia or other lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* **2019**, *187*, 441–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vos, J.M.; Tsakmaklis, N.; Patterson, C.J.; Meid, K.; Castillo, J.J.; Brodsky, P.; Ganz, T.; Pals, S.T.; Kersten, M.J.; Hunter, Z.R.; et al. CXCL13 levels are elevated in patients with Waldenström macroglobulinemia, and are predictive of major response to ibrutinib. *Haematologica* **2017**, *102*, e452–e455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hunter, Z.R.; Manning, R.J.; Hanzis, C.; Ciccarelli, B.T.; Ioakimidis, L.; Patterson, C.J.; Lewicki, M.C.; Tseng, H.; Gong, P.; Treon, S.P.; et al. IgA and IgG hypogammaglobulinemia in Waldenström’s macroglobulinemia. *Haematologica* **2010**, *95*, 470–475. [[CrossRef](#)]
24. Morra, E.; Cesana, C.; Klersy, C.; Varettoni, M.; Cavanna, L.; Canesi, B.; Tresoldi, E.; Barbarano, L.; Lazzarino, M. Predictive variables for malignant transformation in 452 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy. *Semin. Oncol.* **2003**, *30*, 172–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lakshman, A.; Rajkumar, S.V.; Buadi, F.K.; Binder, M.; Gertz, M.A.; Lacy, M.Q.; Dispenzieri, A.; Dingli, D.; Fonder, A.L.; Kumar, S.K.; et al. Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria. *Blood Cancer J.* **2018**, *8*, 59. [[CrossRef](#)]
26. De Larrea, C.F.; Isola, I.; Pereira, A.; Cibeira, M.T.; Magnano, L.; Tovar, N.; Rodríguez-Lobato, L.-G.; Calvo, X.; Aróstegui, J.I.; Rosiñol, L.; et al. Evolving M-protein pattern in patients with smoldering multiple myeloma: Impact on early progression. *Leukemia* **2018**, *32*, 1427–1434. [[CrossRef](#)]
27. Correa, J.G.; Cibeira, M.T.; Tovar, N.; Isola, I.; Pedrosa, F.; Díaz, T.; Lozano, E.; Magnano, L.; Rosiñol, L.; de Larrea, C.F.; et al. Prevalence and prognosis implication of *MYD88* L265P mutation in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol.* **2017**, *179*, 849–851. [[CrossRef](#)]
28. Varettoni, M.; Zibellini, S.; Defrancesco, I.; Ferretti, V.V.; Rizzo, E.; Malcovati, L.; Galli, A.; Della Porta, M.G.; Boveri, E.; Cazzola, M.; et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* **2017**, *102*, 2077–2085. [[CrossRef](#)]
29. Treon, S.P.; Cao, Y.; Xu, L.; Yang, G.; Liu, X.; Hunter, Z.R. Somatic mutations in *MYD88* and *CXCR4* are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **2014**, *123*, 2791–2796. [[CrossRef](#)]
30. Schuster, N.A.; Hoogendijk, E.O.; Kok, A.A.; Twisk, J.W.; Heymans, M.W. Ignoring competing events in the analysis of survival data may lead to biased results: A nonmathematical illustration of competing risk analysis. *J. Clin. Epidemiol.* **2020**, *122*, 42–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Table S1. Association between immunoparesis and previously recognized risk factors for disease progression in asymptomatic IgM monoclonal gammopathy.

	Immunoparesis (% or CI ^a)	No immunoparesis (% or CI)	P-value
Male sex	5 (36%)	84 (55%)	0.2
Hemoglobin (g/dL)	13.0 (11.6–14.0)	13.4 (12.5–14.8)	0.2
Albumin (g/L)	40 (39–44)	43 (41–45)	0.06
Serum IgM (g/L)	18.0 (8.4–30.5)	4.9 (3.4–10.0)	<0.001
Serum M-Protein (g/L)	14.9 (11.1–24.0)	12.7 (9.0–14.6)	0.01
Abnormal FLC ratio ^b	4 (100%)	37 (43%)	0.025
Lymphoplasmacytic infiltration (%)	29 (10–54)	16 (11–23)	0.008
<i>MYD88</i> mutation ^c	7 (53%)	75 (54%)	0.9

^a CI: Confidence interval; ^b FLC: free light chain ratio (available in 92 patients); ^c Available in 160 patients.

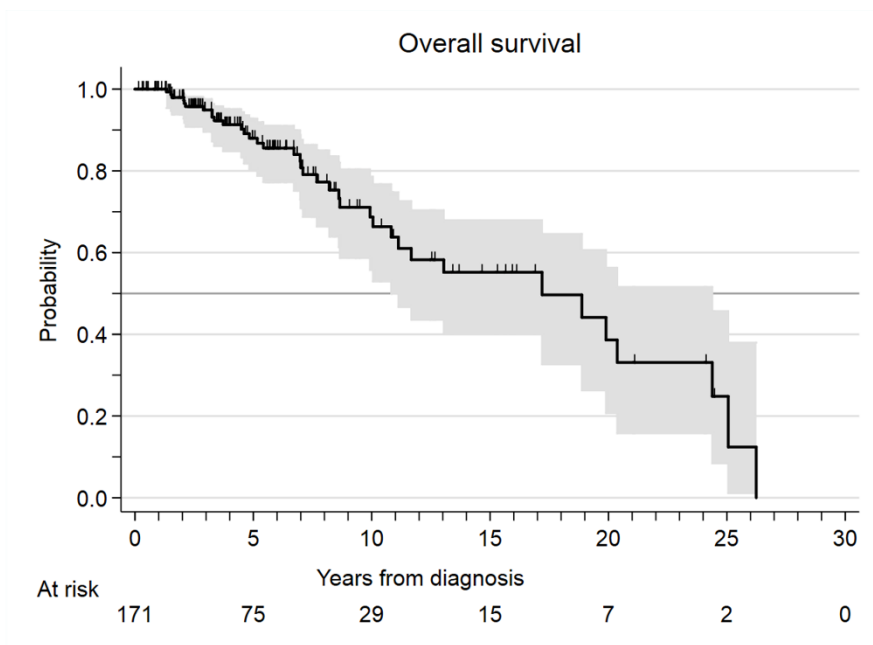


Figure S1. Overall survival of 171 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy.

Trabajo 2

Impacto pronóstico de las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* evaluadas por reacción en cadena de polimerasa digital en la gammapatía de significado incierto IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente

La gammapatía de significado incierto (GMSI) IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente (MWQ) comparten alteraciones somáticas similares, como lo demuestra la presencia de mutaciones de *MYD88* y *CXCR4*, así como también la delección del brazo largo del cromosoma 6, entre otras alteraciones inmunofenotípicas también presentes en estadios más avanzados. Por lo tanto, se ha postulado un modelo evolutivo de progresión basado en la adquisición de mutaciones somáticas en las gammapatías monoclonales IgM. Las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* han sido convencionalmente analizadas mediante reacción en cadena de polimerasa alelo específica (AS-PCR) o secuenciación de nueva generación. A pesar de que la prevalencia de las mutaciones en la MW sintomática (MWS) ha sido descrita de forma más estandarizada, los estudios en las entidades pre-sintomáticas han sido más variables. Recientemente se describió la PCR digital (ddPCR, por sus siglas en inglés), con una mayor sensibilidad para detectar la mutación *MYD88* L265P en distintos tejidos e incluso en ADN libre circulante en sangre (cfDNA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, no existen estudios de las mutaciones más patogénicas de *CXCR4* usando la misma técnica, y menos aún, en los estadios pre-sintomáticos.







Este estudio propone que las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* evaluadas por ddPCR pueden modelar el riesgo de progresión de forma más precisa en la GMSI IgM y la MWQ. En comparación con la AS-PCR, la ddPCR identificó un 64% y 82% de prevalencia de la mutación *MYD88* L265P en pacientes con GMSI IgM y MWQ, respectivamente. En el 50% de pacientes con GMSI IgM se detectó la mutación *MYD88* L265P sin tener una alteración clonal detectable en linfocitos B usando citometría de flujo multiparamétrica, mientras que el 100% de pacientes con MWQ presentaban la mutación y alteraciones clonales por inmunofenotipo. La mediana de la carga alélica de *MYD88* L265P por ddPCR

mostró un continuo aumento desde la GMSI IgM, pasando por la MWQ hasta la MWS. La prevalencia de *CXCR4* C1013G fue del 35% y 43% en pacientes con GMSI IgM y MWQ, respectivamente. De forma similar a *MYD88* L265P, se encontró una relación lineal con otros biomarcadores clínicos y de laboratorio.

Usando cfDNA como fuente, la mutación *MYD88* L265P fue detectada en el 38% y 63% de pacientes con GMSI IgM y MWQ, respectivamente. En el caso de las mutaciones de *CXCR4*, la ddPCR detectó la mutación C1013G en un solo caso de MWQ con una carga alélica del 1,16%. Con una mediana de seguimiento de 6 años, 23 pacientes (7 GMSI IgM y 16 MWQ) progresaron a MWS. Se encontró que los pacientes con una carga alélica superior al 8% de *MYD88* y 2% de *CXCR4* tenían un riesgo más elevado de progresión a enfermedad sintomática.

Por lo tanto, este estudio permitió la primera clasificación de riesgo basado en las alteraciones genéticas de pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas.

Prognostic impact of *MYD88* and *CXCR4* mutations assessed by droplet digital polymerase chain reaction in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia

David F. Moreno^{1,2,3}  | Mónica López-Guerra^{2,3,4,5} | Sara Paz⁴ | Aina Oliver-Caldés^{1,2,3}  | Mari-Pau Mena^{1,2} | Juan G. Correa^{1,2,3} | Anthony M. Battram^{1,2,3} | Miguel Osuna² | Alfredo Rivas-Delgado²  | Luis Gerardo Rodríguez-Lobato^{1,2,3} | Oriol Cardús^{1,2,3} | Natalia Tovar^{1,2,3} | María Teresa Cibeira^{1,2,3} | Raquel Jiménez-Segura^{1,2,3}  | Joan Bladé^{1,2,3} | Laura Rosiñol^{1,2,3}  | Dolors Colomer^{2,3,4,5} | Carlos Fernández de Larrea^{1,2,3} 

¹Amyloidosis and Myeloma Unit, Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

³Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

⁴Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain

Correspondence

Carlos Fernández de Larrea, MD, PhD, Amyloidosis and Myeloma Unit, Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, 08036, Barcelona, Spain.
 Email: cfernan1@clinic.cat

Dolors Colomer, PhD, Experimental Therapeutics in Lymphoid Malignancies Group, Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC). Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, 08036, Barcelona, Spain.
 Email: dcolomer@clinic.cat

Summary

Waldenström macroglobulinaemia (WM) is characterized by recurrent somatic mutations in *MYD88* and *CXCR4* genes. However, limitations arise when analysing these mutations in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) or smouldering WM (SWM) given the lower tumour load. Here, we used droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) to analyse *MYD88* L265P and *CXCR4* S338* mutations (C1013G and C1013A) in unsorted bone marrow (BM) or cell-free DNA (cfDNA) samples from 101 IgM MGUS and 69 SWM patients. ddPCR was more sensitive to assess *MYD88* L265P compared to allele-specific PCR, especially in IgM MGUS (64% vs 39%). *MYD88* mutation burden correlated with other laboratory biomarkers, particularly BM infiltration ($r = 0.8$; $p < 0.001$). *CXCR4* C1013G was analysed in *MYD88*-mutated samples with available genomic DNA and was detected in 19/54 (35%) and 18/42 (43%) IgM MGUS and SWM cases respectively, also showing correlation with BM involvement ($r = 0.9$; $p < 0.001$). ddPCR also detected 8 (38%) and 10 (63%) *MYD88*-mutated cfDNA samples in IgM MGUS and SWM respectively. Moreover, high BM mutation burden ($\geq 8\%$ *MYD88* and $\geq 2\%$ *CXCR4*) was associated with an increased risk of progression to symptomatic WM. We show the clinical applicability of ddPCR to assess *MYD88* and *CXCR4* in IgM MGUS and SWM and provide a molecular-based risk classification.

David F. Moreno and Mónica López-Guerra these authors contributed equally in this work.

Dolors Colomer and Carlos Fernández de Larrea these authors jointly supervised this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. *British Journal of Haematology* published by British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.

Funding information

Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer, Grant/Award Number: Lab_AECC2021; Hospital Clínic de Barcelona, Grant/Award Number: Emili Letang Grant; Janssen Research and Development, Grant/Award Number: CP043186; Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: P119/00669; European Union

KEY WORDS

CXCR4, droplet digital PCR, IgM MGUS, MYD88, Waldenström macroglobulinaemia

INTRODUCTION

Waldenström macroglobulinaemia (WM) is a B-cell neoplasm characterized by a lymphoplasmacytic infiltration in the bone marrow (BM) and the presence of a serum IgM monoclonal protein (M-protein).¹ WM is preceded by two asymptomatic stages named IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smouldering WM (SWM). The presence of highly recurrent somatic mutations is another key feature of WM. For instance, whole-genome sequencing has identified mutations in *MYD88* and *CXCR4* genes in up to 90% and 27% of WM patients respectively.^{2,3} Another recurrent alteration well described is del(6q), which was identified in up to 50% of WM patients using fluorescent *in situ* hybridization.^{4,5} The identification of abnormal B cells in IgM MGUS with a mutational and phenotypical background similar to those found in later stages of the disease strongly supports this evolutionary model.^{6–8}

Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR)-based methods to detect *MYD88* L265P using unsorted or CD19⁺ selected BM samples showed that the mutation prevalence varied from 54% to 87% in IgM MGUS and 86% to 93% in WM respectively.^{9,10} On the other hand, AS-PCR and Sanger sequencing in CD19⁺ selected BM samples have identified 17% and 43% of *CXCR4* mutations in IgM MGUS and untreated WM respectively.¹¹ Similarly, another study reported a prevalence of up to 33% of *CXCR4* mutations in IgM MGUS using Sanger sequencing.¹² Regarding targeted next-generation sequencing (NGS), *CXCR4* mutations were identified in 9% and 23% in IgM MGUS and WM respectively.¹³

This knowledge of the genomic landscape has given insights to better elucidate the impact on disease progression from asymptomatic stages. For instance, a higher risk of progression was observed in *MYD88*-mutated IgM MGUS¹⁴ and wild-type (wt) *MYD88* SWM patients.¹⁵ Regarding *CXCR4* mutations, a worse outcome was described in *CXCR4* mutated SWM patients,¹³ while another study reported no significant difference.¹⁶

Although data in WM have shown highly reproducible results using different technologies, data in IgM MGUS and SWM are more variable due to the low tumour burden, the heterogeneous BM infiltration, or the availability of BM samples in asymptomatic patients.^{9–19} Thus, there is a need to find more precise techniques to measure disease burden in this group of patients. In addition, considering that the reproducibility of the prognostic studies might be affected by the technology used to assess *MYD88* and *CXCR4* mutations, the impact of the mutational status of early disease stages on the risk of progression to symptomatic WM remains an ongoing field of investigation.

Therefore, we wondered whether using more precise methods to detect somatic mutations in asymptomatic IgM monoclonal gammopathies could overcome technical diagnostic issues in samples with low tumour burden, thereby improving prognostic risk models. In this sense, droplet digital PCR (ddPCR) technology provides an absolute quantification of nucleic acid target sequences, thus being useful to detect small clones. ddPCR can achieve higher sensitivity, precision and reproducibility compared to the standard AS-PCR.²⁰ ddPCR has been used for *MYD88* L265P detection using genomic DNA from CD19⁺ selected, unsorted BM samples, and cell-free DNA (cfDNA) of WM patients.^{21,22} More recently, ddPCR has also been applied to assess *CXCR4* S338* mutations in symptomatic WM patients.²³ However, *MYD88* and *CXCR4* mutations in cfDNA samples from asymptomatic patients have not yet been systematically evaluated.

We thus analysed *MYD88* and *CXCR4* mutations leveraging ddPCR technology in a cohort of patients with IgM MGUS and SWM, and identified more accurate markers of disease progression. The findings of this study provide further insights into the genomic landscape of IgM MGUS and SWM.

METHODS**Patients**

From 1985 to 2020, 201 patients that met the search criteria for ‘IgM monoclonal gammopathy’ were identified in the monoclonal gammopathies database of the Hospital Clínic of Barcelona. Diagnosis was based on the Second International Workshop on Waldenström Macroglobulinaemia and the Mayo Clinic criteria.^{1,24} Patients with less than 10% BM involvement and the presence of immunophenotypical findings of lymphoplasmacytic lymphoma were categorized as SWM. Patients diagnosed with ‘IgM-related disorders’ were not included in this study. The patients provided informed consent for sample collection in the biological samples bank of the Hospital Clínic of Barcelona in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the institutional review board.

Sample collection

In this study, 240 BM and plasma samples from 170 patients categorized as IgM MGUS ($N = 101$) and SWM ($N = 69$) were

included. They were the main cohort of analysis. Additional samples from patients with symptomatic WM ($N = 31$) were used as positive controls for experimental analysis. BM samples were available in the entire cohort (101 IgM MGUS, 69 SWM, and 31 symptomatic WM patients), while plasma samples were only available in 39 patients (21 IgM MGUS, 16 SWM and two symptomatic WM patients). BM and plasma samples were collected at diagnosis (IgM MGUS and SWM), and before treatment initiation (symptomatic WM). The distribution of paired samples according to each diagnosis is graphically depicted in [Figure 1](#). Processing of the samples is detailed in the supporting information (File S1).

Flow cytometry analysis

BM samples treated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were evaluated by multiparametric flow cytometry. Briefly, three eight-colour monoclonal antibody (mAb) combinations were used for lymphocyte immunophenotyping ([Table S1](#)). Data acquisition was performed with a BD FACSCanto II flow cytometer and analysed using FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Allele-specific polymerase chain reaction assay for MYD88 L265P

MYD88 L265P mutation analysis was performed on DNA from unsorted BM samples using AS-PCR technology (qBiomarker Somatic Mutation PCR Assay, MYD88_85940; Qiagen, Germany). Amplification Refractory Mutation System technology was used for allele-specific amplification. Diffuse large B-cell lymphoma cell line OCI-LY3 DNA was used as positive control, as described previously.⁹

Droplet digital polymerase chain reaction assays for MYD88 L265P and CXCR4 S338* mutations

ddPCR assays for MYD88 L265P and CXCR4 mutations were commercially available (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The two CXCR4 mutations analysed were: c.1013C>G p.Ser338Ter (CXCR4 C1013G) and c.1013C>A p.Ser338Ter

(CXCR4 C1013A). Briefly, DNA samples were tested in duplicate. We used the QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad) to generate and individually analyse each droplet. Data were then analysed in the QuantaSoft Software 1.0 (Bio-Rad). We assessed CXCR4 mutations in MYD88-mutated cases, as nearly all CXCR4 mutations occur in MYD88-mutated patients.³ When analysing CXCR4 mutations, we first assessed the C1013G mutation. Then, we analysed the C1013A mutation only in samples that were negative for the C1013G. This approach was chosen to take advantage of the availability of genomic DNA or cfDNA, the exceptional cooccurrence of both CXCR4 mutations in the same sample, and the clinical-oriented applicability of ddPCR. Detailed description is available in the supplementary information (S1).

Statistical analysis

Pearson correlation or Spearman tests were used to analyse correlation between tumour burden and laboratory biomarkers. The Fisher exact test was used to analyse categorical data. Mutation burden (MYD88 and CXCR4) was fitted as a continuous variable into a Fine and Grey regression model to analyse the impact on the risk of progression to symptomatic WM. Progression to symptomatic disease criteria was defined according to previous consensus recommendations.^{25,26} To construct a practical model, we later categorized the mutation burden according to an X-tile approach obtaining cut-point subsets. Plots were calculated based on the cumulative incidence function (CIF) ([Figure S1](#)). All statistical analyses were performed using Stata version 16 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA). Detailed description is available in the supplementary information (S1).

RESULTS

Baseline patient characteristics

One-hundred seventy patients (88 male/82 female; median age, 75 years) with available sample material, diagnosed with IgM MGUS (101 patients) and SWM (69 patients) were selected for the current study. Thirty-eight (22%) patients were diagnosed before the year 2000, 31 (18%) patients between

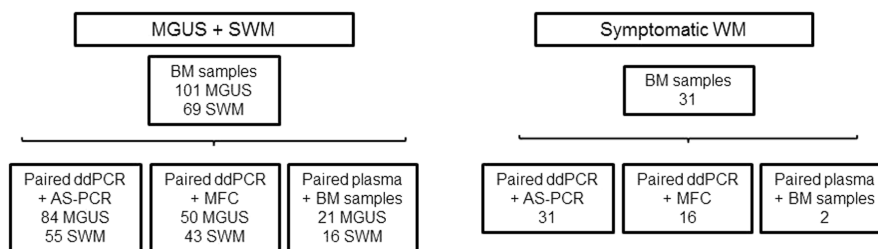


FIGURE 1 Sample processing methodology. AS-PCR, allele-specific polymerase chain reaction; BM, bone marrow; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; MFC, multiparameter flow cytometry; SWM, smouldering Waldenström macroglobulinaemia; WM, Waldenström macroglobulinaemia.

2000 and 2010, and 101 (59%) after 2010. The main clinical and biological patient characteristics are summarized in Table 1.

MYD88 L265P detection by allele-specific versus droplet digital polymerase chain reaction in bone marrow

We first analysed the *MYD88* L265P mutation prevalence in genomic DNA from unsorted BM samples using both AS-PCR and ddPCR techniques. We did both AS-PCR and ddPCR analyses in 84 IgM MGUS and 55 SWM patients at diagnosis. In IgM MGUS, the *MYD88* L265P mutation was detected in 33 (39%) patients using AS-PCR, but ddPCR was more sensitive, detecting the mutation in 54 (64%) patients ($p < 0.001$). Similarly, in SWM, *MYD88* L265P was detected in 40 (73%) patients using AS-PCR, while ddPCR identified the mutation in 45 (82%) patients ($p < 0.001$) (Figure 2A). Analysing *MYD88* mutation burden distribution, we observed that the *MYD88* L265P mutation was not detected in 50% of cases by AS-PCR when the variant allelic frequency of *MYD88* L265P assessed by ddPCR was lower than 1%. This finding was supported by the 0.0259% limit of detection of ddPCR after serial dilutions of a *MYD88* L265P sample in wt DNA (Table S2). To evaluate the higher sensitivity of ddPCR compared to AS-PCR, we analysed 50 out of the 84 IgM MGUS cases who had their immunophenotype analysis available at the time of DNA collection. In this group, 30 out of 50 (60%) and 19 out of 37 (51%) patients were positive for the *MYD88* mutation by ddPCR and AS-PCR respectively. In samples without detectable clonal B cells by flow cytometry, *MYD88* L265P was detected in 15 (50%) and 7 (33%) cases using ddPCR and AS-PCR respectively. In the case of SWM, 27 out of 32 (84%) and 23 out of 28 (82%) patients were positive for the *MYD88* mutation by ddPCR and

AS-PCR respectively. All 27 (100%) SWM patients who had clonal B cells were also positive for the mutation by ddPCR, and 22 (96%) by AS-PCR. Thus, the agreement of clonal populations observed by ddPCR and flow cytometry was 62% (Cohen's k 0.3; $p = 0.016$) in IgM MGUS and 91% (Cohen's k 0.6; $p < 0.001$) in SWM.

MYD88 L265P mutation burden in bone marrow

The median *MYD88* mutation burden obtained by ddPCR was 1.13% [interquartile range (IQR) 0.42–2.78] in IgM MGUS ($n = 62$) and 5.36% (IQR 2.49–11.00) in SWM ($n = 54$). We also analysed a group of symptomatic WM cases as positive controls ($n = 31$) and the median *MYD88* mutation burden was 11.00% (IQR 5.61–18.49). *MYD88* mutation burden was significantly higher in successive disease stages (IgM MGUS versus SWM, $p < 0.001$; IgM MGUS, SWM versus symptomatic WM, $p < 0.001$). The distribution plots are shown graphically in Figure 2B. We then compared *MYD88* mutation burden assessed by ddPCR to standard laboratory biomarkers. We observed that the mutation burden as a continuous variable correlated with the serum M-protein size ($r = 0.3$; $p = 0.001$), the serum IgM concentration ($r = 0.4$; $p < 0.001$), the infiltration of the BM by morphology ($r = 0.7$; $p < 0.001$), and the percentage of BM clonal B cells by flow cytometry ($r = 0.8$; $p < 0.001$) (Figure 2C).

Analysis of CXCR4 C1013G and C1013A mutations by droplet digital polymerase chain reaction in bone marrow

In addition, we analysed the two most prevalent *CXCR4* mutations in WM (C1013G and C1013A) using ddPCR. The limit of detection of 0.0399% was established after a serial dilution of a *CXCR4* S338* C1013G sample in wt DNA (Table S3). Four symptomatic WM BM samples previously known to harbour the *MYD88* L265P mutation were used as controls. Amongst them, three cases harboured the C1013G variant with a mutation burden of 1.5%, 4.8% and 7.6%, while the *MYD88* L265P mutation burden was 20.5%, 8.1% and 5.1% for each case respectively. The fourth case had the C1013A variant with a mutation burden of 17.2%, while the *MYD88* L265P was 18.5%. We then analysed the presence of *CXCR4* mutations in asymptomatic IgM monoclonal gammopathy patients who were *MYD88*-positive and had available genomic BM DNA (54 IgM MGUS and 42 SWM patients). By ddPCR, *CXCR4* C1013G was positive in 19 (35%) and 18 (43%) patients with IgM MGUS and SWM respectively. The median *CXCR4* C1013G mutation burden distribution in IgM MGUS was 0.4% (IQR 0.3–1.4), which was similar to that in SWM (0.4%, IQR 0.2–1.2). Overall, the distribution of the mutation burden suggested a subclonal pattern for *CXCR4* mutations. As a

TABLE 1 Baseline characteristics of the patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathies

Baseline characteristics	N = 170
Median age, years (IQR)	75 (65–84)
Sex, female (%)	82 (48)
Diagnosis (%)	
IgM MGUS	101 (59)
SWM	69 (41)
M-protein size (g/l), median (IQR)	12.1 (6–15)
Bone marrow involvement (% total cellularity)	17 (11–28)
Albumin (g/l), median (IQR)	43 (41–45)
Haemoglobin (g/l), median (IQR)	134 (121–145)
Platelet count ($10^3/\mu\text{l}$), median (IQR)	236 (184–287)
$\beta 2$ -microglobulin (mg/dl), median (IQR) ^a	2.3 (1.8–2.9)

Abbreviations: IQR, interquartile range; M-protein, serum monoclonal protein; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; SWM, smouldering Waldenström macroglobulinaemia.

^aAvailable in 145 patients.

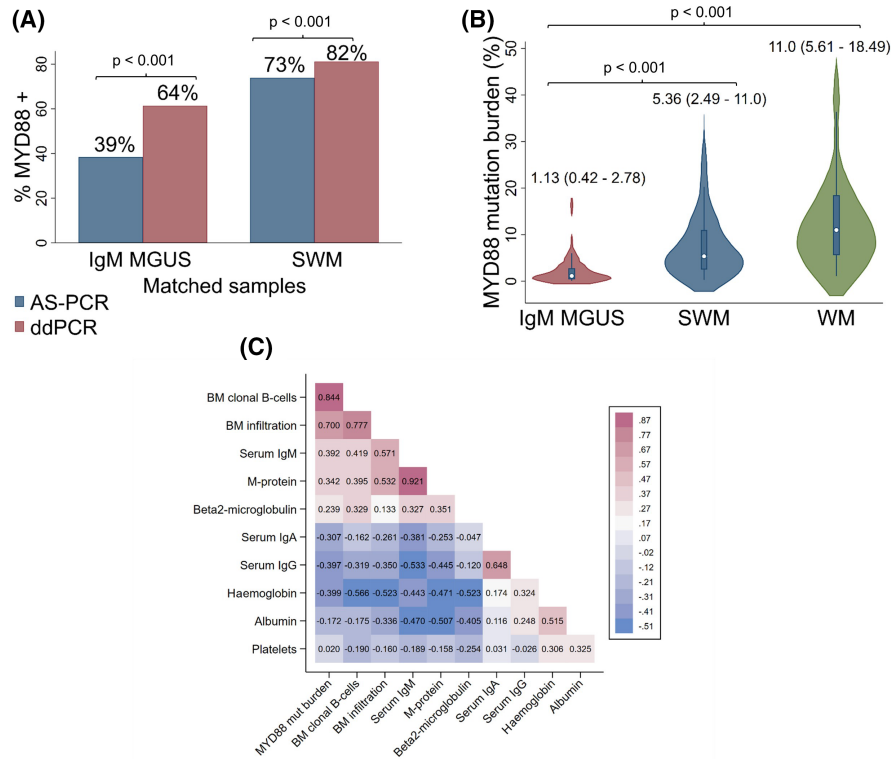


FIGURE 2 MYD88 L265P analysis in the bone marrow of IgM monoclonal gammopathy patients. (A) Comparison between AS-PCR and droplet digital PCR (ddPCR) to detect MYD88 L265P in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smouldering Waldenström macroglobulinaemia (SWM). (B) MYD88 mutation burden distribution in IgM MGUS, SWM and symptomatic Waldenström macroglobulinaemia (WM). (C) Heatmap correlation plot of MYD88 mutation burden and other common laboratory biomarkers in IgM monoclonal gammopathies. Each number shows the Pearson correlation coefficient. AS-PCR, allele-specific polymerase chain reaction; BM, Bone marrow; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; M-protein, serum monoclonal protein; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; SWM, smouldering Waldenström macroglobulinaemia; WM, Waldenström macroglobulinaemia. [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

continuous variable, CXCR4 C1013G showed positive correlations with BM infiltration assessed by morphology ($r = 0.4$; $p < 0.001$), MYD88 mutation burden assessed by ddPCR ($r = 0.6$; $p < 0.001$), and BM clonal B cells assessed by flow cytometry ($r = 0.9$; $p < 0.001$). CXCR4 C1013A was identified in only five MYD88-mutated patients not harbouring the C1013G mutation, two corresponding to IgM MGUS cases and three with SWM, all of them with less than 2% mutation burden. Figure 3 shows the mutation burden distribution along samples that had both MYD88 and CXCR4 mutations.

Evaluation of MYD88 L265P by droplet digital polymerase chain reaction in cell-free DNA

ddPCR has been reported to be a reliable technology to detect MYD88 L265P in cfDNA samples with high tumour burden.²¹ Here, we attempted to demonstrate that ddPCR could additionally be used to detect MYD88 mutation in the cfDNA of patients with a low tumour burden. In cfDNA samples from IgM MGUS patients, MYD88 mutation was detected in eight out of 21 (38%) with a mutation burden median distribution of 0.54% (IQR 0.20–1.32). In the case of SWM patients, ddPCR detected the mutation

in 10 out of 16 (63%) patients with a median distribution of 1.78% (IQR 0.24–7.26). In two cases of symptomatic WM, MYD88 mutation was detected in both cases (1.84% and 3.12% of mutation burden). Overall, the minimum MYD88 mutation burden in cfDNA was 0.20%, and the maximum was 7.26% (Figure 4A). As a biomarker, MYD88 in cfDNA positively correlated with the serum M-protein size ($n = 39$; $r = 0.3$; $p = 0.047$), the serum IgM concentration ($n = 37$; $r = 0.4$; $p = 0.016$), the BM infiltration assessed by morphology ($n = 39$; $r = 0.4$; $p = 0.015$), and the MYD88 BM mutation burden as assessed by ddPCR ($n = 35$; $r = 0.5$; $p = 0.001$) (Figure 4B–D). Regarding CXCR4 mutations assessed in cfDNA, we were only able to detect the C1013G variant in one sample from a SWM patient (1.16% mutation burden), which was also positive for that mutation in BM (13.1%) and for MYD88 L265P in both cfDNA (0.84%) and BM (13.36%).

Prognostic impact of MYD88 and CXCR4 mutations assessed by droplet digital polymerase chain reaction in bone marrow

With a median follow-up of six years (IQR 3–9 years), progression to symptomatic WM was observed in 23 (14%)

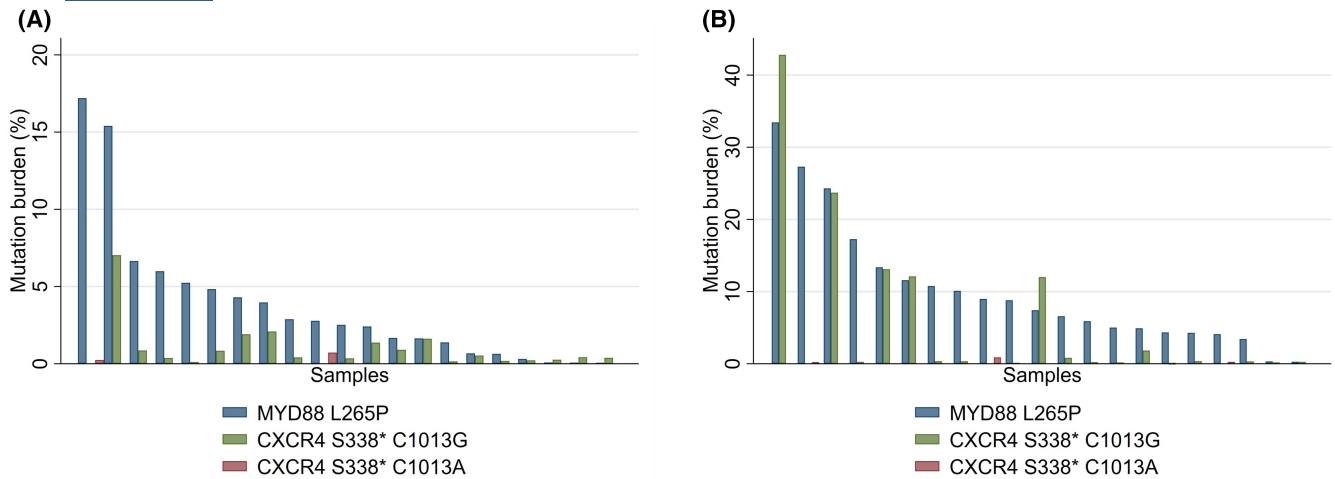


FIGURE 3 *CXCR4* mutations burden (%) distribution in *MYD88* L265P-positive bone marrow samples. (A) *CXCR4* S338* C1013G and C1013A in IgM MGUS. (B) *CXCR4* S338* C1013G and C1013A in smouldering Waldenström macroglobulinaemia (SWM). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

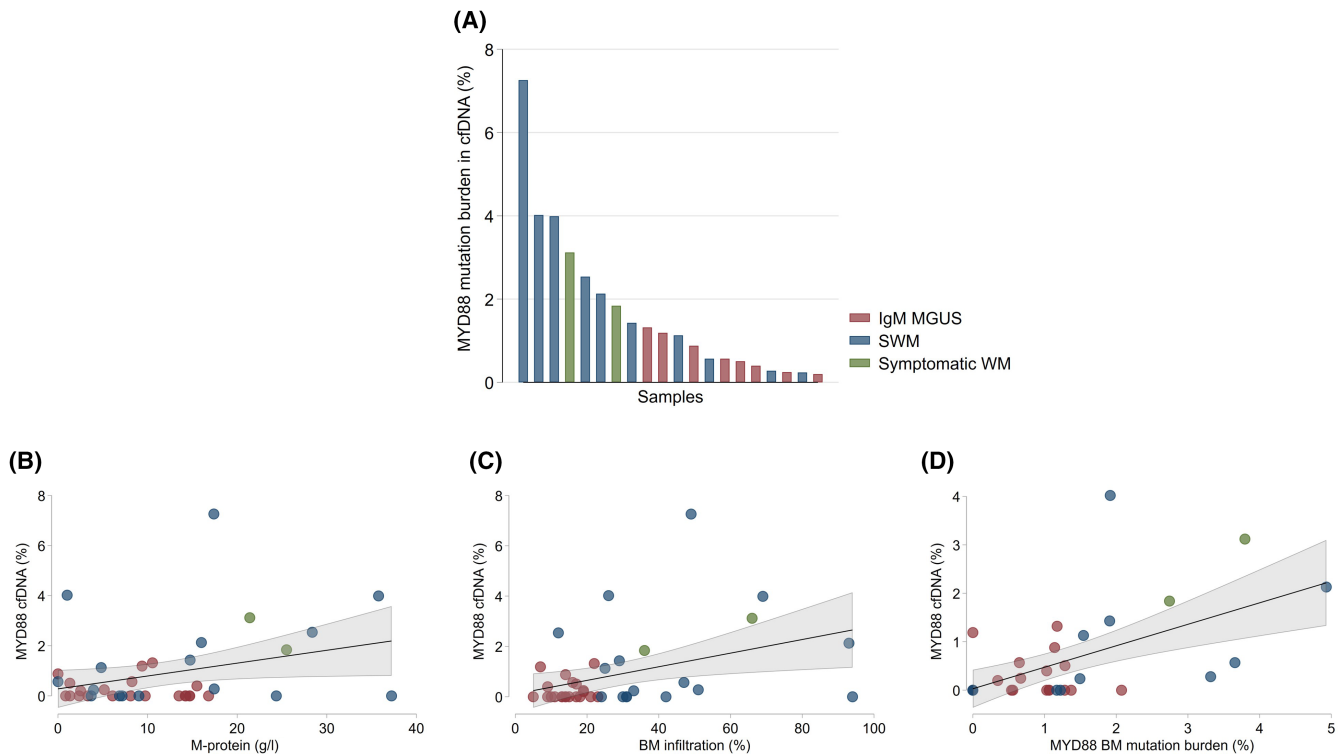


FIGURE 4 Analysis of *MYD88* L265P cell-free DNA (cfDNA) by ddPCR in plasma from IgM MGUS ($n = 21$), SWM ($n = 16$), and symptomatic WM ($n = 2$). (A) Distribution of *MYD88* L265P burden in cfDNA in samples of patients with IgM MGUS, SWM and symptomatic WM. (B) Correlation plot of *MYD88* L265P cfDNA (%) and M-protein size ($n = 39$; $r = 0.3$; $p = 0.047$). (C) Correlation plot of *MYD88* L265P cfDNA (%) and the BM infiltration by morphology ($n = 39$; $r = 0.4$; $p = 0.015$). (D) Correlation plot of *MYD88* L265P cfDNA (%) and the *MYD88* BM mutation burden (values transformed to fit in the scatterplot) by ddPCR ($n = 35$; $r = 0.5$; $p = 0.001$). BM, bone marrow; ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; SWM, smouldering Waldenström macroglobulinaemia; WM, Waldenström macroglobulinaemia. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

patients (7 MGUS and 16 SWM patients). Death without progression accounted for up to 37 (22%) patients. All patients progressed due to disease complications related to tumour burden: significant peripheral blood cytopenia (anaemia and/or thrombocytopenia) and symptomatic lymphadenopathy and/or splenomegaly. There were no

patients lost to follow-up. At five and 10 years, the cumulative incidence of progression of patients with IgM MGUS to symptomatic WM was 5% (95% CI 2–12) and 7% (95% CI 3–19) respectively. In the case of SWM, the cumulative incidence of progression was 22% (95% CI 12–36) at five years, and 30% (95% CI 17–47) at 10 years. Median

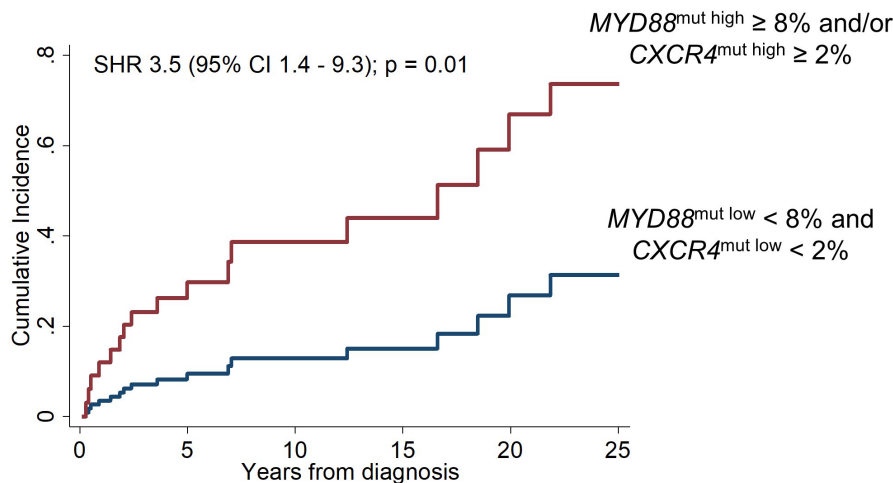


FIGURE 5 Risk of progression to symptomatic Waldenström macroglobulinaemia. Cut-off points were calculated using an X-tile approach. Shown is the cumulative incidence of progression for both IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia considering *MYD88* L265P and *CXCR4* S338* C1013G tumour burden when assessed by droplet digital polymerase chain reaction in the bone marrow. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

overall survival of all patients was 13 years (95% CI 11–20) (Figure S4).

To assess the impact of BM ddPCR-detected *MYD88* and *CXCR4* mutations on the risk of progression, we fitted a competing-risk framework as described previously. Using the Fine and Grey regression model, we first analysed the mutation burden of each of the mutations as continuous variables. In the univariate analysis, the subhazard ratios (SHR) of the *MYD88* mutation burden were 1.2 (95% CI 1.04–1.36; $p = 0.012$) and 1.04 (95% CI 1.01–1.08; $p = 0.040$) in IgM MGUS and SWM respectively. The SHRs of *CXCR4* C1013G were 1.8 (95% CI 1.33–2.41; $p < 0.001$) and 1.02 (95% CI 0.9–1.04; $p = 0.065$) in IgM MGUS and SWM respectively (Table S4).

We then established cut-off points for the *MYD88* and *CXCR4* mutation burden to identify risk categories of progression to symptomatic WM. For the whole series, patients who had a *MYD88* mutation burden higher than 8% [SHR 4.8, 95% confidence interval (CI) 2–11.2; $p < 0.001$] or a *CXCR4* mutation burden higher than 2% (SHR 4.2, 95% CI 1.7–10.7; $p = 0.003$) had a cumulative incidence of progression of 30% and 25% at five years respectively. In our series, 19 patients who progressed were previously tested for *MYD88* and *CXCR4* mutations. Two out of six IgM MGUS patients and nine out of 13 SWM patients having a *MYD88* or *CXCR4* high mutation burden (>8% and >2% respectively) progressed (SHR 3.5, 95% CI 1.4–9.3; $p = 0.01$) (Figure 5). Based only on the *MYD88* L265P mutation, we identified a small group of patients with high risk at each stage. Thus, IgM MGUS patients with a *MYD88* mutation burden higher than 4% (SHR 7.8, 95% CI 1–32; $p = 0.005$) had a cumulative incidence of progression of 20% at five years. In the case of SWM, patients with a *MYD88* mutation burden higher than 25% (SHR 3.4, 95% CI 1–8; $p = 0.012$) had a cumulative incidence of progression of 45% at five years (Figure S5). Regarding patients who were

MYD88 L265P wt using ddPCR, only three out of 51 (6%) patients progressed to symptomatic disease. On the other hand, 21 out of 117 (18%) *MYD88*-mutated patients by ddPCR progressed. So, *MYD88* L265P wt did not impact the progression to symptomatic disease (SHR 0.4, 95% CI 0.1–1.2; $p = 0.112$).

DISCUSSION

Our study highlighted the usefulness of ddPCR to detect *MYD88* and *CXCR4* mutations in the clinical setting of asymptomatic IgM monoclonal gammopathies. We showed the feasibility of *MYD88* L265P detection and quantification using ddPCR in unsorted BM samples with low tumour burden. In matched samples, we found that ddPCR was able to detect more *MYD88*-mutated cases than conventional AS-PCR, especially in IgM MGUS. Moreover, ddPCR identified the mutation even in samples for which flow cytometry could not detect B-cell clonality. This in fact could be explained by either the sensitivity of multiparameter flow cytometry or, as recently reported, the presence of the *MYD88* mutation in precursor lymphocytes.^{7,8} Although our manuscript is not able to answer this question, we can infer from our data that the *MYD88* mutation is again a very early event. Further studies comparing next-generation flow cytometry to detect B-cell clonality along with ddPCR could help to solve this issue.

Using *MYD88* mutation burden as a continuous variable, we demonstrated that the mutation distribution was higher with successive disease stages. Moreover, *MYD88* mutation burden by ddPCR positively correlated with well-known biomarkers, such as involvement of the BM either evaluated by flow cytometry or morphology; therefore, it could be considered a specific biomarker that accurately reflects disease burden. In addition, inclusion of this novel biomarker along

with the classical laboratory features in early disease stages of WM might increase the predictive power of risk models.

Previous studies have found that nonsense *CXCR4* mutations were also recurrently prevalent in WM.³ Among all variants, nonsense *CXCR4* S338* mutations were the most prevalent. Up to 50% are transversions C>G and C>A at nucleotide position 1013.^{11,13,27,28} These variants have been associated with hyperviscosity and worst outcome regarding progression-free survival in WM patients.^{3,11,27,29–31} However, most of these studies have been done in purified tumour BM samples. Due to the high sensitivity of ddPCR, we could detect the two most recurrent *CXCR4* mutations (C1013G and C1013A) in unsorted BM samples. To our knowledge, this is the first report of testing *CXCR4* mutations by ddPCR in IgM MGUS and SWM. We detected the *CXCR4* C1013G mutation in 35% of IgM MGUS cases and in 43% of SWM carrying also the *MYD88* mutation. The variant *CXCR4* C1013A was identified in fewer cases, all of them with low mutation burden. Most of the samples that harboured *CXCR4* mutations had a mutation burden lower than that of *MYD88*. The only three SWM cases that harboured higher *CXCR4* mutation burden did not differ in any other clinical or laboratory characteristic from the whole series, including *MYD88* mutation burden itself, which was quite similar. Moreover, together with two recent single-cell studies suggesting that *CXCR4* mutations behave as second clonal hits,^{7,8} these three cases could be better explained by technical sample-processing issues. In addition, *CXCR4* C1013G positively correlated with the BM involvement, as was reported previously in CD19⁺ selected BM cells in WM.²⁸ Here, we showed that ddPCR can reliably detect *CXCR4* mutations in unsorted BM cells, which, considering cell sorting is not feasible in most laboratories, makes it more easily transferable to the clinic.

Considering that *MYD88* testing is based on single BM samples for each patient and that BM disease distribution can be somehow heterogeneous and patchy, it could affect mutation detection. Therefore, we also analysed cfDNA in a small set of cases, following the promising results observed in WM.^{21,32–34} We found that ddPCR was able to detect and quantify *MYD88* mutation in cfDNA in IgM MGUS and SWM, allowing us to infer correlation with other biomarkers. Regarding *CXCR4* mutations in cfDNA, previous reports have been mostly focused on WM samples^{21,33}; while one study using a different sequencing approach reported that two out of nine IgM MGUS patients harboured *CXCR4* mutations.³² In our study, it has been more difficult to show solid cfDNA data in asymptomatic IgM patients. This may be explained by the fact that *CXCR4* mutations are subclonal and that we have only assessed the two most common mutations. We consider that performing both ddPCR as well as deep next-generation sequencing in cfDNA could allow us to draw more conclusions on *CXCR4* mutation detection in samples with very low tumour burden. Taken together, we have demonstrated that cfDNA is a promising source of material for biomarker detection in IgM MGUS and SWM and thus can overcome diagnostic challenges such as performing BM biopsy especially in an ageing population.

Given the previous results, we analysed the impact of *MYD88* and *CXCR4* mutations on risk of progression to symptomatic WM. We established cut-off points for IgM MGUS and SWM, both individually and combined, in a competing-risk framework.³⁵ We found that the cumulative incidence of progression was higher with greater *MYD88* and *CXCR4* BM mutation burden, either analysed as continuous or categorical variables. Larger studies could demonstrate the independent impact of the mutation burden on the risk of progression compared to other well-known biomarkers related to tumour burden. Nevertheless, our data suggested that both the presence and the mutation BM tumour burden confer a greater risk of progression. Previous studies have shown non-concordant results regarding the clinical impact of *MYD88* and *CXCR4* mutations in IgM MGUS and SWM.^{10,14,15,18} The low number of patients tested, the technical issues regarding sample preparation in IgM MGUS and SWM, along with the heterogeneous histological features of wt *MYD88* cases,^{36,37} might explain the variability of previous findings. Of note, we only observed disease progression to symptomatic WM and no other lymphoproliferative disorder or amyloid light-chain (AL) amyloidosis. Another important driver of disease progression is the presence of del(6q). Although we did not have data to draw conclusions about the interaction between *MYD88*, *CXCR4* and del(6q) in our series, we consider it a potential field of future research, partially solved recently by single-cell technology.⁸ Regarding cfDNA mutation burden, we were unable to predict the risk of progression given that plasma samples were only collected in the last five years, and most of these patients have not yet progressed during the follow-up. Longer follow-up will help to elucidate if cfDNA could also predict the risk of progression.

Overall, our study establishes that *MYD88* and *CXCR4* mutations can be analysed by ddPCR with high sensitivity, making them excellent disease biomarkers for asymptomatic IgM monoclonal gammopathies in the clinic. The main advantages of ddPCR are that it can be applied in almost any academic centre, due to its easy setup, and that it avoids the need of sample sorting, making it an excellent candidate to replace standard AS-PCR for *MYD88* mutation analysis. We also showed that *MYD88* testing in cfDNA is a promising tool that might overcome diagnostic challenges. In addition, we propose the first genomic risk classification of asymptomatic IgM monoclonal gammopathies using novel techniques.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

David F. Moreno, Mónica López-Guerra, Dolors Colomer, and Carlos Fernández de Larrea designed the research project, analysed and interpreted data, and wrote the manuscript. David F. Moreno, Carlos Fernández de Larrea, Laura Rosiñol, Joan Bladé, and María Teresa Cibeira recruited and followed the patients, and collected the clinical data from the patients' registry. Sara Paz, David F. Moreno, Mari-Pau Mena, Miguel Osuna, Alfredo Rivas-Delgado, and Oriol Cardús conducted the experiments. Aina Oliver-Caldés, Juan G. Correa, David F. Moreno, Luis Gerardo Rodríguez-Lobato,

Oriol Cardús, Anthony M. Battram, and Carlos Fernández de Larrea analysed the data. All authors reviewed and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the Genomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

FUNDING INFORMATION

This study was supported in part by grants PI19/00669 from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and co-funded by the European Union, the Emili Letang Grant 2020 (from Hospital Clínic de Barcelona for D.F.M.), Grant Lab_AECC2021 from Asociación Española contra el Cáncer (AECC), and an unrestricted grant from Janssen.

CONFLICT OF INTERESTS

Joan Bladé: honoraria for lectures from Janssen, Celgene, Amgen, Takeda, and Oncopeptides. Laura Rosiñol: consulting fees from Amgen, Celgene, Sanofi, Janssen, and Takeda. Carlos Fernández de Larrea: advisory boards from Amgen, Janssen, and BMS; research grants from Janssen, BMS, Takeda, and Amgen; honoraria for lectures: BMS, Takeda, Sanofi, Amgen, Janssen, GSK, and Beigene. María Teresa Cibeira: honoraria from Amgen and Janssen. Luis Gerardo Rodríguez-Lobato: honoraria from Janssen and travel grants from Janssen and Amgen. David F. Moreno and Aina Oliver-Caldés: travel grants from Janssen. Mónica López-Guerra, Juan G. Correa, Dolors Colomer, Anthony M. Battram, Sara Paz, Mari-Pau Mena, Oriol Cardús, Raquel Jiménez-Segura, Natalia Tovar, Miguel Osuna, and Alfredo Rivas-Delgado have nothing to disclose.

The results from this study were presented as an oral presentation at the 63rd American Society of Haematology Annual Meeting (December, 2021).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available on request to the corresponding authors, Dolors Colomer (dcolomer@clinic.cat) and Carlos Fernández de Larrea (cfernand1@clinic.cat).

ORCID

David F. Moreno  <https://orcid.org/0000-0002-1752-3081>

Aina Oliver-Caldés  <https://orcid.org/0000-0002-7921-5420>

Alfredo Rivas-Delgado  <https://orcid.org/0000-0003-0385-3415>

Raquel Jiménez-Segura  <https://orcid.org/0000-0003-1333-0343>

Laura Rosiñol  <https://orcid.org/0000-0002-2534-9239>

Carlos Fernández de Larrea  <https://orcid.org/0000-0003-4930-9255>

REFERENCES

- Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003;30(2):110–5.
- Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012;367(9):826–33.
- Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood.* 2014;123(11):1637–46.
- Schop RFJ, Van Wier SA, Xu R, Ghobrial I, Ahmann GJ, Greipp PR, et al. 6q deletion discriminates Waldenström macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;169(2):150–3.
- García-Sanz R, Dogliotti I, Zaccaria GM, Ocio EM, Rubio A, Murillo I, et al. 6q deletion in Waldenström macroglobulinaemia negatively affects time to transformation and survival. *Br J Haematol.* 2021;192(5):843–52.
- Paiva B, Corchete LA, Vidriales MB, García-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2015;125(15):2370–80.
- Kaushal A, Nooka AK, Carr AR, Pendleton KE, Barwick BG, Manalo J, et al. Aberrant Extrafollicular B Cells, Immune Dysfunction, Myeloid Inflammation, and MyD88-Mutant Progenitors Precede Waldenström macroglobulinemia. *Blood Cancer Discov.* 2021;2(6):600–15.
- Rodríguez S, Celay J, Goicoechea I, Jimenez C, Botta C, Garcia-Barchino MJ, et al. Preneoplastic somatic mutations including MYD88 L265P in lymphoplasmacytic lymphoma. *Sci Adv.* 2022;8:eabl4644.
- Xu L, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, 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(11):2051–8.
- Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia Leukemia. *Leukemia.* 2013;27(8):1722–8.
- Xu L, Hunter ZR, Tsakmaklis N, Cao Y, Yang G, Chen J, et al. Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2016;172(5):735–44.
- Jiménez C, Prieto-Conde MI, García-Álvarez M, Alcoceba M, Escalante F, Chillón M del C, et al. Unraveling the heterogeneity of IgM monoclonal gammopathies: a gene mutational and gene expression study. *Ann Hematol.* 2018;97(3):475–84.
- Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, Ferretti VV, Rizzo E, Malcovati L, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica.* 2017;102(12):2077–85.
- Varettoni M, Zibellini S, Boveri E, Klersy C, Candido C, Rattotti S, et al. A risk-stratification model based on the initial concentration of the serum monoclonal protein and MYD 88 mutation status identifies a subset of patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance at high risk of progression to Waldenström macroglobulinaemia or other lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol.* 2019;187(4):441–6.
- Bustoros M, Sklaventis-Pistofidis R, Kapoor P, Liu CJ, Kastritis E, Zanwar S, et al. Progression risk stratification of asymptomatic waldenström macroglobulinemia. *JCO.* 2019;37(16):1403–11.
- Zanwar S, Abeykoon JP, Ansell SM, Gertz MA, Colby C, Larson D, et al. Disease outcomes and biomarkers of progression in smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2021;195(2):210–6.
- Moreno DF, Pereira A, Tovar N, Cibeira MT, Magnano L, Rozman M, et al. Defining an ultra-low risk group in asymptomatic IgM monoclonal gammopathy. *Cancers.* 2021;13(9):2055.
- Correa JG, Cibeira MT, Tovar N, Isola I, Pedrosa F, Díaz T, et al. Prevalence and prognosis implication of MYD88 L265P mutation in IgM

- monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2017;179(5):849–51.
19. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Cao Y, Liu X, Manning R, 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(8):1698–704.
 20. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem.* 2011;83(22):8604–10.
 21. Drandi D, Genuardi E, Dogliotti I, Ferrante M, Jiménez C, Guerrini F, et al. Highly sensitive MYD88 L265P mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica.* 2018;103(6):1029–37.
 22. Ferrante M, Furlan D, Zibellini S, Borriero M, Candido C, Sahnane N, et al. MYD88L265P detection in IgM monoclonal gammopathies: methodological considerations for routine implementation. *Diagnostics.* 2021;11(5):779.
 23. Tomowiak C, Poulain S, Herbaux C, Perrot A, Mahé B, Morel P, et al. Obinutuzumab and idelalisib in symptomatic patients with relapsed/refractory Waldenström macroglobulinemia. *Blood Adv.* 2021;5(9):2438–46.
 24. Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2021 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2021;96(2):258–69.
 25. Kyle RA, Treon SP, Alexanian R, Barlogie B, Björkholm M, Dhodapkar M, et al. Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenström's macroglobulinemia: consensus Panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003;30(2):116–20.
 26. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, Kyle RA, Leleu X, McMaster M, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinaemia: a task force from the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2016;175(1):77–86.
 27. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2014;123(18):2791–6.
 28. Poulain S, Roumier C, Venet-Caillault A, Figeac M, Herbaux C, Marot G, et al. Genomic landscape of CXCR4 mutations in Waldenström macroglobulinemia. *Clin Cancer Res.* 2016;22(6):1480–8.
 29. Treon SP, Xu L, Guerrero ML, Jimenez C, Hunter ZR, Liu X, et al. Genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia and its impact on treatment strategies. *JCO.* 2020;38(11):1198–208.
 30. Kaiser LM, Hunter ZR, Treon SP, Buske C. CXCR4 in Waldenström's Macroglobulinemia: chances and challenges. *Leukemia.* 2021;35(2):333–45.
 31. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, Maiso P, Moschetta M, Mishima Y, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood.* 2014;123(26):4120–31.
 32. Bagratuni T, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Mavrianou-Koutsoukou N, Liacos C, Patseas D, et al. Detection of MYD88 and CXCR4 mutations in cell-free DNA of patients with IgM monoclonal gammopathies. *Leukemia.* 2018;32(12):2617–25.
 33. Demos MG, Hunter ZR, Xu L, Tsakmaklis N, Kofides A, Munshi M, et al. Cell-free DNA analysis for detection of MYD88 L265P and CXCR4 S338X mutations in Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol [Internet].* 2021;96:E250–3.
 34. Wu YY, Jia MN, Cai H, Qiu Y, Zhou DB, Li J, et al. Detection of the MYD88L265P and CXCR4S338X mutations by cell-free DNA in Waldenström macroglobulinemia. *Ann Hematol.* 2020;99(8):1763–9.
 35. Austin PC, Fine JP. Practical recommendations for reporting Fine-Gray model analyses for competing risk data. *Stat Med.* 2017;36(27):4391–400.
 36. Treon SP, Gustine J, Xu L, Manning RJ, Tsakmaklis N, Demos M, et al. MYD88 wild-type Waldenström Macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *Br J Haematol.* 2018;180(3):374–80.
 37. Hunter ZR, Xu L, Tsakmaklis N, Demos MG, Kofides A, Jimenez C, et al. Insights into the genomic landscape of MYD88 wild-type Waldenström macroglobulinemia. *Blood Adv.* 2018;2(21):2937–46.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Moreno DF, López-Guerra M, Paz S, Oliver-Caldés A, Mena M-P, Correa JG, et al. Prognostic impact of *MYD88* and *CXCR4* mutations assessed by droplet digital polymerase chain reaction in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia *Br J Haematol.* 2023;200(2):187–196. <https://doi.org/10.1111/bjh.18502>

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Samples collection and processing

Bone marrow (BM) samples (5-10 mL – EDTA tubes) were obtained from aspirates of all patients within the entire cohort. To obtain white blood cells (WBC) from BM, samples were resuspended in erythrocytes lysis buffer (NH₄Cl) and then incubated for 10 minutes (min) at room temperature on a horizontal shaker. Samples were then centrifugated at 400g for 10 min and resuspended on lysis buffer twice. The pellet obtained was washed in phosphate buffered saline (PBS) and then immediately stored at -80°C for later use. BM sample processing was done up to 24 hours after BM aspirate collection. Genomic DNA extraction from BM pellet samples was performed according to manufacturer instructions (QIAamp DNA kit, Qiagen, Germany). DNA quality and concentration were assessed using a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, United States). After acceptable DNA quality control, genomic DNA was then stored at -20°C. Peripheral blood (PB) samples (10 mL – EDTA tubes) were obtained from 2015 to 2020. Sample processing was performed no more than 4 hours after blood extraction as recommended previously (1). The manipulation included a two-step centrifugation process: first, PB EDTA tubes were centrifuged for 10 minutes at 1500g followed by a second spin at 20000g. Plasma was then aliquoted and stored immediately at -80°C for later use. cfDNA was extracted from 4 mL of plasma using a QIAamp DNA kit (Qiagen, Germany). cfDNA quantity and quality were assessed using a Qubit High Sensitivity dsDNA kit (Thermo Fisher Scientific, United States) and a TapeStation (Agilent Technologies), respectively. After quality assessment (DNA size range from 100 to 250 bp), cfDNA was then stored at -20°C.

ddPCR assays for *MYD88* L265P, *CXCR4* S338* C1013G, and *CXCR4* S338* C1013A

Commercial assays to detect *MYD88* L265P (dHsaMDS2516944) and *CXCR4* S338* mutations C1013G and C1013A (dHsaMDS130738061 and dHsaMDS858629821, respectively) were designed by the manufacturer (Bio-Rad). The reference genome for the commercial *CXCR4* mutations assays was hg19. Details of the amplicon coordinates for each mutation sample are as follows:

MYD88 L265P: hg19|chr3:38182580-38182702:

```
+GGGGCAAGGGCCTGATGCCAGCATGGCACCCCTTGGCTTGCAGGTGCC  
CATCAGAAGCGAC[T/C]GATCCCCATCAAGTACAAGGCAATGAAGAAAGAG  
TTCCCAGCATCCTGAGGTTCACT
```

CXCR4 S338* C1013G: hg19|chr2:136872424-136872546:
ACCTCTGTGAGCAGAGGGTCCAGCCTCAAGATCCTCTCCAAAGGAAAGCG
AGGTGGACATT[C/G]ATCTGTTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTCAC
TCCAGCTAACACAGATGTAAAAGA

CXCR4 S338* C1013A: hg19|chr2:136872424-136872546:
ACCTCTGTGAGCAGAGGGTCCAGCCTCAAGATCCTCTCCAAAGGAAAGCG
AGGTGGACATT[C/A]ATCTGTTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTCAC
TCCAGCTAACACAGATGTAAAAGA

Amplicon length was 65 bp for the *MYD88* L265P assay, and 70 bp for both *CXCR4* assays. ddPCR assays were used to quantify the mutant allele and its wild-type (wt) counterpart. Mutant variant allele frequency (VAF) was quantified on genomic DNA and cfDNA using the Bio-Rad QX200 system. Samples were tested at least in duplicate using 50 – 100 ng DNA per well (at least 5 ng for cfDNA). Droplets were generated on a Droplet Generator QX200 (Bio-Rad). After thermal cycling, the PCR product of each well was analyzed using the QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) which measures the fluorescence of each droplet individually using a two-color detection system (FAM and HEX probes). Data were analyzed with QuantaSoft Software 1.0 (Bio-Rad). VAF of the mutant allele was then calculated through a Poisson distribution model as the fraction of positive droplets divided by the total number of droplets containing a target. At least one sample previously known as wild type was used as a negative control in each PCR to establish the positivity threshold. Total fractional abundance of the mutation was calculated as follows:

$$\text{Total fractional abundance (\%)} = (\text{Number of mutant events} / (\text{Number of mutant events} + \text{Number of wt events})) * 100$$

Limit of detection of droplet digital PCR

Serial dilutions of mutant DNA in wt DNA were performed at levels of 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.05%, 0.025%, and 0.01% to determine the limit of detection of ddPCR. A *MYD88* L265P mutated sample (bone marrow mutation burden of 26.7%, and 34% of clonal B-cells), and a *CXCR4* S338* C1013G mutated sample (bone marrow mutation burden of 12.9%, and 7% of clonal B-cells) from two different WM patients were used. We ran two tests for each dilution experiment and calculated the merged mutation burden according to the binomial distribution. We were able to detect mutant DNA with good confidence up to 0.0259% in the case of *MYD88* L265P (supplementary table 2), and 0.0399% in the case of *CXCR4* S338* C1013G (supplementary table 3). ddPCR plots with high *MYD88* mutation burden and no detectable mutated droplets are shown supplementary figure 2a and 2b, respectively. Similarly, the plots with high *CXCR4* C1013G

mutation burden and no detectable mutated droplets are shown in supplementary figure 3a and 3b, respectively.

Flow cytometry analysis

The immunophenotypical characterization of BM samples was performed using 3-tubes combinations of 8-color panel of antibodies (supplementary table 1).

CD56, CD5, TCR- $\gamma\delta$, CD3, CD38, CD45, CD79b, CD43, CD45, FMC7, CD25, CD11c, CD22, CD8, and IgLambda (3rd tube) were purchased from BD Biosciences. CD19 and CD10 were purchased from Beckman Coulter. CD20 and CD4 were purchased from BioLegend. CD23 was purchased from Dako. CD200 was purchased from eBioscience. IgKappa-1 was purchased from Exbio. IgLambda and IgKappa (1st tube) were purchased from Cytognos.

Statistical analysis

Descriptive data

All data were evaluated previously by means of the Shapiro-Wilk and the Breusch-Pagan test to analyze distribution. Categorical data were analyzed by the Fisher exact test. Continuous data were analyzed by the Mann-Whitney U test. Pearson or Spearman correlation coefficients were calculated to compare mutation tumor burden with other continuous laboratory parameters (monoclonal protein size – [M-protein size], serum IgM levels, morphologic BM infiltration, and CD19+ BM infiltration). Cohen's κ was used to relate the proportion of observed agreements between two diagnostic tests (AS-PCR and ddPCR) when analyzing the presence or absence of a mutation.

Survival outcomes

Given the possibility that subjects could die before experiencing progression to symptomatic WM, the standard 1- Kaplan-Meier (failure function) approach would not have represented our data correctly. Therefore, to analyze *MYD88* and *CXCR4* tumor burden as risk factors in IgM MGUS and SWM, we fitted a competing risk framework (2,3). The primary endpoint was progression to symptomatic WM and the competing event was death without progression. Given our *a priori* intention of predicting a probability of occurrence of an outcome (progression to symptomatic WM), we used the subhazard ratio (SHR) rather than the cause-specific hazard ratio. Here, SHR are interpreted similarly to hazard ratios in Cox regression. The cumulative incidence function (CIF) was calculated using the Fine and Gray method. SHR states the relative change in the rate of occurrence of an event (progression to symptomatic WM) in subjects

who have not yet experienced the event, or who may have experienced a competing event (death before progression).

MYD88 and *CXCR4* tumor burden mutations assessed by ddPCR were analyzed by a two-step approach. The first consisted of utilizing tumor burden mutation analyzed as a continuous variable. The second step was to categorize this value in order to easily translate it into clinical practice. For the latter, we used X-tile. X-tile is a software that evaluates the association between a biomarker (i.e., gene expression) and survival outcomes, selecting the optimum cut-off point in the continuous variable. It provides multiple plots of every possible way of dividing a population into risk categories, based on standard statistical tests: log-rank test and X^2 values along with the p-values (4).

After dividing our population into subsets according to high or low mutation tumor burden (*MYD88* and *CXCR4*), we calculated the SHR for each diagnosis. Finally, encompassing both IgM MGUS and SWM into one set of patients, we developed a stratification risk based on *MYD88* and *CXCR4* cut-off points (supplementary figure 1).

REFERENCES

1. Greytak SR, Engel KB, Parpart-Li S, Murtaza M, Bronkhorst AJ, Pertile MD, et al. Harmonizing Cell-Free DNA Collection and Processing Practices through Evidence-Based Guidance. *Clin Cancer Res*. 2020 Jul 1;26(13):3104–9.
2. Fine JP, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association*. 1999 Jun;94(446):496–509.
3. Austin PC, Fine JP. Practical recommendations for reporting Fine-Gray model analyses for competing risk data. *Statistics in Medicine*. 2017 Nov 30;36(27):4391–400.
4. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-Tile: A New Bio-Informatics Tool for Biomarker Assessment and Outcome-Based Cut-Point Optimization. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 1;10(21):7252–9.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary table 1. Flow cytometry monoclonal antibodies used to analyze bone marrow involvement by lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia.

Tube	FITC	PE	PerCPCy5-5	PC7	APC	APC H7	V450	V500
1st	CD8+IgL	Cd56+IgK	CD5	CD19+TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38	CD20+CD4	CD45
2nd	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	CD20	CD45
3rd	FMC7	CD25	CD11c	CD19	CD22	IgL	IgK	CD45

Supplementary table 2. Serial dilutions in a mutated *MYD88* L265P sample from a WM patient with a bone marrow B-cell clonality of 34% determined by flow cytometry.

MYD88 L265P mutated sample (Mmut): mutation burden 26.7%						
MYD88 L265P wild type sample (Mwt): mutation burden 0%						
Serial dilution	DNA concentration (ng/uL)	Volume (uL)				MYD88 mutation burden (%)
dil 10%	25	20	7.49	sol Mmut	sol 10%	7.950
			12.51	sol Mwt		
dil 5%	25	20	10	sol 10%	sol 5 %	4.110
			10	sol Mwt		
dil 1%	25	20	4	sol 5%	sol 1%	0.688
			16	sol Mwt		
dil 0.5%	25	20	10	sol 1%	sol 0.5%	0.420
			10	sol Mwt		
dil 0.25%	25	20	10	sol 0.5%	sol 0.25%	0.232
			10	sol Mwt		
dil 0.1%	25	20	4	sol 0.5%	sol 0.1%	0.0963
			16	sol Mwt		
dil 0.05%	25	20	10	sol 0.1%	sol 0.05%	0.0508
			10	sol Mwt		
dil 0.025%	25	20	10	sol 0.05%	sol 0.025%	0.0259
			10	sol Mwt		
dil 0.01%	25	20	4	sol 0.05%	sol 0.01%	No mutated droplets
			16	sol Mwt		

Supplementary table 3. Serial dilutions in a mutated *CXCR4* S338* C1013G sample from a WM patient with a bone marrow B-cell clonality of 7% determined by flow cytometry.

CXCR4 S338* C1013G mutated sample (Mmut): mutation burden 12.9%						
CXCR4 S338* C1013G wild type sample (Mwt): mutation burden 0%						
Serial dilution	DNA concentration (ng/uL)	Volume (uL)				CXCR4 mutation burden (%)
dil 10%	7	40	31.01	sol Mmut	sol 10%	9.820
			8.99	sol Mwt		
dil 5%	7	40	20	sol 10%	sol 5 %	5.150
			20	sol Mwt		
dil 1%	7	40	8	sol 5%	sol 1%	1.080
			32	sol Mwt		
dil 0.5%	7	40	20	sol 1%	sol 0.5%	0.651
			20	sol Mwt		
dil 0.25%	7	40	20	sol 0.5%	sol 0.25%	0.208
			20	sol Mwt		
dil 0.1%	7	40	8	sol 0.5%	sol 0.1%	0.0708
			32	sol Mwt		
dil 0.05%	7	40	20	sol 0.1%	sol 0.05%	0.057
			20	sol Mwt		
dil 0.025%	7	40	20	sol 0.05%	sol 0.025%	0.0399
			20	sol Mwt		
dil 0.01%	7	40	8	sol 0.05%	sol 0.01%	No mutated droplets
			32	sol Mwt		

Supplementary table 4. Univariate regression analysis in a competing risk framework. Here, *MYD88* and *CXCR4* mutation tumor burden were analyzed as continuous variables. MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance; SWM: smoldering Waldenström macroglobulinemia; SHR: sub hazard ratio; CI: confidence interval.

<i>MYD88</i>	SHR	95% CI	p-value
IgM MGUS	1.18	1.04 – 1.36	0.012
SWM	1.04	1.01 – 1.08	0.040
<i>CXCR4</i>	SHR	95% CI	p-value
IgM MGUS	1.79	1.33 – 2.41	<0.001
SWM	1.02	0.98 – 1.04	0.065

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary figure 1. Analysis methodology.

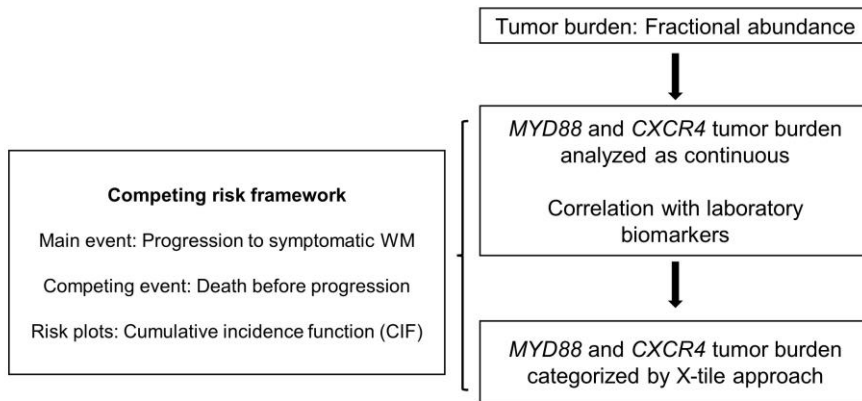
Supplementary figure 2. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) plots in samples tested for *MYD88* L265P mutation. **a.** Sample with high *MYD88* mutation burden. **b.** Sample with a *MYD88* wild type control.

Supplementary figure 3. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) plots in samples tested for *CXCR4* S338* C1013G mutation. **a.** Sample with high *CXCR4* mutation burden. **b.** Sample with a *CXCR4* wild type control.

Supplementary figure 4. Baseline survival trends in patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering Waldenström macroglobulinemia (SWM). **a.** Cumulative incidence of progression in patients with IgM MGUS. **b.** Cumulative incidence of progression in patients with SWM. **c.** Overall survival in all patients with either IgM MGUS or SWM.

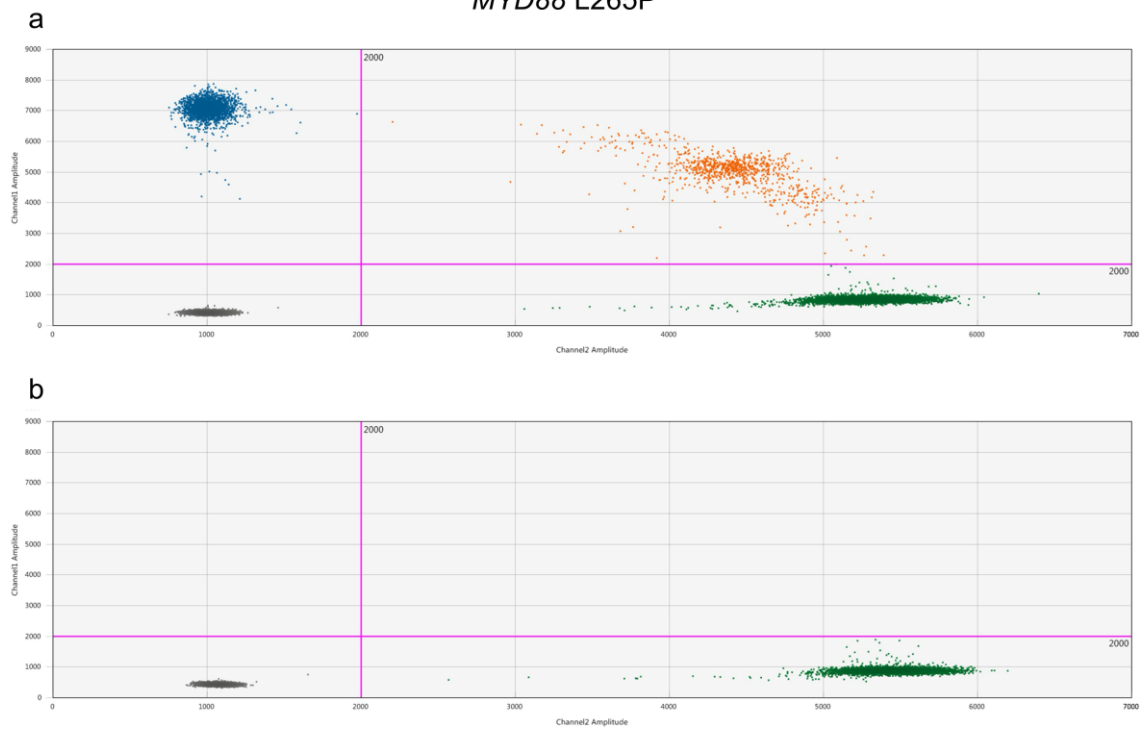
Supplementary figure 5. Cumulative incidence of progression by bone marrow *MYD88* L265P mutation burden according to each diagnosis. **a.** Cumulative incidence of progression in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) with a 4% cut-off point of *MYD88* mutation burden. **b.** Cumulative incidence of progression in smoldering Waldenström (SWM) macroglobulinemia with a 25% cut-off point of *MYD88* mutation burden.

Supplementary figure 1



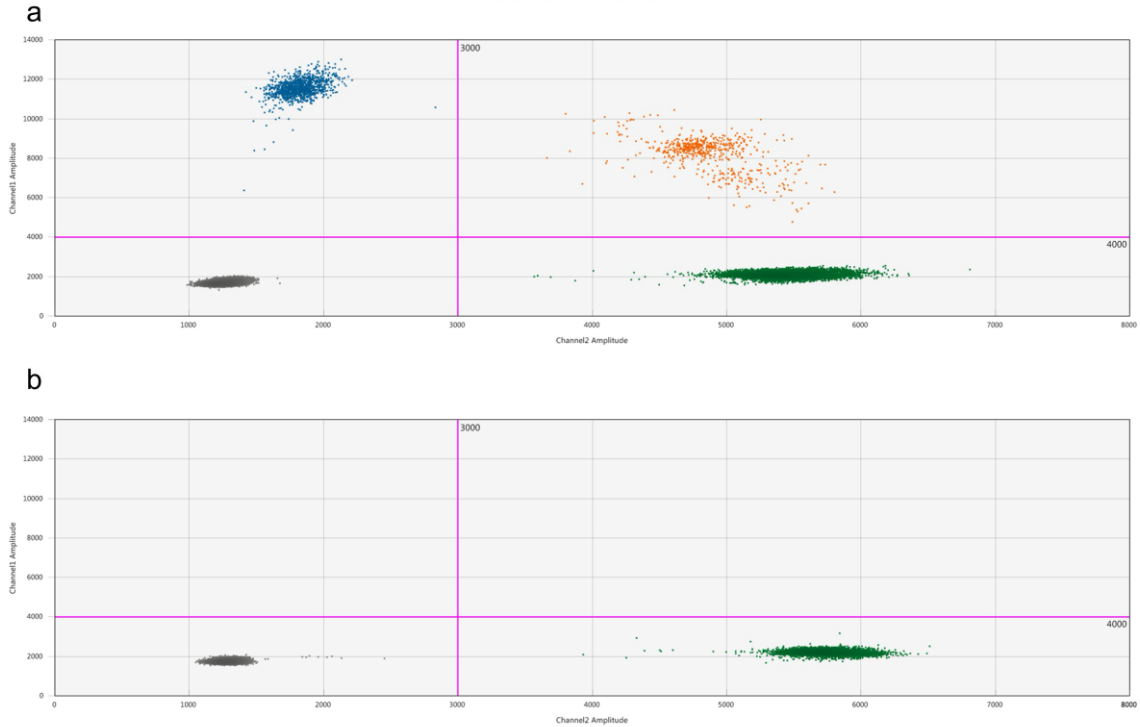
Supplementary figure 2

MYD88 L265P

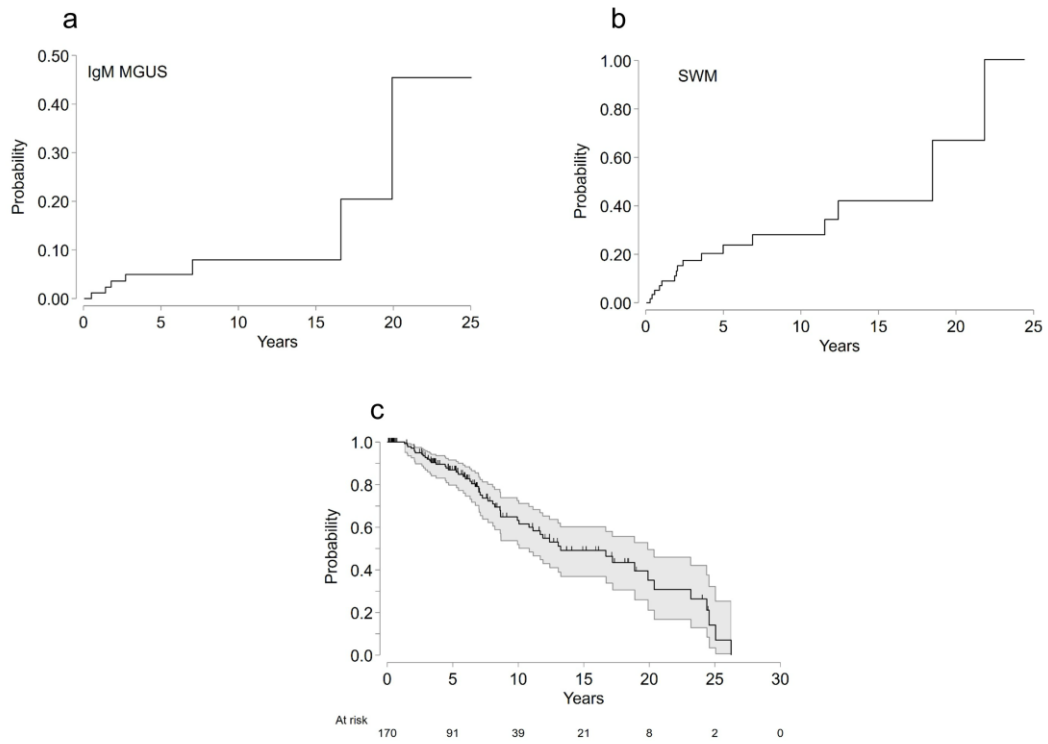


Supplementary figure 3

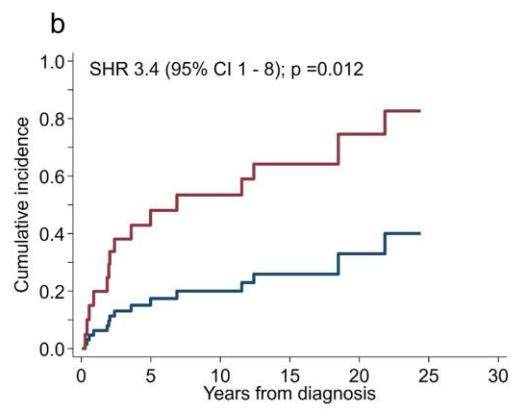
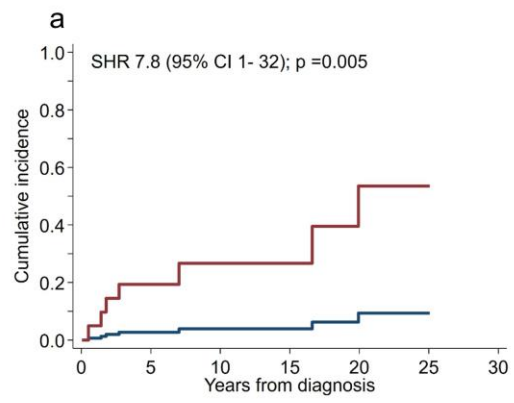
CXCR4 S338* c.1013C>G



Supplementary figure 4



Supplementary figure 5



Trabajo 3

Pronóstico y supervivencia de la gammapatía monoclonal IgM asintomática: resultados de un registro multicéntrico español

La gammapatía de significado incierto (GMSI) IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente (MWQ) tienen un riesgo de progresión a una neoplasia linfoproliferativa. Se han desarrollado modelos que estratifican el riesgo en estos pacientes en los últimos 20 años; sin embargo, la baja incidencia de la enfermedad y la presentación clínica heterogénea generan dificultades aún existentes. Es por ello por lo que hay una necesidad de usar datos procedentes de múltiples centros, con el objetivo de aumentar la reproducibilidad de los modelos pronósticos.

El objetivo de este estudio fue modelar el riesgo pronóstico de pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas, usando datos clínicos procedentes de 25 centros hospitalarios de España e incorporando nuevos biomarcadores. Se analizó también la supervivencia relativa, comparando con una serie de pacientes con macroglobulinemia de Waldenström sintomática (MWS).

Se recolectó información procedente de 1035 pacientes (605 GMSI IgM y 430 MWQ). La mutación de *MYD88* L265P estuvo disponible en 472 pacientes, siendo positiva en el 50,5% y 81,2% de pacientes con GMSI IgM y MWQ, respectivamente. Después de un seguimiento de 5962 personas-año, se detectaron 148 progresiones, la mayoría a MWS. La tasa de incidencia de progresión de pacientes con GMSI IgM fue del 1,1% por año, y del 4,4% por año en pacientes con MWQ. Se evaluó la capacidad predictiva de progresión de 3 modelos pronóstico tomando en cuenta el conjunto de pacientes con gammapatías IgM asintomáticas (grupo italiano, grupo Dana Farber, y grupo de Barcelona), mostrando todos una capacidad predictiva similar. De cara a generar un modelo parsimonioso y fácil de usar, la categorización de variables siguió un método iterativo para encontrar el mejor punto de corte. Con ello, se obtuvo que

los valores de IgM sérica por encima de 10 g/L, el infiltrado medular superior al 20%, la β 2-microglobulina superior a 3 mg/dL y la albúmina sérica inferior a 4 g/dL eran predictores potentes usando dos modelos multivariantes de Cox. Tras añadir 1 punto a cada predictor, se construyó un modelo con 3 riesgos denominado "10-20-3-4". El riesgo a 5 años para los de bajo, intermedio y alto riesgo fue del 4,5%, 15,6% y 42,6%, respectivamente. Se identificó también un subgrupo de muy bajo riesgo caracterizado por la presencia de una IgM sérica inferior a 5 g/L y un infiltrado medular inferior al 10%, obteniendo una incidencia acumulada de progresión del 2,8% a 5 años. La presencia de *MYD88* L265P estuvo asociada con una peor supervivencia libre de progresión solo en pacientes con MWQ, mientras que la inmunoparesia de IgA e IgG fueron potenciales predictores tras un seguimiento longitudinal (diagnóstico y progresión), con diferencias significativas en ambos isotipos. La supervivencia relativa a 5 años del global de pacientes con gammopatías IgM asintomáticas fue similar al de la población control en España, contrastando con una supervivencia relativa de 0,76 a 5 años en pacientes con MWS.

Por tanto, este estudio modeló el pronóstico en la serie más grande de pacientes con GMSI IgM y MWQ descrita hasta ahora, usando biomarcadores comunes a todos los modelos previos. La presencia de la mutación de *MYD88* es un factor pronóstico con impacto negativo solo en los pacientes con MWQ. La inmunoparesia de isotipo IgG e IgA son potenciales predictores, especialmente tras un seguimiento longitudinal.

ORIGINAL ARTICLE

Prognostic Risk and Survival of Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy: Results from a Spanish Multicenter Registry

David F. Moreno¹, Cristina Jiménez², Fernando Escalante³, Elham Askari⁴, Marta Castellanos Alonso³, Mario Arnao⁵, Ángela Heredia⁶, Miguel Ángel Canales⁷, Magdalena Alcalá⁸, Arancha Bermúdez⁹, Ana Saus Carreres¹⁰, María Casanova¹¹, Luis Palomera¹², Cristina Motlló¹³, Ricarda García-Sánchez¹⁴, Pablo Ríos Rull¹⁵, Ramón García Sanz^{2*} and Carlos Fernández de Larrea^{1*}

1. Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Institut de Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona
2. Hematology Department, University Hospital of Salamanca, Research Biomedical Institute of Salamanca (IBSAL), Accelerator project, Centro de Investigación Biomédica en Red-Cáncer (CIBERONC) CB16/12/00369 and Center for Cancer Research - IBMCC (USAL - CSIC), Salamanca
3. Hematology Department, Unidad i+i, Complejo Asistencial Universitario de León, León
4. Hematology Department, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid
5. Hematology Department, Hospital La Fe, Centro de Investigación Biomédica en Red-Cáncer (CIBERONC), Valencia
6. Hematology Department, Hospital Virgen de la Arrixaca, IMIB, Murcia

7. Hematology Department, Clínica Universidad de Navarra, Centro de Investigación Biomédica en Red-Cáncer (CIBERONC), Pamplona
8. Hematology Department, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga
9. Hematology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Santander
10. Hematology Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia
11. Hematology Department, Hospital Costa del Sol Marbella, Marbella
12. Hematology Department, Hospital Clínico Lozano Blesa, Zaragoza
13. Hematology Department, Hospital Sant Joan de Déu - Fundació Althaia, Manresa
14. Hematology Department, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga
15. Hematology Department, Hospital Nuestra Señora de la Candelaria, Canarias

*Corresponding authors:

Ramón García Sanz (rgarcias@usal.es), Hematology Department, University Hospital of Salamanca, Paseo de San Vicente 182, 37007 Salamanca, Spain

Carlos Fernández de Larrea (cfernan1@clinic.cat), Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

Key words: IgM gammopathy, MGUS, Waldenström, macroglobulinemia, prognosis

Running title: Prognosis and survival of asymptomatic IgM gammopathy

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Word count: 3417

ABSTRACT

Asymptomatic IgM gammopathy encompasses IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and asymptomatic Waldenström macroglobulinemia (AWM), each with a potential risk of progression to symptomatic disease. Here, we assessed the risk of progression and the mortality of 1035 (605 IgM MGUS, 430 AWM) asymptomatic IgM gammopathy patients across 25 Spanish centers. After a follow-up of 5962 persons-year, 148 patients progressed. The incidence rate of progression was 3% during the first 5 years. Serum IgM >10 g/L, bone marrow infiltration >20%, β 2-microglobulin >3 mg/L, and albumin <4 g/dL were the most potent predictors of disease progression in two multivariate Cox regression models and allowed the identification of three risk categories. The probability of progression to symptomatic disease at 5 years was 4.5%, 15.6%, and 42.6% for low-, intermediate-, and high-risk groups, respectively. The relative survival (RS) ratio at 5 years of asymptomatic patients was similar to the Spanish population, which contrasted with the 0.76 5-year RS of patients with WM. Overall, we developed the Spanish Multicenter Model that comprehensively describes the risk of progression of asymptomatic patients and showed that the excess mortality is increased only in the symptomatic stage of the disease.

Word count: 192

INTRODUCTION

The association of a monoclonal immunoglobulin M (IgM) in serum with diverse lymphoproliferative disorders has been extensively reported, being IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and Waldenström macroglobulinemia (WM) the two most well characterized. The prevalence of IgM MGUS increases with age and could eventually progress to a B cell or plasma cell malignancy¹. The spectrum of disease progression includes predominantly WM, followed by diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), AL amyloidosis, chronic lymphocytic leukemia (CLL), multiple myeloma (MM), among others^{2,3}. Meanwhile, WM is a B-cell lymphoplasmacytic lymphoma that is most of the time preceded by IgM MGUS. This relationship has long been studied, as both share the same cell-of-origin in terms of morphological, immunophenotypic and genomic features⁴⁻⁷. In this sense, there has been great interest to model disease progression for both IgM MGUS and asymptomatic WM (AWM). In fact, the study with the largest number of patients (439) with asymptomatic IgM gammopathy (IgM MGUS and AWM) showed that the progression rate was 30.8% at 2 years⁸.

During the last 20 years, different prognostic risk models have included data from routine practice^{2,3,8-10}, and genomic information such as the *MYD88* and *CXCR4* mutation status¹¹⁻¹³. However, there are still challenges because of the low incidence¹⁴ and the clinical heterogeneity of disease progression. Thus, a need to collect and report data from multicenter registries are highly beneficial.

Herein, we gathered the largest number of patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathies from 25 Spanish hospitals to elucidate the prognosis in terms of progression risk and survival trends. We retrospectively analyzed a

cohort of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy patients, validated previous risk models, and proposed a revised, comprehensive, and easily applicable model to the clinic. We also showed how different are the mortality outcomes of these patients compared to a group of patients with symptomatic WM.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This is a retrospective and multicenter study from 25 hospitals from the Programa de Registro de Macroglobulinemia de Waldenström en España (PRAME). For the purpose of this study, we included patients diagnosed with asymptomatic IgM gammopathy (encompassing both IgM MGUS and AWM) as the main group of interest, while patients with symptomatic WM served as controls for the analysis of the excess mortality. The date of first entry was August 1979, and the latest was June 2023. The diagnostic criteria followed local institutional protocols of each center and included the Mayo Clinic^{15,16} and the International Consensus criteria^{17,18}. The *MYD88* L265P mutation was assessed using either allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) or droplet digital PCR (ddPCR) on whole bone marrow cells. Treatment initiation followed the criteria from the International Consensus, and this was used to define symptomatic WM patients¹⁹. Patients who required treatment because of IgM related disorders or IgM monoclonal gammopathy of clinical significance were excluded. The study was approved by the local institutional review boards from all the centers involved. More details can be found in the Supplementary Material.

Data collection and end points

Clinical and laboratory information was collected from individual registries and consisted of serum IgM/IgG/IgA levels, serum monoclonal protein (M-protein), isotype of light chain, bone marrow (BM) infiltration either by aspirate or biopsy, *MYD88* L265P mutation, serum albumin, β 2-microglobulin, lactate dehydrogenase (LDH), blood counts (red blood cell, lymphocyte, and platelet counts), creatinine, and calcium. Immunoparesis was defined as a reduction below the normal range in the serum IgG (less than 6 g/L) and/or IgA (less than 0.6 g/L)^{10,16,20}. Quantitative assessment of variables at the time of progression was available in patients who presented progression during follow up. Progression free survival (PFS) was defined as the time from diagnosis to the time of disease progression that required treatment.

Statistical analyses

The *r* Pearson test was used to analyze the correlation between the serum IgM and the BM infiltration. The Gönen and Heller k-statistic was used to evaluate the performance of risk models that were designed specifically for both IgM MGUS and AWM patients, including the one reported by the Italian group in 2005⁹, the Dana Farber Cancer Institute (DFCI) in 2019⁸, and the Barcelona group in 2021¹⁰. The log-rank test was used to calculate the significance of the difference between survival curves. We considered death before progression as competing event.

To analyze the predictors in our series, we iteratively calculated the hazard ratios (HRs) and the C-index using a Cox proportional hazards regression for each

potential cut-off in the case of serum IgM, BM infiltration, serum albumin, and β 2-microglobulin. This approach facilitated the finding of the best cut-off points that discriminated well the risk of progression, as previously reported²¹. To find the best predictors, we used both a backward stepwise Cox regression, and a least absolute shrinkage and selection operator (lasso) – Cox method²². In the multivariate stepwise Cox regression, the p-value used for inclusion of biomarkers was 0.10. It was followed by bootstrap with 1000 replications. The lasso-Cox model selected the predictors based on a lambda value calculated by 10-fold cross validation. With this, we built a single framework of variables, and we assigned one point for each biomarker in a parsimonious and comprehensive way. We then visually inspected the observed and predicted survival probabilities for each point to cluster and generate risk groups. The Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to analyze the differences between the predictors as continuous at diagnosis and at disease progression. Logistic regression was used to assess the receiver operating characteristic (ROC) between risk models to discriminate disease progression at 5 and 10 years.

To analyze the relative survival (RS) in our cohort, we leveraged data from the Human Mortality Database and matched the Spanish population in terms of year, age and sex, with a cut-off date in 2020. The Ederer II method was used to analyze the RS rates²³, that is detailed in the Supplementary Material. Poisson regression was used to analyze the excess mortality according to each diagnosis. All the analyses were performed in Stata version 18 (College Station, TX: StataCorp LLC).

RESULTS

Patients' characteristics

The clinical and laboratory characteristics of patients are summarized in Table 1. In total, we identified 1035 patients with asymptomatic IgM gammopathy (605 IgM MGUS and 430 AWM); 74% of patients had a kappa light chain isotype by immunofixation, and the median serum M-protein and serum IgM was 8.4 g/L and 7.0 g/L, respectively. The BM aspirate was available in 620 (59.9%) patients, being the median lymphocyte and plasma cells infiltration of 14% and 2%, respectively. The *MYD88* L265P analysis was available in 472 (45.6%) patients, being positive in 68.4% of the entire cohort (50.5% IgM MGUS and 81.2% AWM, Supplementary Table 1).

The total serum IgM was correlated with the BM lymphocytic infiltration (N=609, $r=0.35$, $p<0.001$) and the plasma cell compartment (N=581, $r=0.16$, $p<0.001$). According to the decade of diagnosis, 71 (6.8%), 185 (17.9%), and 779 (75.3%) patients were diagnosed before the year 2000, between 2000 and 2010, and after the year 2010, respectively.

Disease progression

One thousand and thirty-five patients who were evaluable for survival analysis have been followed for 5962 person-year (median follow up of 5 years, interquartile range [IQR] 2.2 – 9.2). Among them, 148 (37 IgM MGUS and 111 AWM) patients progressed to a lymphoproliferative/plasma cell disorder that required treatment. During the first 5 years of follow-up, the incidence rate (IR) of progression was 3.0% (95% confidence interval [CI] 2.4 – 3.5). The cumulative probability of progression was 13.3% (95% CI 11.1 – 16.0) and 20.0% (95% CI

16.5 – 23.2) at 5 and 10 years, respectively (Fig. 1A). IgM MGUS had an IR of 1.1% per year (CI 0.8 – 1.5) and AWM had an IR of 4.4% per year (CI 3.7 – 5.3). Regarding the documented type of progression, 140 patients progressed to WM; other entities included DLBCL (4 cases), IgM AL amyloidosis (2 cases), CLL and follicular lymphoma (1 case each one). No differences in PFS were observed between the decades of diagnosis (log-rank $p=0.369$, Supplementary figure 1).

We then analyzed the performance in our series of three prognostic models that took into account patients diagnosed with asymptomatic IgM gammopathy. First, the risk model proposed by the Italian group considering the M-protein size (< 7.0, 7.0 – 13.9, 14.0 – 20.9, ≥ 21 g/L), hemoglobin (≥ 15.0 , 13 – 14.9, 11.0 – 12.9, < 11.0 g/dL) and sex (female as low risk)⁹. The Gönen and Heller k-statistic was 0.65 (N=750), and the probability of progression at 5 years in our series was 5%, 12%, and 24% for low-, intermediate-, and high-risk, respectively ($p<0.001$) (Fig. 1B). Secondly, we evaluated the model proposed by the DFCI, considering serum IgM, BM infiltration rate, β_2 -microglobulin, and albumin. In this model, the risk was categorized according to the quartile distribution of the predicted HR generating three groups⁸. The Gönen and Heller k-statistic was 0.66 (N=496), and the probability of progression at 5 years was 3%, 10%, and 40% for low-, intermediate-, and high-risk, respectively ($p<0.001$) (Fig. 1C). More recently, the Barcelona group developed a two-risk model considering immunoparesis and a BM infiltration cut-off point of 20%¹⁰. Here, the Gönen and Heller k-statistic was 0.66 (N=626), and the probability of progression at 5 years was 6% and 25% for low- and high-risk, respectively (Fig. 1D).

Considering that the categorization of variables is dependent on many factors such as the center-specific protocol for patient follow-up or how each variable

was measured, we aimed to investigate whether there were any other potential risk factors that could help to improve the aforementioned models. To do that, we first analyzed the impact on progression of the four predictors for which cut-off points were difficult to establish. For these variables, we iteratively calculated the predicted HR and the Harrell's C-index for each value.

Accordingly, the best cut-off points were a serum IgM between 10 to 15 g/L, a BM infiltration rate of 20%, a β 2-microglobulin between 2.5 to 3 mg/L, and an albumin between 4 to 4.5 g/dL (Supplementary figure 2). The cumulative incidence of progression at 5 years was 24% for IgM >10g/L, 27% for bone marrow infiltration >20%, 27% for β 2-microglobulin >3 mg/L and 23% for serum albumin <4 g/dL, and (Fig. 2A-D). We then analyzed whether the *MYD88* L265P mutation negatively impacted on the risk of progression. In patients who had the analysis available (N=472), the *MYD88* L265P mutation was associated with a short PFS (HR 3.5, CI 1.7 – 7.1, $p < 0.001$) as graphically seen in Supplementary Figure 3, although the differences were only significant in AWM (HR 2.3, CI 1.0 – 5.0, $p = 0.039$) but not in IgM MGUS (HR 2.9, CI 0.6 – 14.0, $p = 0.184$).

Subsequently, we analyzed the impact of common risk factors from previous risk models. Here, we did not consider *MYD88* because less than half of the study population were diagnosed before universal the set-up of the technique, neither sex (male vs. female, HR 0.9, CI 0.7 – 1.3, $p = 0.629$) or age (≥ 65 vs. < 65 , HR 0.9, CI 0.7 – 1.4, $p = 0.989$) because of their lack of impact in disease progression. Table 2 summarizes the univariate analysis of each biomarker on a Cox proportional hazards model. We then used two methods to select the most potent predictors that were commonly present in both. The backward stepwise method selected serum IgM >10 g/L, BM infiltration >20%, β 2-microglobulin >3 mg/L, and

albumin <4 g/dL. The 1000-bootstrap replicates of this model showed comparable findings with a $p < 0.10$ selection cut-off. Similarly, the lasso-Cox with 10-fold cross-validation selected the previously four biomarkers along with reduction of IgA (Supplementary Table 2). In order to build a parsimonious and easy-to-use model, we assigned one point to each biomarker and clustered the patients based on the observed and predicted HRs (Supplementary figure 4). Consequently, patients with either no points or 1 point were categorized as being in the low-risk group, whereas those with two points or three to four points were classified into the intermediate and high-risk groups, respectively (Fig. 2E). The 5-year probability of progression was 4.5%, 15.6%, and 42.6% in the low-, intermediate-, and high-risk groups (log-rank $p < 0.001$). The Gonen and Heller k-statistic of this model was 0.72 (N=507). With this, we developed a model that can be easily abbreviated as the “10-20-3-4” related to numbers from the cut-off values for each biomarker. After fitting a logistic regression model to evaluate the discrimination between the DFCI model vs. ours, we observed that the ROC area was 0.57 vs. 0.60 ($p=0.090$) and 0.53 vs. 0.60 ($p=0.014$) at 5 and 10 years, respectively.

Refining the low risk

Given that there is also great interest to identify patients who will not progress during the entire follow-up, we reanalyzed the whole set of patients and plotted the distribution of the two most important risk factors (serum IgM and BM infiltration) across the low-, intermediate-, and high-risk of progression groups to discriminate a new subgroup of patients with very low tumor burden characterized by a serum IgM less than 5 g/L and a BM infiltration less than 10%

(Supplementary figure 5A-B). After graphical inspection of the entire series of patients, 290 patients had a serum IgM less than 5 g/L and a BM infiltration less than 10%. These patients were followed for a median of 4.5 years (IQR 2.0 – 8.0) and had an even lower probability of progression compared to the low-risk group above mentioned. The cumulative incidence of progression was 2.8% (95% CI 1.1 – 6.7) at 5 years (Fig. 3).

Predictors during progression

For patients who experienced progression, we had access to information about various potential biomarkers and observed how they changed over time. In this sense, we analyzed the 4 predictors from the model along with serum IgA and IgG levels (immunoparesis), considering these last two by its potential to predict progression in the univariate analysis. Each individual subject was analyzed in two time points showing an increase in IgM, β 2-microglobulin, and BM infiltration, meanwhile a decrease was seen in the case of albumin, IgA and IgG (Fig. 4A-F).

Mortality trends

Two hundred and forty-seven patients died during follow-up. Among them, 127 (51.5%) died because of solid neoplasms, 30 (12.1%) from age-related comorbidities, 23 (9.3%) from disease progression or complications related to the treatment received, and 67 (27.1%) were missing. Compared to the remaining healthy Spanish population, asymptomatic patients had a 5-year, 10-year, 15-year, and 20-year RS rates of 0.99, 0.97, 0.90, and 0.86, respectively (table 3). So, during the first 5 to 10 years from diagnosis the mortality remained similar to

the Spanish population in asymptomatic patients ($p=0.940$) (Fig. 5A). No differences were observed according to the diagnosis (Supplementary Table 3). To give more insights into the survival trends of patients with IgM gammopathy, we gathered data from a cohort of 448 patients with symptomatic WM from our registry. We identified 227 deaths, from whom 61 (26.9%) were directly linked to the disease either because of progression or treatment complications, another 61 (26.9%) deaths were because of concomitant solid neoplasms, 22 (9.7%) because of other age-related comorbidities, and 83 (36.5%) were missing. The RS rates at 5-year, 10-year, 15-year, and 20-year were 0.76, 0.66, 0.44, and 0.36, respectively (Fig. 5B). Thus, symptomatic WM exhibited a higher excess mortality compared to the Spanish population in each timespan ($p<0.001$). Overall, patients with IgM gammopathy showed a trend to worse survival trends in the symptomatic stage.

DISCUSSION

We have assembled a large cohort of patients diagnosed with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy in Spain, allowing us to describe its natural history. Current guidelines on how to follow patients with asymptomatic IgM gammopathy are limited. Many factors influence the challenges to uniformly establish a strategy in IgM monoclonal gammopathy, such as the low incidence, the highly dependence on single-center registries, the arbitrary inclusion of biomarkers in multivariate analyses, and the difficulty of assessing the risk in patients with low tumor burden. To surpass these problems, we have gathered data from 25 different centers and were able to model the risk of progression precisely. In fact, we were able to include 507 patients in multivariate analyses with complete data

using all previous biomarkers that have proved to impact in disease progression; the largest reported to our knowledge. We first observed that the cumulative incidence of progression from our series was lower compared the proposed by the DFCI⁸. Although several explanations can arise underlying this phenomenon, we consider that the inclusion of more patients with low tumor burden in our series as the most important argument. The DFCI series reported a minority of patients with low tumor burden (for instance, those with less than 10% of BM infiltration) while in our study they represented half of the entire series. Other intrinsic epidemiological or healthcare system differences between countries can also explain the different risk of progression; however, they are beyond the scope of this study.

We validated previous risk models that took into account asymptomatic IgM gammopathy patients. We showed that all three models classified patients into separated risk categories; however, there was great variation between intermediate and low-risk groups, probably due to the low number of patients with less tumor burden that were included in each study. Another important issue was related to the inclusion of predictors, as they varied across all three studies or were not reported in multivariate analyses. As a result, we improved the accuracy of the risk classification by incorporating all previous biomarkers. We proposed the “10-20-3-4” Spanish Multicenter Model, a new and easy to handle model that showed common variables such as a 10 g/L of serum IgM, a 20% of BM infiltration, 3 mg/L of β 2-microglobulin, and 4 g/dL of albumin. Moreover, we identified a very low risk group characterized by having a serum IgM less than 5 g/L and a BM infiltration less than 10%. In fact, patients with less than 10% of BM infiltration reported either by the DFCI or our study had a similar trend of disease

progression⁸. Although a limitation from our study is related to the availability of predictors for further analyses, the high number of patients from different centers included in the multivariate analyses overtakes this issue. Another is the shorter follow-up time compared to others^{3,8,9}, explained by the large proportion of patients diagnosed in the last decade, especially for IgM MGUS. However, we showed similar IRs in this subgroup of patients compared to studies with longer follow-up³. Overall, our results can help to decide the follow-up of patients, as some of them can confidently be followed by primary care centers, with social and economic impact. We also reinforce the idea that all patients cataloged as asymptomatic (either with low or high tumor burden) need to be included in risk models to increase sensitivity.

The proposed biomarkers also behaved as expected when evaluated at the time of progression. To note, we highlighted that the reduction of serum IgA proposed in the model from the Barcelona group¹⁰ performed well in the univariate analysis, showing a continue trend of reduction throughout time. Thus, we suggest that the levels of IgG or IgA can be potential parameters to follow in the daily clinical practice, which has been also evaluated as prognostic markers in other monoclonal gammopathies^{20,24–26}.

Another novelty from our study was to include the largest series of asymptomatic patients from whom the analysis of the *MYD88* mutation was available. We observed that there was a negative impact in AWM patients, a finding that has been reported previously¹³. However, our results differed from other study that showed a negative impact in *MYD88* wild type patients⁸. This is probably due to technical differences. As a retrospective multicenter study, sample processing might differ from each center, or it changed throughout time. For instance, the

sensitivity of the PCR to detect *MYD88* L265P has changed up to levels higher than conventional target NGS analyses. In fact, we used either AS-PCR or ddPCR to detect the mutation. Regardless of the sensitivity, our results resembled more the biological continuum of progression in patients with IgM gammopathy, as the *MYD88* mutation has recently been even identified in early precursors of lymphoplasmacytic clones⁷, followed by an increased mutation tumor burden in each state of the disease^{5,13}. Still, some patients were diagnosed before the *MYD88* analysis was set up in the clinic or were available only for those who underwent a BM evaluation; thus, we did not include the mutation status in the multivariate models to increase power. As stated by others^{11,13,27}, the data from our study can serve as another attempt to model disease progression based on molecular biomarkers in IgM monoclonal gammopathy. Efforts to standardize the *MYD88* testing and longer follow-up can be further exploited to precisely and uniformly assess the risk of progression based on the *MYD88* L265P status.

We also analyzed the mortality of asymptomatic IgM gammopathy. Previous studies have focused the analysis on the diagnosis of lymphoplasmacytic lymphoma or WM without the distinction of those who required treatment or not. In fact, a 5-year RS was reported to be between 0.6 to 0.8 with an improving trend for each decade²⁸, and another recent population-based study reported a 5-year conditional RS of 84% in WM patients²⁹. We observed that the RS rate of asymptomatic patients resembled that from the rest of the Spanish population during the first 5 to 10 years from diagnosis, being the presence of solid neoplasms the most frequent cause of death. We acknowledge that asymptomatic patients can benefit from early access to the healthcare system

and, in some cases, the long time that takes to develop disease progression as potential causes for our findings³⁰. When compared to a cohort of symptomatic WM from our registry, the differences were much more marked showing an excess of mortality in patients who were diagnosed in the symptomatic stage, whose most frequent cause of death was disease progression or treatment complications.

In summary, we reported a comprehensive analysis of patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy, showing that multicenter national cohort studies can better elucidate the natural history of these patients, so far needed. We also proposed a portable model that can be easily translated into the clinic.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the Emili Letang Grant from Hospital Clínic de Barcelona, the Spanish Society of Hematology and Hemotherapy (Amanda López, María Molina, and Teresa Pérez) for the support to carry out a multicenter registry in Spain, and all the people involved that participated in this study: Isabel García Cabrera (Hospital San Cecilio, Granada), Eugenia Abella (Hospital del Mar, Barcelona), Joan Bargay (Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca), Paz Ribas (Hospital Dr. Peset, Valencia), María Belén Navarro (Hospital Puerta de Hierro, Madrid), Mercedes Gironella (Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona), Miguel Ángel Álvarez (Hospital Reina Sofía, Córdoba), Antonio García Guiñón (Hospital Arnau de Vilanova, Lleida), Laura Abril Sabater (Instituto Catalán de Oncología, Badalona), and María Jesús Blanchard (Hospital Ramón y Cajal, Madrid).

FUNDING INFORMATION

The Spanish Society of Hematology and Hemotherapy received an unrestricted grant from Janssen to support the registry that provided the data for this study.

AUTHORSHIP

Contributions: D.F.M, C.J., E.A., R.G.S., and C.F.L designed the research, wrote the manuscript, and analyzed the data. D.F.M., C.J., E.A., M.C.A., R.G.S., F.E.B, M.Ao., A.H., M.A.C., M.A., A.B., A.S.C., M.C., L.P., C.M., R.G.Sa. P.R.R., and C.F.L. collected the information, reviewed the clinical histories, and wrote the manuscript. All authors revised the article and gave approval of the final version to be published.

Conflicts of interest: D.F.M. received travel grants and honoraria from Janssen. C.F.L. consulted and received honoraria from GSK, Sanofi, Pfizer, BeiGene, Amgen, BMS, Janssen; received research funding from GSK, Amgen, and Janssen. M.Ao. consulted and was on the speakers bureau for Janssen, Sanofi, and Amgen, and consulted for BMS/Celgene. A.H. was on the speakers bureau for Janssen and NovoNordisk. R.G.Sa. was on the speakers bureau and consulted for BMS/Celgene, Janssen-Cilag and GSK; consulted for Amgen and Takeda; and was on the advisory board member for Janssen-Cilag, BMS/Celgene, Amgen, GSK, Takeda and Beigene. P.R.R. consulted, received honoraria and was on the speakers bureau for GSK, AMGEN and Sanofi; received honoraria from Celgene, and Takeda; consulted for Beigene; has

participated in medical meetings for GSK, Janssen, Celgene, Takeda, Amgen, Novartis and Sanofi; and received research funding from BMS/Celgene.

FOOTNOTES

This study was presented as an oral presentation in the 64th annual meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, LA, 10 December 2022.

REFERENCES

- 1 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR *et al.* Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2006; **354**: 1362–1369.
- 2 Kyle RA, Benson JT, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S *et al.* Progression in smoldering Waldenström macroglobulinemia: long-term results. *Blood* 2012; **119**: 4462–4466.
- 3 Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR *et al.* Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2018; **378**: 241–249.
- 4 Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y *et al.* MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012; **367**: 826–833.
- 5 Xu L, Hunter ZR, Tsakmaklis N, Cao Y, Yang G, Chen J *et al.* Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2016; **172**: 735–744.
- 6 Paiva B, Corchete LA, Vidriales M-B, García-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I *et al.* The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2015; **125**: 2370–2380.
- 7 Rodriguez S, Celay J, Goicoechea I, Jimenez C, Botta C, Garcia-Barchino M-J *et al.* Preneoplastic somatic mutations including MYD88^{L265P} in lymphoplasmacytic lymphoma. *Sci Adv* 2022; **8**: eabl4644.
- 8 Bustoros M, Sklavenitis-Pistofidis R, Kapoor P, Liu C-J, Kastritis E, Zanwar S *et al.* Progression Risk Stratification of Asymptomatic Waldenström Macroglobulinemia. *JCO* 2019; **37**: 1403–1411.
- 9 Baldini L, Goldaniga M, Guffanti A, Broglio C, Cortelazzo S, Rossi A *et al.* Immunoglobulin M Monoclonal Gammopathies of Undetermined Significance and Indolent Waldenström's Macroglobulinemia Recognize the Same Determinants of Evolution Into Symptomatic Lymphoid Disorders: Proposal for a Common Prognostic Scoring System. *JCO* 2005; **23**: 4662–4668.
- 10 Moreno DF, Pereira A, Tovar N, Cibeira MT, Magnano L, Rozman M *et al.* Defining an Ultra-Low Risk Group in Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy. *Cancers* 2021; **13**: 2055.
- 11 Varettoni M, Zibellini S, Boveri E, Klersy C, Candido C, Rattotti S *et al.* A risk-stratification model based on the initial concentration of the serum monoclonal protein and MYD88 mutation status identifies a subset of patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance at high risk of progression to Waldenström macroglobulinaemia or other lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 2019; **187**: 441–446.

- 12 Zanwar S, Abeykoon JP, Ansell SM, Gertz MA, Colby C, Larson D *et al.* Disease outcomes and biomarkers of progression in smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2021; **195**: 210–216.
- 13 Moreno DF, López-Guerra M, Paz S, Oliver-Caldés A, Mena M, Correa JG *et al.* Prognostic impact of *MYD88* and *CXCR4* mutations assessed by droplet digital polymerase chain reaction in IGM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2023; **200**: 187–196.
- 14 McMaster ML. The epidemiology of Waldenström macroglobulinemia. *Seminars in Hematology* 2023; **60**: 65–72.
- 15 Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2023 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American J Hematol* 2023; **98**: 348–358.
- 16 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF *et al.* A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2002; **346**: 564–569.
- 17 Treon SP, Tedeschi A, San-Miguel J, Garcia-Sanz R, Anderson KC, Kimby E *et al.* Report of consensus Panel 4 from the 11th International Workshop on Waldenström's macroglobulinemia on diagnostic and response criteria. *Seminars in Hematology* 2023; **60**: 97–106.
- 18 Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML *et al.* Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Seminars in Oncology* 2003; **30**: 110–115.
- 19 Dimopoulos MA, Kastritis E, Owen RG, Kyle RA, Landgren O, Morra E *et al.* Treatment recommendations for patients with Waldenström macroglobulinemia (WM) and related disorders: IWWM-7 consensus. *Blood* 2014; **124**: 1404–1411.
- 20 Pérez-Persona E, Vidriales M-B, Mateo G, García-Sanz R, Mateos M-V, De Coca AG *et al.* New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007; **110**: 2586–2592.
- 21 Evens AM, Danilov A, Jagadeesh D, Sperling A, Kim S-H, Vaca R *et al.* Burkitt lymphoma in the modern era: real-world outcomes and prognostication across 30 US cancer centers. *Blood* 2021; **137**: 374–386.
- 22 Tibshirani R. THE LASSO METHOD FOR VARIABLE SELECTION IN THE COX MODEL. *Statist Med* 1997; **16**: 385–395.
- 23 Dickman PW, Coviello E. Estimating and Modeling Relative Survival. *The Stata Journal* 2015; **15**: 186–215.
- 24 Isola I, Moreno DF, Moga E, Mena M-P, Tovar N, Rodríguez-Lobato LG *et*

al. Immunoparesis defined by heavy/light chain pair suppression in smoldering multiple myeloma shows initial isotype specificity and involves other isotypes in advanced disease. *Ann Hematol* 2021; **100**: 2997–3005.

25 Heaney JLJ, Campbell JP, Iqbal G, Cairns D, Richter A, Child JA *et al.* Characterisation of immunoparesis in newly diagnosed myeloma and its impact on progression-free and overall survival in both old and recent myeloma trials. *Leukemia* 2018; **32**: 1727–1738.

26 Mateos M-V, Kumar S, Dimopoulos MA, González-Calle V, Kastritis E, Hajek R *et al.* International Myeloma Working Group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood Cancer J* 2020; **10**: 102.

27 Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2014; **123**: 2791–2796.

28 Kristinsson SY, Eloranta S, Dickman PW, Andersson TM-L, Turesson I, Landgren O *et al.* Patterns of survival in lymphoplasmacytic lymphoma/waldenström macroglobulinemia: A population-based study of 1,555 patients diagnosed in Sweden from 1980 to 2005. *Am J Hematol* 2013; **88**: 60–65.

29 Amaador K, Kersten MJ, Visser O, Posthuma EFM, Minnema MC, Vos JMI *et al.* Conditional relative survival in Waldenström's macroglobulinaemia: a population-based study in The Netherlands. *Br J Haematol* 2022; **196**: 1205–1208.

30 Marcadis AR, Marti JL, Ehdaie B, Hakimi AA, Davies L, Morris LGT. Characterizing Relative and Disease-Specific Survival in Early-Stage Cancers. *JAMA Intern Med* 2020; **180**: 461.

TABLES

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of patients. IQR: Interquartile range. LDH: lactate dehydrogenase.

Patients' characteristics	N	
Age, median (IQR)	1035	69.7 (60.7 – 77.3)
Sex, female (%)	1035	450 (43.5)
Laboratory values, median (IQR)		
Hemoglobin, mg/dL	999	13.5 (12.2 – 14.6)
Platelets, K/ μ L	994	236.0 (183.0 – 288.0)
Albumin, g/dL	938	4.2 (3.9 – 4.5)
β 2-microglobulin mg/L	760	2.4 (1.8 – 3.1)
Serum M-protein, g/L	781	8.4 (3.9 – 14.3)
Serum IgM, g/L	989	7.0 (3.5 – 15.5)
< 5 g/L, %	615	59.4
Serum IgG, g/L	979	8.7 (6.8 – 10.8)
Serum IgA, g/L	977	1.5 (0.9 – 2.3)
LDH, UI/L	932	240 (174.0 – 325.0)
Bone marrow, %		
Mature lymphocytes	620	14 (8 – 25)
< 10%	425	41.1
Plasma cells	620	2 (1 – 4)
Light chain isotype, (%)		
kappa	859	635 (73.9)
lambda		224 (26.1)
MYD88 L265P mutation, (%)	472	323 (68.4)

Table 2. Impact of biomarkers included in previous prognostic models. N: number of patients for each biomarker. HR: hazard ratio. CI: confidence interval. LDH: lactate dehydrogenase.

Variable	N	Univariate Analysis			Multivariate Analysis			
		HR	95% CI	p-value	N	HR	95% CI	p-value
IgM > 10 g/L	989	4.31	2.91 – 6.40	<0.001	507	2.10	1.19 – 3.66	0.010
Bone Marrow lymphocytes > 20%	620	3.79	2.50 – 5.73	<0.001	507	3.34	1.95 – 5.71	<0.001
β2-microglobulin > 3 mg/L	760	2.38	1.64 – 3.47	<0.001	507	1.72	1.06 – 2.78	0.027
Albumin < 4 g/dL	938	2.56	1.80 – 3.64	<0.001	507	1.65	1.02 – 2.66	0.040
IgA < 0.6 g/L	977	3.22	2.20 – 4.74	<0.001	507	-	-	-
IgG < 6 g/L	979	1.55	1.08 – 2.22	0.016	507	-	-	-
Hemoglobin < 11.5 g/dL	999	2.64	1.75 – 3.97	<0.001	507	-	-	-
LDH > 450 UI/L	932	1.10	0.60 – 1.92	0.806	507	-	-	-

Table 3. Relative survival (RS) rates in patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy and symptomatic Waldenström macroglobulinemia. CI: 95% confidence interval.

Diagnosis	Start	End	RS	CI
Asymptomatic IgM gammopathy	0	5	0.99	0.96 – 1.00
	5	10	0.97	0.92 – 1.00
	10	15	0.90	0.81 – 0.90
	15	20	0.86	0.70 – 0.90
Symptomatic Waldenström macroglobulinemia	0	5	0.76	0.70 – 0.81
	5	10	0.66	0.59 – 0.74
	10	15	0.44	0.34 – 0.54
	15	20	0.36	0.25 – 0.49

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Disease progression in the Spanish Cohort and performance of prognostic risk models. Progression free survival (PFS) in the entire Spanish Cohort (A). Performance on our series of three prognostic models according to the Italian risk model (B), the Dana Farber Cancer Institute (DFCI) (C) and the Barcelona group (D).

Figure 2. Performance of each biomarker in progression free survival (PFS) and construction of the prognostic index. Each plot reflects a Kaplan-Meier survival curve for each biomarker. The cumulative incidence of progression at 5 years was 24% for IgM >10g/L (A), 27% for bone marrow infiltration >20% (B), 23% for serum albumin <4 g/dL (C), and 27% for β 2-microglobulin >3 mg/L (D). The “1-2-3-4” prognostic risk model of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy, based on the number of risk factors (E).

Figure 3. Risk of progression of patients with very low tumor burden based on having a serum IgM less than 5 g/L or a bone marrow (BM) infiltration less than 10%.

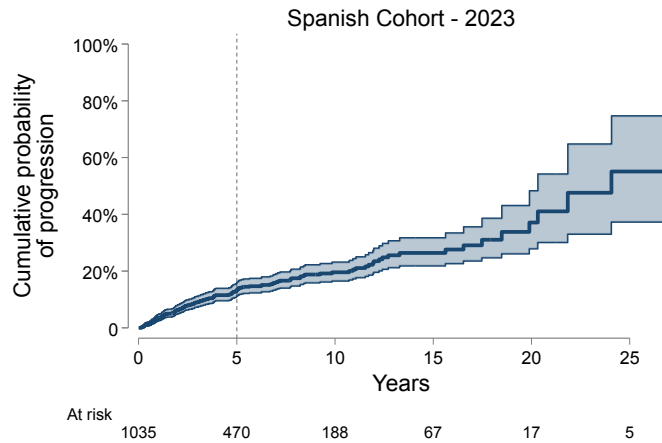
Figure 4. Longitudinal performance of the prognostic biomarkers. Each dot represents a separate time point per subject. Paired t-tests were calculated for serum IgM (A), β 2-microglobulin (B), albumin (C), bone marrow infiltration (D), serum IgA (E), and serum IgG (F). N: number of subjects.

Figure 5. Relative survival (RS) rates compared with the Spanish Health records from the Human Mortality Database up to 2020. Each plot reflects the RS rate (in red), the Spanish population actuarial survival (in blue), and the patients' actuarial survival (in green). Asymptomatic IgM monoclonal gammopathy patients

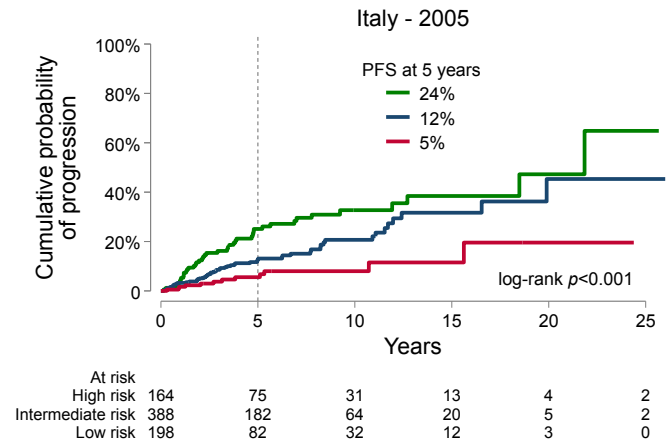
displayed a survival similar to the rest of the Spanish population with a slight decreasing trend after 10 years (A). Symptomatic Waldenström macroglobulinemia patients showed a survival curve below the Spanish population since diagnosis (B). CI: confidence interval.

Figure 1.

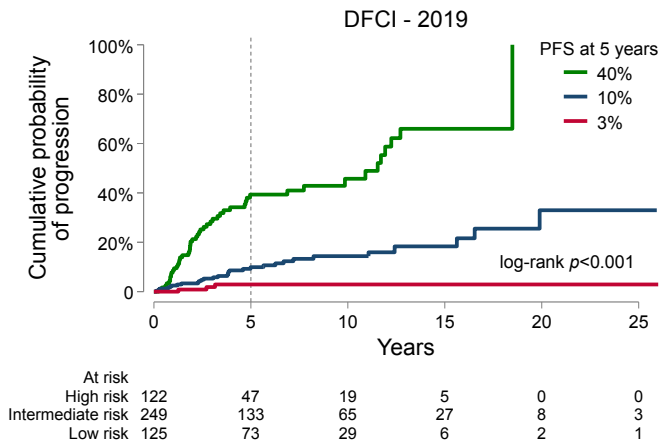
A.



B.



C.



D.

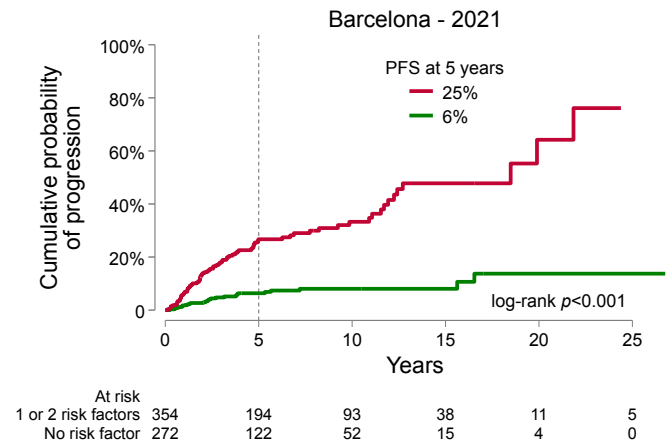
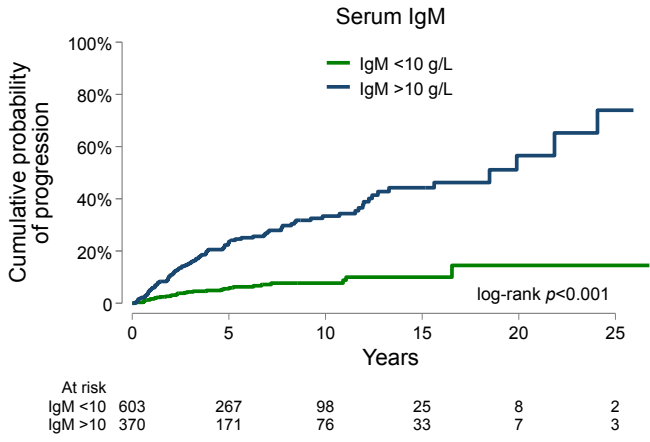
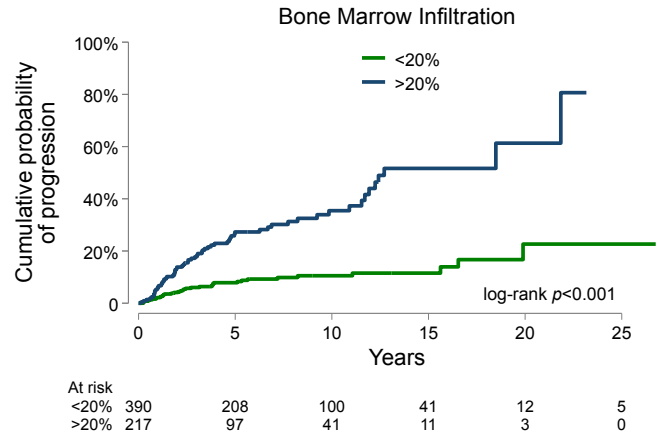


Figure 2.

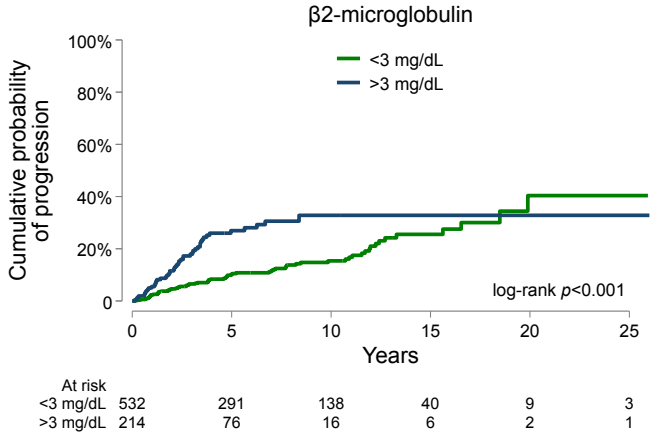
A.



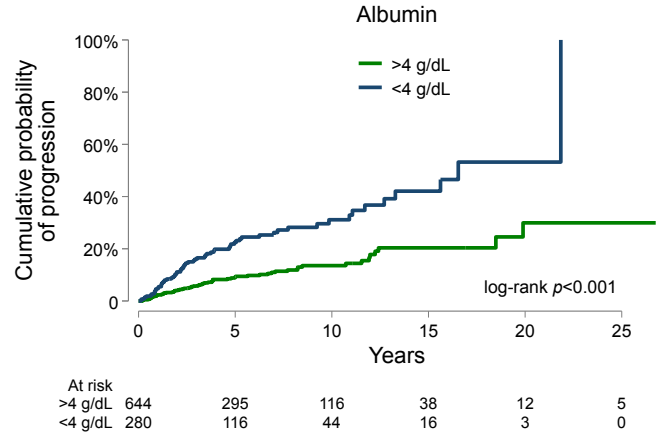
B.



C.



D.



E.

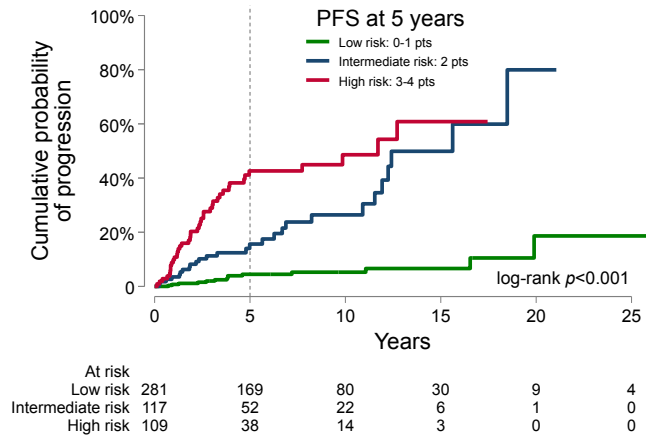


Figure 3.

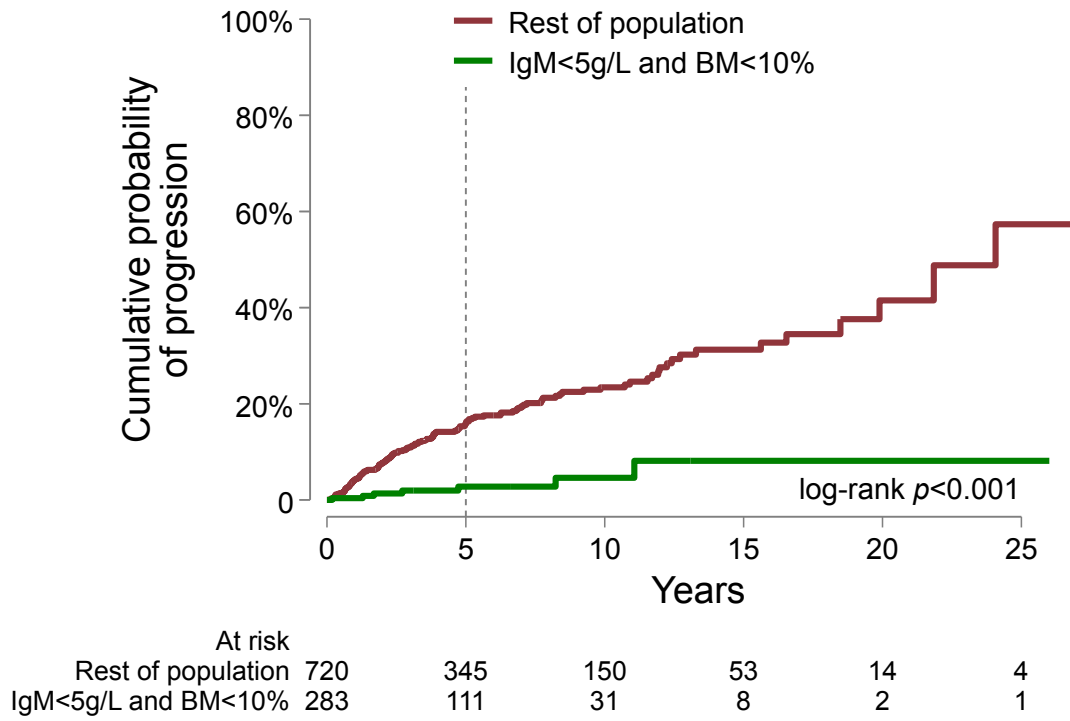


Figure 4.

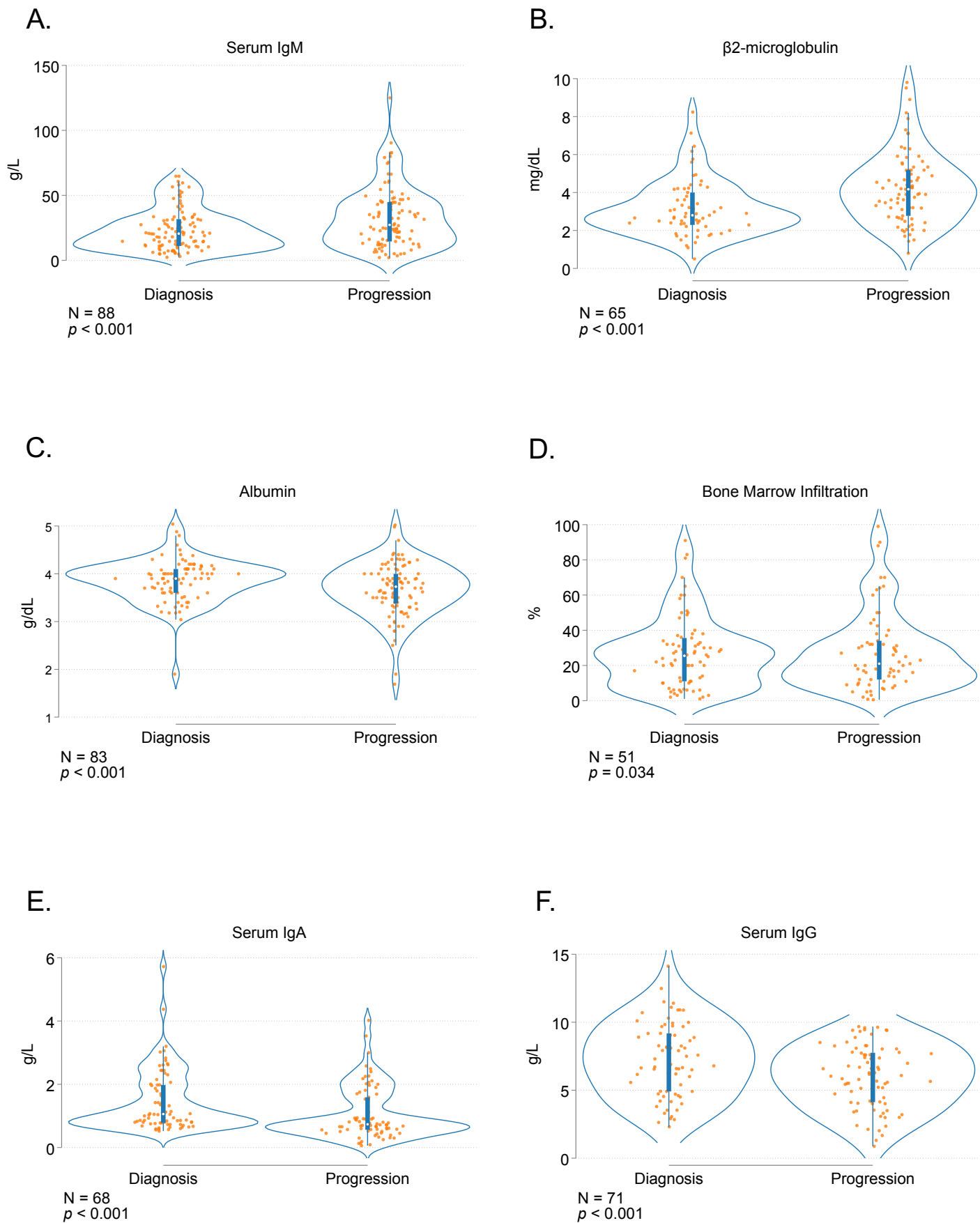
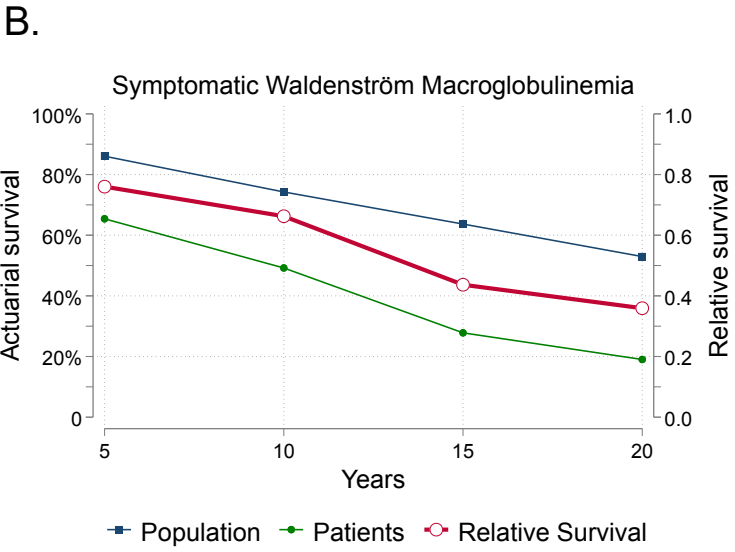
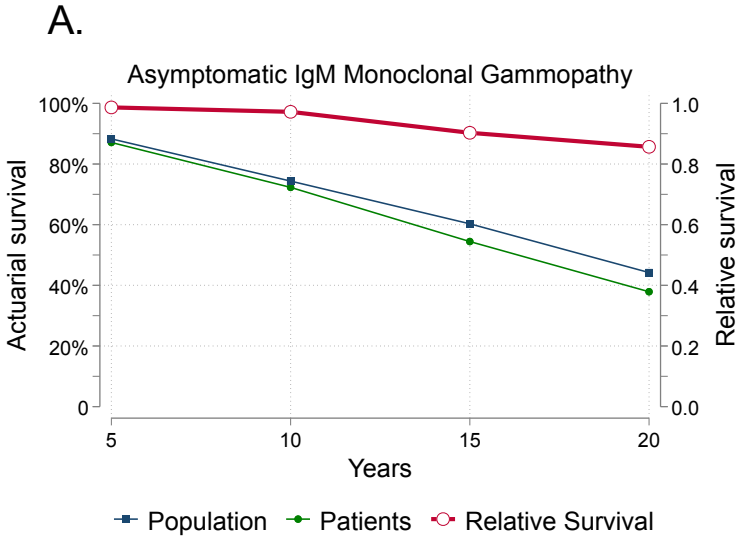


Figure 5.



SUPPLEMENTARY MATERIAL

1. Study design

The Spanish registry of Waldenström macroglobulinemia (WM) and other related IgM monoclonal gammopathy diseases is a multicenter initiative to comprehensively collect clinical and laboratory data. We have collected data from 1483 patients, from which 1035 were asymptomatic (IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS, or asymptomatic WM – AWM), and 448 were symptomatic WM. The data was retrospectively collected and analyzed, and for the purpose of this study, asymptomatic IgM gammopathy patients were the focus of interest. Symptomatic WM patients were only used to contrast the relative survival analyses (explained above). Patients were diagnosed according to each institutional protocol; thus, the Mayo Clinic criteria^{1,2} and the International Consensus criteria were used^{3,4}.

2. Statistical analyses

Selection of predictors

The Cox proportional hazards method was used to model disease progression in the univariate and multivariate analyses. The scaled Schoenfeld residuals was used to analyze the proportional hazards assumption. The predictors showed no violation of this assumption (global test $p=0.498$). The linearity assessment between the predictors as continuous and the log-hazard was analyzed by both individually checking Martingale residuals for each covariate (not shown) and plotting each predicted hazard ratio (HR) or log-HR against the continuous covariate. The latter is graphically seen in Supplementary figure 2, where the predicted HRs showed a linear trend with each covariate. The cut-off points were selected by calculating the predicted HRs for each covariate along with their Harrell's C-index (red dots in Supplementary figure 2), thus optimal categorization of continuous variables was assured.

The cut-off points resembled the dichotomization of normal (albumin 3.5 g/dL, β 2-microglobulin 2.5 mg/L) versus abnormal values established in many centers. In the case of these two predictors, we preferred to use the values selected because we hypothesized that early alterations predicted better disease progression in asymptomatic IgM gammopathy patients. Serum IgM followed a distribution between 10 to 20 g/L with negative impact on PFS, similar to that reported by two other studies^{5,6}. Since we used the bone marrow (BM) infiltration measured by aspirate, the negative impact was observed at a cut-off of 20%, as stated by other study⁷. Lactate dehydrogenase (LDH) was normalized between centers so that 450 UI/L was established as the cut-off above from which they were considered high. Serum IgA or IgG were categorized according to the reference ranges in adults and as stated by other studies (less than 0.6 g/L and 6 g/L, respectively)^{1,7}.

The performance of the three previous models from the Italian group⁸, the Barcelona group⁷, and the Dana Farber Cancer Institute (DFCI)⁵ was analyzed by the analysis of the Gönen and Heller k-statistic to compare the predictive capacity between models in the presence of censored data. To construct a new prognostic index, two multivariate Cox models (a backward stepwise elimination and a least absolute shrinkage and selection operator [lasso]) were used to select variables. To do an unbiased selection of predictors, we included all the variables selected by the three previous studies that attempted to prognosticate IgM MGUS and AWM patients. 507 patients were included without missing values in the multivariate models. The significance level for removal and addition to the backward stepwise model were 0.10 and 0.05, respectively. This model was followed by a 1000-bootstrap replication. The lasso-Cox method is a penalized regression method for variable selection with shrinkage using the proportional hazards model. In case of the inherent clinical multicollinearity of our predictors, the lasso-Cox could give an even accurate selection of predictors. This method was performed using

the lasso cox command available in Stata version 18 (College Station, TX: StataCorp LLC). To build an index, we assigned one point to each predictor, and then clustered the risk groups according to the best fitted survival curves (predicted and the observed HRs) during the first 5 to 10 years, since most patients progressed during this time and the median follow-up of our series.

Estimation of relative survival

Since we lack information of the cause of death on some patients, we preferred to use the life-table estimation of the relative survival (RS) instead of only analyzing the overall survival (OS). Moreover, the presence of other competing events of death when evaluating the OS of asymptomatic patients along with the inherent indolent features of WM can be problematic. Thus, we estimated the RS as the ratio of the observed survival of the patients from our series (considering all deaths as events) to the expected survival in the Spanish population. The life tables from the latter were downloaded from the Human Mortality Database, and the year of late entry was 2020. The databases were merged by year, age and sex. We used the Ederer II method adapted by Paul Dickman⁹ in Stata. Poisson regression was used to model the excess mortality as a function of the type of diagnosis and time since diagnosis.

REFERENCES

- 1 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF *et al.* A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2002; **346**: 564–569.
- 2 Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2023 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American J Hematol* 2023; **98**: 348–358.
- 3 Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML *et al.* Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Seminars in Oncology* 2003; **30**: 110–115.
- 4 Treon SP, Tedeschi A, San-Miguel J, Garcia-Sanz R, Anderson KC, Kimby E *et al.* Report of consensus Panel 4 from the 11th International Workshop on Waldenström's macroglobulinemia on diagnostic and response criteria. *Seminars in Hematology* 2023; **60**: 97–106.
- 5 Bustoros M, Sklavenitis-Pistofidis R, Kapoor P, Liu C-J, Kastritis E, Zanwar S *et al.* Progression Risk Stratification of Asymptomatic Waldenström Macroglobulinemia. *JCO* 2019; **37**: 1403–1411.
- 6 Varettoni M, Zibellini S, Boveri E, Klersy C, Candido C, Rattotti S *et al.* A risk stratification model based on the initial concentration of the serum monoclonal protein and *MYD 88* mutation status identifies a subset of patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance at high risk of progression to Waldenström macroglobulinaemia or other lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 2019; **187**: 441–446.
- 7 Moreno DF, Pereira A, Tovar N, Cibeira MT, Magnano L, Rozman M *et al.* Defining an Ultra-Low Risk Group in Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy. *Cancers* 2021; **13**: 2055.
- 8 Baldini L, Goldaniga M, Guffanti A, Broglia C, Cortelazzo S, Rossi A *et al.* Immunoglobulin M Monoclonal Gammopathies of Undetermined Significance and Indolent Waldenström's Macroglobulinemia Recognize the Same Determinants of Evolution Into Symptomatic Lymphoid Disorders: Proposal for a Common Prognostic Scoring System. *JCO* 2005; **23**: 4662–4668.
- 9 Dickman PW, Coviello E. Estimating and Modeling Relative Survival. *The Stata Journal* 2015; **15**: 186–215.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. General characteristics according to the diagnosis of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and asymptomatic Waldenström macroglobulinemia (AWM)

Patients' characteristics	IgM MGUS N = 605	AWM N = 430
Age, median (IQR)	69.4 (60.3 – 77.1)	70.0 (60.6 – 77.5)
Sex, female (%)	273 (45.1)	177 (41.2)
Laboratory values, median (IQR)		
Hemoglobin, mg/dL	13.7 (12.6 – 14.7)	13.0 (12.0 – 14.2)
Platelets, K/ μ L	221.5 (178.0 – 275.0)	252.0 (200.0 – 311.0)
Albumin, g/L	4.3 (4.0 – 4.5)	4.1 (3.7 – 4.4)
β 2-microglobulin mg/dL	2.3 (1.8 – 3.0)	2.4 (1.8 – 3.4)
Serum M-protein, g/L	5.0 (3.0 – 10.3)	12.2 (7.0 – 21.0)
Serum IgM, g/L	4.6 (2.8 – 8.6)	13.9 (7.0 – 25.6)
Serum IgG, g/L	9.1 (7.4 – 11.1)	8.0 (6.0 – 10.0)
Serum IgA, g/L	1.7 (1.2 – 2.6)	1.1 (0.6 – 1.9)
LDH, UI/L	238.0 (178.0 – 331.5)	242.0 (164.9 – 315.5)
Bone marrow, %		
Mature lymphocytes	10 (6 – 14)	22 (12 – 32)
Plasma cells	2 (1 – 3)	2 (1 – 5)
Light chain isotype, (%)		
kappa	369 (73.8)	266 (74.1)
lambda	131 (26.2)	93 (25.9)
<i>MYD88</i> L265P mutation, (%)	99 (50.5)	224 (81.2)

Supplementary Table 2. Methods to select common predictors of disease progression.

LDH: lactate dehydrogenase, HR: hazard ratio, CI: confidence interval, cv: cross-validation

Variable	Multivariate Cox proportional hazards model 1000-bootstrap replicates				Lasso-Cox 10-fold cv
	N	HR	95% CI	p-value	Lasso coefficient
IgM > 10 g/L	507	2.00	1.05 – 3.80	0.035	0.54
Bone Marrow lymphocytes > 20%	507	3.48	1.96 – 6.20	<0.001	1.10
β 2-microglobulin > 3 mg/L	507	1.83	0.96 – 3.48	0.065	0.48
Albumin < 4 g/dL	507	1.59	0.93 – 2.71	0.090	0.37
IgA < 0.6 g/L	507	1.42	0.72 – 2.80	0.309	0.29
IgG < 6 g/L	507	1.10	0.62 – 1.89	0.783	-
Hemoglobin < 11.5 g/dL	507	0.98	0.45 – 2.17	0.968	-
LDH > 450 UI/L	507	1.81	0.10 – 8.94	0.914	-

Supplementary Table 3. Relative survival (RS) rates according to the diagnosis of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and asymptomatic Waldenström macroglobulinemia (AWM). CI: Confidence interval

IgM MGUS	Start	End	RS rate	CI
	0	5	0.99	0.94 – 1.00
	5	10	0.97	0.90 – 1.00
	10	15	0.93	0.80 – 1.00
	15	20	0.86	0.63 – 1.00
AWM	Start	End	RS rate	CI
	0	5	0.99	0.95 – 1.00
	5	10	0.97	0.89 – 1.00
	10	15	0.88	0.74 – 1.00
	15	20	0.85	0.62 – 1.00

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Supplementary figure 1. Probability of progression according to the decade of diagnosis.

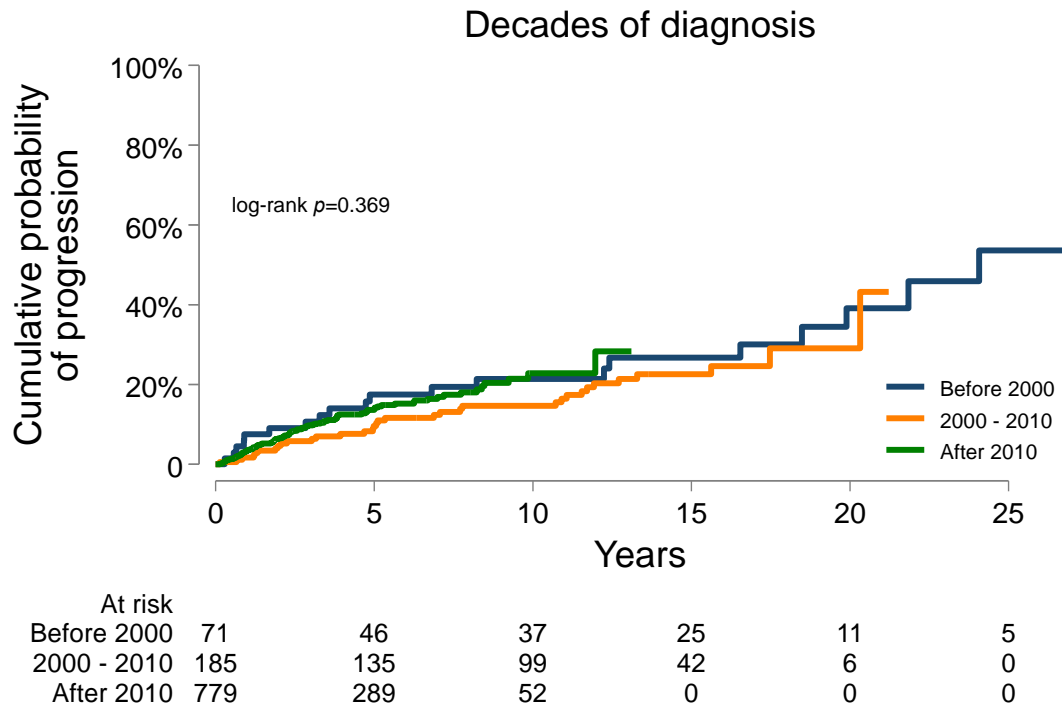
Supplementary figure 2. Unbiased selection of cut-off points for each prognostic biomarker of disease progression. Each plot reflects the predicted hazard ratio (HR) along with the C-Harrell statistic for each cupoint of serum IgM (A), bone marrow (BM) lymphocyte infiltration (B), β 2-microglobulin (C), and serum albumin (D).

Supplementary figure 3. Impact of the *MYD88* L265P status.

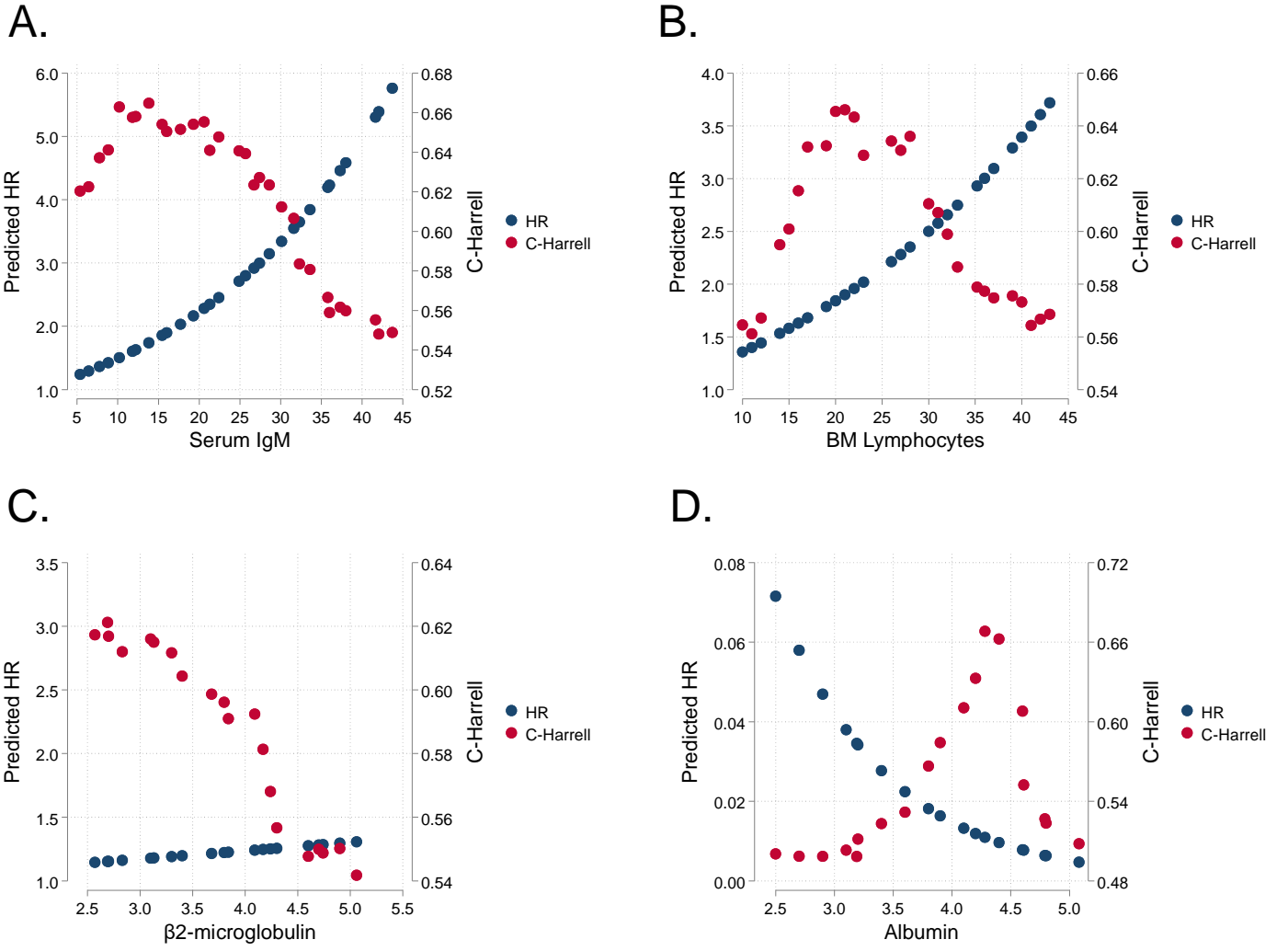
Supplementary figure 4. Clustering of survival curves based on the concordance between the observed and predicted probabilities of progression for each point assigned.
Pts: points

Supplementary figure 5. Distribution of the serum IgM and bone marrow (BM) infiltration across the three risk categories.

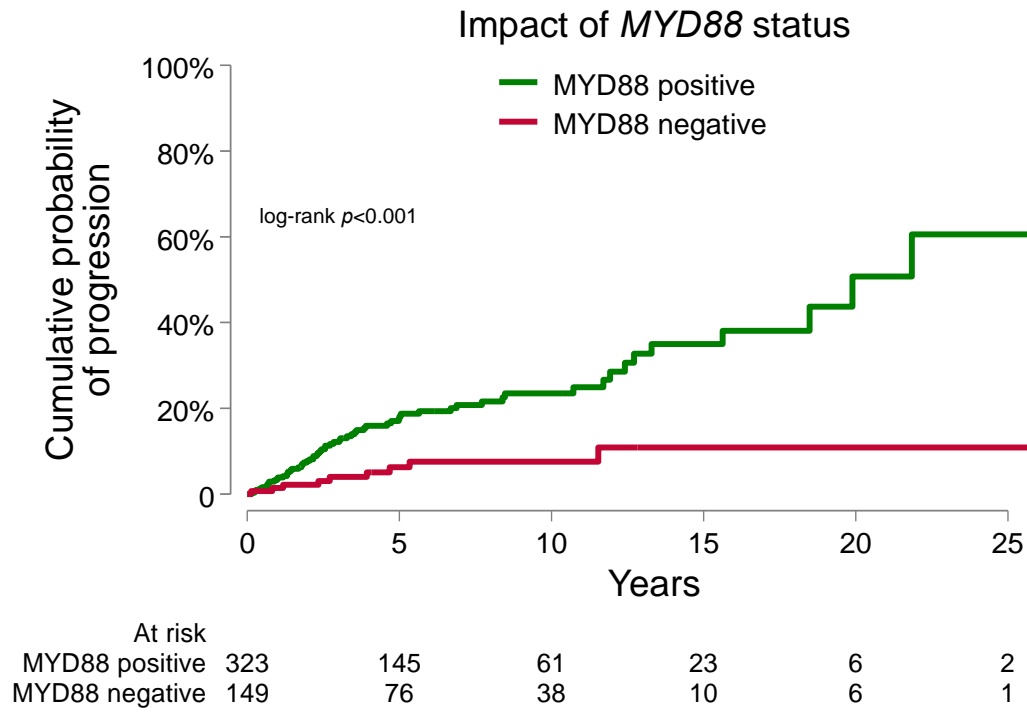
Supplementary figure 1.



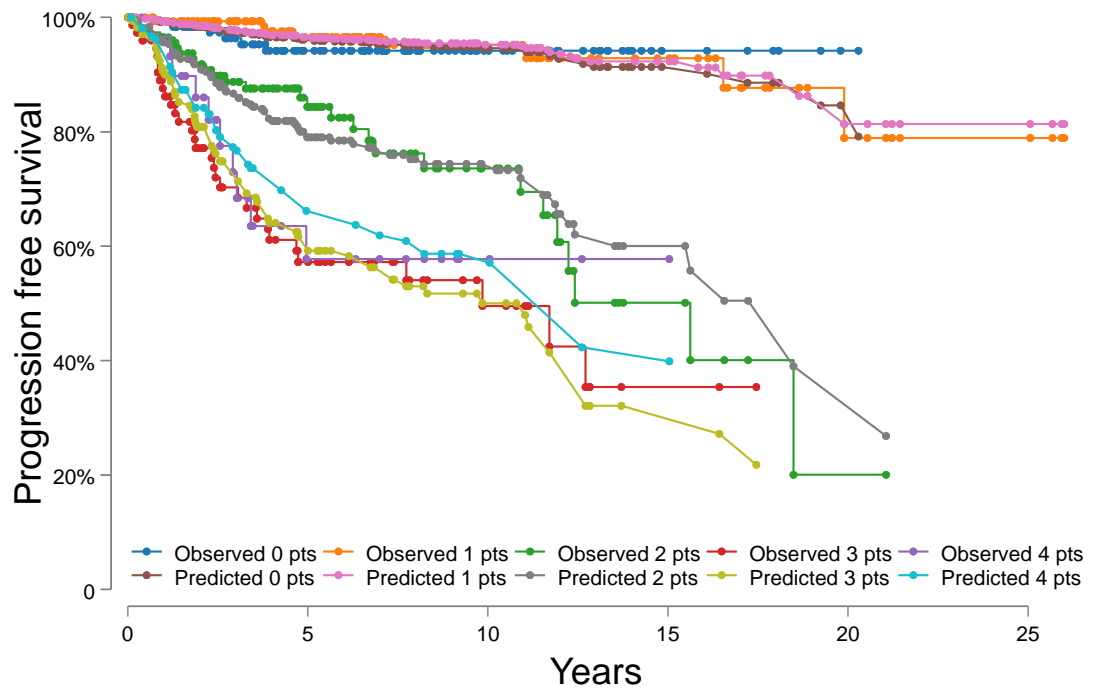
Supplementary figure 2.



Supplementary figure 3.

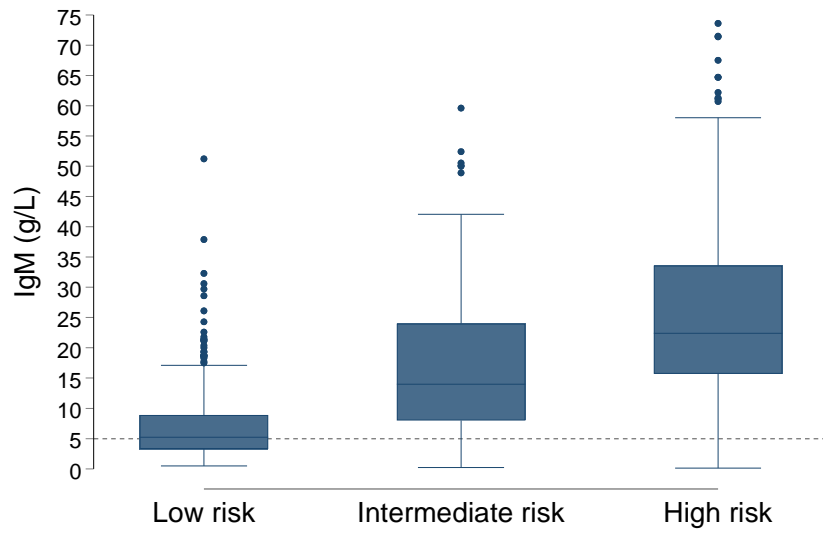


Supplementary figure 4.

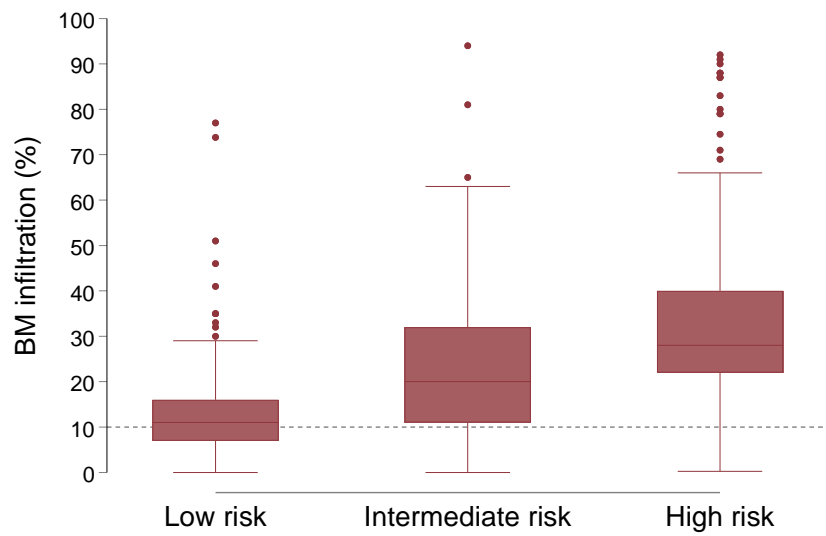


Supplementary figure 5.

A.



B.



DISCUSIÓN

La macroglobulinemia de Waldenström (MW) se caracteriza por la infiltración en médula ósea de un linfoma linfoplasmocítico y la presencia de un componente monoclonal (CM) de inmunoglobulina M (IgM) en suero¹. Debido que se trata de una neoplasia con características indolentes, no todos los pacientes requieren tratamiento al diagnóstico. En la actualidad se considera que hay pacientes con una macroglobulinemia de Waldenström asintomática o quiescente (MWQ) y otro grupo con macroglobulinemia de Waldenström sintomática (MWS)^{12,13}. Por otro lado, se ha identificado una entidad precursora o pre-maligna denominada gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) IgM, representado por pacientes que presentan un CM sérico IgM, la mayoría de las veces de una pequeña cantidad, y que tienen un riesgo de progresión principalmente a MWS tras un largo seguimiento. Sin embargo, el riesgo es muy bajo, en torno al 1% o 2% anual según la serie con mayor seguimiento¹⁴.

Debido a la presencia de estas dos entidades precursoras de MWS y la necesidad de identificar qué pacientes requerirán tratamiento, se han organizado esfuerzos para diferenciar una GMSI IgM de una MWQ. Hay dos criterios diagnósticos vigentes: el de la Clínica Mayo, adoptado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés)²⁸⁻³⁰, y el del Segundo Consenso Internacional de Macroglobulinemia de Waldenström, adoptado actualmente por el Consenso Internacional para la Clasificación de Neoplasias Linfoides Maduras (ICC, por sus siglas en inglés)^{1,2}. Según la WHO, la GMSI IgM se define por la presencia de un CM sérico inferior a 30 g/L asociado con un infiltrado linfoplasmocítico en médula ósea inferior al 10% en un paciente asintomático^{28,30}. Mientras, la ICC define la MWQ en presencia de cualquier grado de infiltración linfoplasmocítica en médula ósea². Esta diferencia hace que algunos pacientes catalogados como GMSI IgM según la WHO sean una MWQ según la ICC.

Hasta la fecha no hay estudios en los que sistemáticamente se haya hecho una comparación entre ambos criterios diagnósticos debido a la necesidad de

realizar un estudio medular a pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas, en forma de aspirado o biopsia. Sin embargo, sí se ha podido demostrar clonalidad de linfocitos B CD19+ con características inmunofenotípicas similares entre la GMSI IgM y la MW^{34,35}. Además, tras la descripción del perfil genómico de la MW, también se ha podido encontrar mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*, e incluso, alteraciones cromosómicas como la delección del brazo largo del cromosoma 6 (del6q) en ambas entidades^{6,7,37,66,75,104}. Es por ello que se ha sugerido una misma célula de origen, y se infiere que pertenecen al mismo espectro continuo desde GMSI IgM a MWS, pasando por la MWQ.

Por lo tanto, hay dos entidades clínico-patológicas que preceden a la MWS, y que tienen ambas una probabilidad de requerir tratamiento durante el seguimiento. En el caso de la GMSI IgM se debe a una transformación maligna hacia una MW establecida, y en menor medida a otras neoplasias linfoproliferativas maduras como el linfoma difuso de células grandes B, la leucemia linfocítica crónica, el mieloma múltiple y la amiloidosis de cadenas ligeras. Mientras tanto, el riesgo de progresión de la MWQ es más uniforme hacia MWS, aunque se han descrito también casos de transformación histológica a un linfoma B de alto grado. Debido a la necesidad de identificar en la consulta médica qué pacientes van a requerir tratamiento, modelar el riesgo de progresión es de especial interés.

Distintos grupos han intentado generar escalas para estratificar el riesgo de pacientes con GMSI IgM y MWQ, sin embargo, existen serias dificultades para modelar de forma precisa la progresión, como son la baja prevalencia de la enfermedad demostrado en el uso de series en un único centro, la necesidad de un seguimiento largo para identificar el evento de interés, la disponibilidad de dos criterios diagnósticos, y la inclusión arbitraria de predictores en cada modelo. Con lo cual, existe una necesidad no resuelta de identificar de forma precisa predictores capaces de modelar el riesgo de progresión, y también la validación de estos en series más amplias. En esta tesis doctoral se han propuesto soluciones para resolver estos problemas, identificando nuevos predictores de progresión capaces de modelar de forma precisa el riesgo en pacientes con

GMSI IgM y MWQ, y, por otro lado, ha validado estos hallazgos en la serie más grande registrada hasta la fecha.

El primer estudio de la tesis doctoral identificó la inmunoparesia como un factor predictor potente de progresión a MW sintomática. Junto con el infiltrado medular, se logró modelar el riesgo de progresión para pacientes con GMSI IgM y MWQ. Además, debido a la inclusión de ambas entidades, la nueva escala de riesgo pudo ser aplicada usando los 2 criterios diagnósticos disponibles. Otra ventaja del presente trabajo fue la incorporación del estudio medular en pacientes con GMSI IgM usando el aspirado medular de forma sistemática, y la evaluación retrospectiva de la mutación de *MYD88* como probable biomarcador de progresión. La incidencia acumulada de progresión de pacientes con GMSI IgM fue similar a otras series publicadas. En el caso de pacientes con MWQ, nuestra serie presentó una incidencia acumulada de progresión más parecida a un riesgo bajo o intermedio de la serie del grupo Dana Farber¹³. Debido a la asociación de la inmunoparesia con otros predictores de progresión, se infiere que proceden del mismo proceso de evolución clonal, probablemente más relacionado con la desregulación inmune en respuesta a la carga tumoral.

En pacientes con MWQ, la inmunoparesia de isotipo IgA se asoció con un mayor riesgo de progresión junto con el infiltrado linfoplasmocítico, los valores de hemoglobina y el CM sérico¹². Sin embargo, no fue incluido posteriormente dentro de los modelos multivariantes de otros estudios con mayor número de pacientes, como el del grupo italiano o del Dana Farber^{13,23}. Otro estudio observó una prevalencia del 63% y 58% de inmunoparesia IgG e IgA en pacientes con MW, respectivamente. En los pacientes con MWQ, también estaba asociada con una peor supervivencia libre de progresión, y en aquellos con MWS persistía durante los ciclos de tratamiento¹⁰⁵. Más allá de estos estudios, no se ha analizado el impacto de la inmunoparesia de forma independiente en la MWQ.

El mecanismo responsable de la inmunoparesia IgG o IgA no está descrito hasta la fecha en las gammopatías monoclonales IgM. Un grupo planteó la posibilidad de alteraciones genéticas subyacentes; sin embargo, no se encontró de forma recurrente una mutación asociada a la inmunoparesia de pacientes con MW,

excepto la presencia de una mutación somática en el gen *UNG* en un único paciente con inmunoparesia de ambas inmunoglobulinas (IgG e IgA)¹⁰⁵.

La inmunoparesia en otras gammapatías monoclonales, como en el mieloma múltiple quiescente, sí ha demostrado ser un potente predictor de progresión a mieloma sintomático¹⁰⁶, demostrado en su inclusión en la estratificación de riesgo propuesta por el Grupo Español de Mieloma¹⁰⁷. Otros estudios realizados en pacientes con GMSI no IgM e incluso amiloidosis sistémica por cadenas ligeras (AL) proponen que la inmunoparesia de la cadena no involucrada es un factor predictor de mal pronóstico¹⁰⁸. El mecanismo en el mieloma múltiple se debe en parte a la infiltración de un grupo de células plasmáticas de un isotipo específico, disminuyendo el resto del microambiente tumoral y de células plasmáticas no clonales¹⁰⁶. Por otro lado, también se ha postulado un papel de los linfocitos T reguladores inhibiendo una respuesta hacia el tumor y generando una disminución de la parte de células plasmáticas no clonales, y por ende, asociándose a una disminución en la producción de inmunoglobulinas¹⁰⁹. Como se ha visto, queda aún por dilucidar el mecanismo fisiopatogénico que produce la inmunoparesia en las gammapatías monoclonales IgM. Sin embargo, en esta tesis doctoral se ha consolidado como un biomarcador de progresión precoz, prevalente incluso en pacientes con GMSI IgM.

El siguiente predictor de progresión fue el grado de infiltración linfoplasmocelular en médula ósea. Este predictor ha sido incluido en otros modelos de riesgo tomando en conjunto pacientes con GMSI IgM y MWQ^{12,13,23}; sin embargo, solo el grupo del Dana Farber demostró su impacto independiente usando un punto de corte del 70%¹³. Este valor es infrecuente en la práctica clínica, con lo cual la reproducibilidad del estudio se pone en duda. Además, el estudio del grupo de Dana Farber incluyó casos con GMSI IgM, generando incluso mayor sesgo al momento de aplicar la estratificación de riesgo propuesta por ellos en este subgrupo de pacientes. Respecto de otros biomarcadores en el primer estudio de la tesis doctoral, la mutación *MYD88* L265P en pacientes con MWQ fue inferior a la observada por otras series, probablemente debido a la inclusión de un mayor número de pacientes con MWQ con baja carga tumoral en nuestro estudio¹³. Con todo ello, se obtuvo un primer modelo de riesgo pronóstico

identificando un subgrupo de muy bajo riesgo en las gammapatías monoclonales IgM asintomáticas, representado por aquellos pacientes que no tenían inmunoparesia ni un infiltrado linfoplasmocelular incrementado en médula ósea, y dando mayor importancia a pacientes con GMSI IgM.

Las ventajas de este primer estudio de la tesis doctoral son la identificación y análisis sistemático de la inmunoparesia como nuevo predictor en las gammapatías IgM asintomáticas, el análisis retrospectivo de *MYD88* L265P, y la inclusión de un valor de infiltrado linfoplasmocelular en médula ósea capaz de poder ser aplicado en pacientes con baja carga tumoral. Con ello, se obtuvo una estratificación fácil de aplicar en la práctica clínica diaria.

Dentro de las limitaciones se encuentran el tiempo de seguimiento de los pacientes (para algunos autores, puede resultar corto una mediana de 4,3 años), el uso de muestras conservadas en la colección de muestras biológicas para analizar *MYD88* L265P y cuyas técnicas de procesamiento pueden haber variado durante el tiempo, afectando asimismo la reproducibilidad de los resultados, y la falta de una serie de validación externa. Sin embargo, el uso de métodos estadísticos usados en este estudio de tesis doctoral como el *bootstrapping* reafirman que, a pesar de ser datos procedentes de un único centro, el modelo pronóstico basado en la inmunoparesia y el infiltrado medular mantienen la misma capacidad predictiva.

Se abre, por tanto, nuevas posibilidades para modelar el riesgo pronóstico de los pacientes con GMSI IgM y MWQ. Futuros estudios tendrán que incluir de forma sistemática la inmunoparesia de una o dos cadenas en los análisis multivariantes para evaluar su impacto en otras series de validación más grandes. Asimismo, como se ha descrito en otras gammapatías monoclonales, hay margen para ampliar estudios sobre los mecanismos biológicos detrás de la inmunoparesia en la MW, usando por ejemplo la técnica *Hevylite*® para analizar los pares de isotipo de cadena pesada y de cadena ligera^{106,110}, o también estudios evaluando con mayor profundidad y resolución el microambiente tumoral mediante tecnologías de *single cell sequencing* del ARN y del receptor de células B. Con

ello, se obtendría un mapa detallado de la dinámica de subpoblaciones tumorales y no tumorales de linfocitos B, junto con su expresión de cadena pesada y ligera.

El segundo trabajo de la tesis doctoral continúa la línea de investigación de encontrar nuevos biomarcadores, esta vez haciendo énfasis en la detección precisa de *MYD88* L265P en pacientes con GMSI IgM y MWQ. Se exploró de forma sistemática el uso de la reacción en cadena de polimerasa digital (ddPCR, por sus siglas en inglés) para detectar las mutaciones más patogénicas de *MYD88* y *CXCR4* en las gammapatías IgM asintomáticas. Se obtuvo una sensibilidad mucho mayor que la PCR alelo específica (AS-PCR) convencional, logrando una cuantificación absoluta de la carga alélica. Asimismo, la carga alélica de las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* se correlacionaron positivamente con otros marcadores pronósticos establecidos en las entidades pre-sintomáticas de la enfermedad.

Como se ha reportado usando la técnica *single cell sequencing*⁶⁶, este trabajo de tesis doctoral también encontró la presencia de *MYD88* L265P en casos en los que no había una población clonal B detectada por citometría de flujo. Además, añadido al hecho de que la carga alélica aumentaba en cada estadio de la enfermedad, los datos de este estudio sustentan que *MYD88* L265P se trata de un evento muy inicial para el desarrollo del clon linfoplasmocítico. Respecto de *CXCR4*, la mutación que genera un cambio de C por G en la posición 1013 (C1013G) fue la que se encontró de forma mayoritaria, en un 35% y 43% de pacientes con GMSI IgM y MWQ, respectivamente, mientras que la que genera un cambio de C por A (C1013A) se encontraba en proporción mucho menor. Ambas mutaciones presentaron una carga alélica inferior a la de *MYD88*, infiriendo un comportamiento subclonal, y probablemente de adquisición posterior en la evolución de las células tumorales.

Debido a la necesidad de encontrar biomarcadores precisos, especialmente en pacientes en los que existe cierta dificultad para la obtención de muestras de médula ósea, en este estudio también se analizó el ADN libre circulante (cfDNA, por sus siglas en inglés) como fuente para analizar las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* usando ddPCR. En otras neoplasias hematológicas, el cfDNA ha servido

como biomarcador indirecto de carga tumoral adenopática en pacientes con linfoma difuso de células grandes B, siendo además un predictor importante de supervivencia libre de progresión y supervivencia global¹¹¹. De forma similar y tras un seguimiento longitudinal bajo tratamiento, una mayor carga tumoral en cfDNA de un perfil mutacional específico de pacientes con MM estuvo asociado con peor supervivencia libre de progresión¹¹². La capacidad de detección de mutaciones en cfDNA medido por técnicas de secuenciación o ddPCR ha llegado describirse en torno al 98% en pacientes con MM, convirtiéndolo también en un potente biomarcador de carga tumoral¹¹³. Más específicamente en las gammopatías monoclonales IgM, previamente se había reportado que *MYD88* L265P y *CXCR4* S338* eran detectables en cfDNA usando AS-PCR, presentando una alta concordancia de positividad y negatividad con células mononucleadas de médula ósea, aunque más especialmente con células CD19+⁹²⁻⁹⁴. Mientras que solo un estudio optó por el uso de ddPCR en pacientes con MW, logrando incluso una mayor sensibilidad⁹⁹. Es por ello que, de forma satisfactoria, en este segundo estudio de tesis doctoral se logró obtener una positividad de la mutación en una proporción importante de pacientes con GMSI IgM y MWQ, reafirmando que cfDNA es una fuente importante para el diagnóstico de estos pacientes, especialmente en aquellos en los que se difiere el estudio medular por la edad o la presencia de comorbilidades, o en los casos con muy baja carga tumoral como los pacientes con GMSI IgM. Por otro lado, se logra consolidar la ddPCR sobre la AS-PCR en términos de sensibilidad y resolución para detectar mutaciones somáticas en varios tipos de muestra, incluyendo aquellas con baja cantidad de ADN como es el cfDNA.

Con todo ello, y dada la asociación de la carga alélica con marcadores pronósticos, este estudio consiguió modelar el riesgo de progresión usando puntos de corte del 8% y 2% de carga alélica mutada de *MYD88* y *CXCR4*, respectivamente. Este segundo trabajo de tesis doctoral describió por primera vez la posibilidad de una clasificación genómica del riesgo de progresión de pacientes con gammopatías monoclonales IgM asintomáticas, utilizando tecnologías novedosas con elevada resolución. Previamente se había ya observado un mayor riesgo de progresión a MWS en pacientes con GMSI IgM que tenían la mutación *MYD88* L265P¹⁸, similar a los hallazgos del primer

estudio de la tesis doctoral. Situación contraria se había descrito en la MWQ, en el que los pacientes con *MYD88 wild type* tenían una supervivencia libre de progresión más corta¹³. Sin embargo, los estudios reportaron el uso de AS-PCR en series relativamente pequeñas. Por ejemplo, el grupo del Dana Farber planteó que los pacientes *MYD88 wild type* tenían mayor riesgo de progresión, pero únicamente fueron evaluados 86 casos¹³. Además, se ha descrito que los pacientes con MW *MYD88 wild type* tienen características más heterogéneas, incluso desde el punto de vista genómico^{80,82}.

Por lo tanto, si bien la presencia de la mutación *MYD88 L265P* no es un criterio diagnóstico, el consenso actual recomienda hacer un diagnóstico diferencial en pacientes con MW *MYD88 wild type*, dada la presencia de otros linfomas B de célula pequeña histológicamente parecidos. Asimismo, se ha visto una mayor transformación histológica a un linfoma B de alto grado en los pacientes *MYD88 wild type*, añadiendo incluso mayor heterogeneidad en esta población¹⁰³. Tiene además sentido que, conforme progresa la enfermedad desde la GMSI IgM y pasando por la MWQ, la carga mutacional tanto de *MYD88* como la emergencia de *CXCR4*, aumente. Este proceso clonal evolutivo de las mutaciones es común e inherente al cáncer. Debido a que también se ha detectado la mutación *MYD88 L265P* en fases muy iniciales del desarrollo de linfocitos B de pacientes con GMSI IgM y MW, y cuya carga alélica aumenta en cada estadio madurativo⁶⁶, hace pensar también que la progresión es un proceso dinámico.

Las ventajas de este segundo estudio de la tesis doctoral son el haber demostrado la capacidad pronóstica y el impacto negativo de las mutaciones de *MYD88 L265P* y *CXCR4 S338** usando una PCR de alta resolución, logrando una mayor sensibilidad para detectar estas mutaciones a comparación de la canónica AS-PCR sin depender de un aislamiento previo de linfocitos CD19+, demostrar el potencial uso de cfDNA como fuente para ayudar al diagnóstico, y generar una primera clasificación pronóstica en base a alteraciones genéticas de la GMSI IgM y MWQ.

Las limitaciones incluyen el no incluir un análisis comparativo de la sensibilidad diagnóstica de la ddPCR usando también otras fuentes como los linfocitos B

CD19+ aislados (al no disponer de estas muestras), y no tener suficientes muestras de cfDNA para analizar las mutaciones y poder replicar el modelo de impacto pronóstico basado en las muestras originales de médula ósea. Pese a ello, los resultados favorecen el uso de la ddPCR, cuya población de estudio original en el primer diseño fue detectar mutaciones somáticas poco frecuentes, como es el caso de la GMSI IgM y la MWQ.

Este segundo estudio de tesis doctoral abre un abanico importante de posibilidades diagnósticas y de mayor comprensión en la biología de la MW. La aplicación de la ddPCR en distintos centros además es factible. La perspectiva de futuro es que se puedan diseñar *primers* y sondas para detectar las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* en una sola prueba, denominado *multiplex* ddPCR, con lo cual en un único momento se podrá determinar las características genéticas de una muestra. Además, estudios futuros tendrán que incorporar la presencia de las mutaciones de *MYD88* y *CXCR4* en pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas.

La validación externa de los biomarcadores de progresión descritos en los dos estudios previos de la tesis doctoral se refleja en el tercer estudio, describiendo la inmunoparesia, el infiltrado medular y la presencia de *MYD88* L265P en la serie más amplia registrada hasta la fecha de pacientes con GMSI IgM y MWQ. Usando los dos criterios diagnósticos vigentes, el modelo pronóstico de este estudio propone que biomarcadores tales como el infiltrado medular de un 20%, la albúmina inferior a 4 g/dL, la β 2-microglobulina superior a 3 mg/dL y el valor de IgM sérica superior a 10 g/L son predictores potentes de progresión. A pesar de que la inmunoparesia se incluyó en el modelo multivariante en este tercer estudio, no tuvo un impacto pronóstico independiente. Sí se observó, en cambio, que la inmunoparesia de IgG e IgA disminuía en un seguimiento longitudinal al diagnóstico y progresión. Por tanto, si bien no es un predictor independiente, se recomienda la vigilancia estrecha de estos valores desde estadios muy iniciales, como la GMSI IgM. Además, la medición de los valores de IgG e IgA en suero es de una aplicación rápida y universal, haciendo factible su uso no solo en centros hospitalarios de tercer nivel, sino también en otros de menor complejidad.

En cambio, la mutación de *MYD88* L265P no se integró en el modelo multivariante por la diferente disponibilidad de la técnica en distintos centros, que, a su vez, podía impactar en la reproducibilidad del modelo. A pesar de ello, este estudio nuevamente reafirma que la presencia de *MYD88* L265P confiere un riesgo de progresión a enfermedad sintomática en pacientes con MWQ, similar a lo expuesto en los dos primeros trabajos de la tesis doctoral. No es el caso de pacientes con GMSI IgM, aunque se ha de tener en cuenta que la disponibilidad de la mutación era dependiente de haber obtenido muestras de médula ósea. Por todo ello, se decidió no incluir a este biomarcador en el modelo pronóstico final.

El modelo pronóstico propuesto en el tercer trabajo de tesis doctoral también fue superior a otros modelos como los del grupo italiano²³ y del Dana Farber¹³, en términos de capacidad discriminativa del riesgo. Si bien los predictores de progresión fueron similares al establecido por el grupo del Dana Farber, se hizo hincapié en la necesidad de diferenciar el riesgo de progresión en pacientes con GMSI IgM y MWQ. Por ejemplo, el punto de corte del infiltrado medular del 20% representó mejor a la población con menor carga tumoral, y lo que habitualmente se observa en la práctica clínica. Además, se demostró que el aspirado medular es una herramienta importante en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con gammopatías monoclonales IgM asintomáticas, y que la infiltración linfoplasmocelular con este procedimiento representa también lo observado en biopsias de médula ósea. Esta definición ya se ha planteado en otros estudios, especialmente en centros europeos, en los que se prioriza el aspirado medular en pacientes asintomáticos.

Finalmente, se demostró la necesidad de diferenciar los diagnósticos de las gammopatías monoclonales IgM para evaluar la supervivencia relativa. Tanto la GMSI IgM como la MWQ presentaron una supervivencia similar al resto de la población española. Específicamente en pacientes con GMSI IgM y durante los primeros años al diagnóstico, se observó incluso una supervivencia relativa ligeramente superior, probablemente por el sesgo de detectar y controlar otras comorbilidades que impacten en la supervivencia de pacientes asintomáticos. Sin embargo, quedó claro que la supervivencia relativa es distinta entre

pacientes con MWQ y MWS, dado que estos últimos presentaron una supervivencia relativa inferior. Otros estudios han intentado esclarecer la supervivencia relativa de pacientes con MW, pero dado que se han usado registros nacionales, no hubo capacidad para discriminar a los asintomáticos⁵⁵. Como se demuestra en el tercer estudio de tesis doctoral, es posible informar correctamente la supervivencia estimada tras un diagnóstico de gammapatía monoclonal IgM asintomática.

Las limitaciones del tercer estudio pueden resumirse nuevamente en el tiempo de seguimiento de los pacientes (mediana de 5 años). A pesar de haber incluido pacientes diagnosticados hace 3 décadas, la mediana de seguimiento es inferior a otras series como el grupo de la Clínica Mayo y del Dana Farber^{13,14}. El principal motivo para obtener una mediana de seguimiento de 5 años fue por el uso de datos procedentes de varios centros, y por el hecho que muchos pacientes asintomáticos abandonan el seguimiento, o se les deriva hacia otros centros de menor complejidad, perdiendo información. A pesar de ello, este estudio describe una tasa de progresión en GMSI IgM prácticamente similar a lo establecido por la serie de mayor seguimiento registrado hasta la fecha¹⁴. Con lo cual, se infiere que la población de este tercer estudio era representativa.

Otra limitación es la menor tasa de progresión observada en pacientes con MWQ, respecto de la serie del Dana Farber o de la Clínica Mayo. La razón detrás de estas diferencias radica en el uso de los dos criterios diagnósticos, y en la falta de tener un tiempo de seguimiento mínimo para considerar a un paciente como MWQ o MWS. Este sesgo de selección se ve patente al haber demostrado en otros estudios cómo algunos pacientes catalogados como MWQ progresan en menos de 3 a 6 meses¹³. Muy probablemente estos casos eran sintomáticos desde el inicio, y, por tanto, no deben incluirse en los modelos de riesgo.

A pesar de lo mencionado, el tercer estudio de esta tesis doctoral sienta las bases para la aplicación universal de un modelo aplicable para pacientes con GMSI IgM y MWQ. Asimismo, abre camino a seguir investigando la inmunoparesia desde el punto de vista molecular en las gammapatías monoclonales IgM, ya que parece jugar un papel importante en el seguimiento

longitudinal de los pacientes. Por otro lado, se tendrá que analizar sistemáticamente la mutación de *MYD88* L265P en pacientes asintomáticos dado que impacta en el riesgo de progresión.

Finalmente, los tres estudios de la tesis doctoral generan un cambio de paradigma en el estudio de la historia natural de una enfermedad rara, como la MW, arrojando mayor conocimiento sobre la evolución de las formas asintomáticas hacia esta enfermedad y, probablemente, mejorando el diagnóstico de los pacientes con gammapatías monoclonales IgM.

CONCLUSIONES

1. La inmunoparesia de los dos isotipos no involucrados es prevalente en pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas.
2. La presencia de inmunoparesia y la mayor infiltración linfoplasmocítica en médula ósea están asociados a una supervivencia libre de progresión más corta a enfermedad sintomática en los pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas.
3. La reacción en cadena de polimerasa digital es una herramienta de elevada sensibilidad y especificidad para detectar las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4*, logrando obtener una carga alélica absoluta, especialmente en muestras con poca carga tumoral.
4. Las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4* detectadas por reacción en cadena de polimerasa digital en médula ósea y plasma son altamente prevalentes en pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas.
5. Una mayor carga alélica de las mutaciones en *MYD88* y *CXCR4* detectadas por reacción en cadena de polimerasa digital se asocia con una mayor carga tumoral y a una mayor progresión a enfermedad sintomática en pacientes con gammapatías monoclonales IgM asintomáticas.
6. Los predictores independientes de progresión en las gammapatías monoclonales IgM asintomáticas son la cuantía del componente monoclonal sérico, el grado de infiltrado medular, la β 2-microglobulina y la albúmina.
7. La inmunoparesia está asociada con un peor pronóstico a enfermedad sintomática en una serie de validación externa, con énfasis en el seguimiento longitudinal de los pacientes.
8. La mutación de *MYD88* se asocia con un peor pronóstico en pacientes con macroglobulinemia de Waldenström quiescente en una serie multicéntrica de pacientes.
9. El riesgo de progresión a enfermedad sintomática es distinto entre la gammapatía de significado incierto IgM y la macroglobulinemia de Waldenström quiescente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003; 30(2):110–5.
2. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood.* 2022; 140(11):1229–53.
3. McMaster ML. The epidemiology of Waldenström macroglobulinemia. *Semin Hematol.* 2023; 60(2):65–72.
4. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012; 367(9):826–33.
5. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood.* 2014; 123(11):1637–46.
6. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2014;123(18):2791-6.
7. Xu L, Hunter ZR, Tsakmaklis N, Cao Y, Yang G, Chen J, et al. Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2016; 172(5):735–44.
8. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011; 470(7332):115–9.
9. De Groen RAL, Schrader AMR, Kersten MJ, Pals ST, Vermaat JSP. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Haematologica.* 2019; 104(12):2337–48.

10. Treon SP. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2015; 126(6):721–32.
11. Dimopoulos MA, Kastritis E. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2019; 134(23):2022–35.
12. Kyle RA, Benson JT, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, et al. Progression in smoldering Waldenström macroglobulinemia: long-term results. *Blood*. 2012; 119(19):4462–6.
13. Bustoros M, Sklaventis-Pistofidis R, Kapoor P, Liu CJ, Kastritis E, Zanwar S, et al. Progression Risk Stratification of Asymptomatic Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 2019; 37(16):1403–11.
14. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2018; 378(3):241–9.
15. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2002; 346(8):564–9.
16. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, 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(11):2051–8.
17. Turesson I, Kovalchik SA, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Goldin LR, Drayson MT, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood*. 2014; 123(3):338–45.
18. Varettoni M, Zibellini S, Boveri E, Klersy C, Candido C, Rattotti S, et al. A risk-stratification model based on the initial concentration of the serum monoclonal protein and MYD88 mutation status identifies a subset of patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance at high risk of progression to Waldenström macroglobulinaemia or other lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2019; 187(4):441–6.
19. Montoto S, Rozman M, Rosiñol L, Nadal E, Giné E, Aymerich M, et al. Malignant transformation in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Semin Oncol*. 2003; 30(2):178–81.

20. Waldenström J. Incipient myelomatosis or «essential» hyperglobulinemia with fibrinogenopenia — a new syndrome? *Acta Med Scand.* 1944; 117(3-4):216–47.
21. Moore DF. Monoclonal Macroglobulinemia in Malignant Lymphoma. *Ann Intern Med.* 1970; 72(1):43.
22. Owen RG, Johnson SA, Morgan GJ. Waldenström’s macroglobulinaemia: Laboratory diagnosis and treatment. *Hematol Oncol.* 2000; 18(2):41–9.
23. Baldini L, Goldaniga M, Guffanti A, Broglio C, Cortelazzo S, Rossi A, et al. Immunoglobulin M Monoclonal Gammopathies of Undetermined Significance and Indolent Waldenström’s Macroglobulinemia Recognize the Same Determinants of Evolution Into Symptomatic Lymphoid Disorders: Proposal for a Common Prognostic Scoring System. *J Clin Oncol.* 2005; 23(21):4662–8.
24. Zanwar S, Abeykoon JP, Ansell SM, Gertz MA, Colby C, Larson D, et al. Disease outcomes and biomarkers of progression in smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2021; 195(2):210–6.
25. Kyle RA, Finkelstein S, Elveback LR, Kurland LT. Incidence of Monoclonal Proteins in a Minnesota Community With a Cluster of Multiple Myeloma. *Blood.* 1972; 40(5):719–24.
26. Kyle RA. “Benign” Monoclonal Gammopathy—After 20 to 35 Years of Follow-Up. *Mayo Clin Proc.* 1993; 68(1):26–36.
27. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med.* 2006; 354(13):1362–9.
28. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBDO, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia.* 2022; 36(7):1720–48.
29. Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2023 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023; 98(2):348–58.
30. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014; 15(12):e538–48.

31. Khwaja J, D'Sa S, Minnema MC, Kersten MJ, Wechalekar A, Vos JM. IgM monoclonal gammopathies of clinical significance: diagnosis and management. *Haematologica*. 2022; 107(9):2037–50.
32. Moreno DF, Rosiñol L, Cibeira MT, Bladé J, Fernández De Larrea C. Treatment of Patients with Monoclonal Gammopathy of Clinical Significance. *Cancers*. 2021; 13(20):5131.
33. Dogliotti I, Jiménez C, Varettoni M, Talaulikar D, Bagratuni T, Ferrante M, et al. Diagnostics in Waldenström's macroglobulinemia: a consensus statement of the European Consortium for Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia*. 2023; 37(2):388–95.
34. Paiva B, Montes MC, García-Sanz R, Ocio EM, Alonso J, De Las Heras N, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia*. 2014; 28(1):166–73.
35. Paiva B, Corchete LA, Vidriales MB, García-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2015; 125(15):2370–80.
36. García-Sanz R, Jiménez C, Puig N, Paiva B, Gutiérrez NC, Rodríguez-Otero P, et al. Origin of Waldenström's macroglobulinaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016; 29(2):136–47.
37. García-Sanz R, Dogliotti I, Zaccaria GM, Ocio EM, Rubio A, Murillo I, et al. 6q deletion in Waldenström macroglobulinaemia negatively affects time to transformation and survival. *Br J Haematol*. 2021; 192(5):843–52.
38. Chiu BCH, Hou N. Epidemiology and Etiology of Non-Hodgkin Lymphoma. In: Evens AM, Blum KA, editors. *Non-Hodgkin Lymphoma* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2024 Mar 10]. p. 1–25. (Cancer Treatment and Research; vol. 165). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-13150-4_1
39. Kristinsson SY, Rögnvaldsson S, Thorsteinsdóttir S, Reed ER, Oskarsson JTT, Petursdóttir I, et al. Screening for Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: A Population-Based Randomized Clinical Trial. First Results from the Iceland Screens, Treats, or Prevents Multiple Myeloma (iStopMM) Study. *Blood*. 2021; 138(Supplement 1):156–156.

40. Koshiol J, Gridley G, Engels EA, McMaster ML, Landgren O. Chronic Immune Stimulation and Subsequent Waldenström Macroglobulinemia. *Arch Intern Med.* 2008; 168(17):1903-9.
41. Kristinsson SY, Koshiol J, Björkholm M, Goldin LR, McMaster ML, Turesson I, et al. Immune-Related and Inflammatory Conditions and Risk of Lymphoplasmacytic Lymphoma or Waldenström Macroglobulinemia. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(8):557–67.
42. Kaushal A, Nooka AK, Carr AR, Pendleton KE, Barwick BG, Manalo J, et al. Aberrant Extrafollicular B Cells, Immune Dysfunction, Myeloid Inflammation, and MyD88-Mutant Progenitors Precede Waldenström Macroglobulinemia. *Blood Cancer Discov.* 2021; 2(6):600–15.
43. O’Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(5):353–64.
44. Minderman M, Lantermans H, Van Der Zwaan C, Hoogendijk AJ, Van Den Biggelaar M, Kersten MJ, et al. The oncogenic human B-cell lymphoma MYD88 L265P mutation genocopies activation by phosphorylation at the Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain. *Blood Cancer J.* 2023; 13(1):125.
45. Massari R, Fine JM, Metais R. Waldenström’s Macroglobulinæmia observed in Two Brothers. *Nature.* 1962; 196(4850):176–8.
46. Treon SP, Hunter ZR, Aggarwal A, Ewen EP, Masota S, Lee C, et al. Characterization of familial Waldenström’s macroglobulinemia. *Ann Oncol.* 2006; 17(3):488–94.
47. Altieri A, Bermejo JL, Hemminki K. Familial aggregation of lymphoplasmacytic lymphoma with non-Hodgkin lymphoma and other neoplasms. *Leukemia.* 2005; 19(12):2342–3.
48. Kristinsson SY, Goldin LR, Turesson I, Björkholm M, Landgren O. Familial Aggregation of Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia with Solid Tumors and Myeloid Malignancies. *Acta Haematol.* 2012; 127(3):173-7.
49. McMaster ML, Goldin LR, Bai Y, Ter-Minassian M, Boehringer S, Giambarresi TR, et al. Genomewide Linkage Screen for Waldenström Macroglobulinemia Susceptibility Loci in High-Risk Families. *Am J Hum Genet.* 2006; 79(4):695–701.

50. Liang XS, Caporaso N, McMaster ML, Ng D, Landgren O, Yeager M, et al. Common genetic variants in candidate genes and risk of familial lymphoid malignancies. *Br J Haematol.* 2009; 146(4):418–23.
51. McMaster ML, Berndt SI, Zhang J, Slager SL, Li SA, Vajdic CM, et al. Two high-risk susceptibility loci at 6p25.3 and 14q32.13 for Waldenström macroglobulinemia. *Nat Commun.* 2018; 9(1):4182.
52. Kristinsson SY, Bjorkholm M, Andersson TML, Eloranta S, Dickman PW, Goldin LR, et al. Patterns of survival and causes of death following a diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a population-based study. *Haematologica.* 2009; 94(12):1714–20.
53. Dalal NH, Dores GM, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Cause-specific mortality in individuals with lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinaemia, 2000–2016. *Br J Haematol.* 2020;189(6):1107–18.
54. Castillo JJ, Olszewski AJ, Cronin AM, Hunter ZR, Treon SP. Survival trends in Waldenström macroglobulinemia: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Blood.* 2014; 123(25):3999–4000.
55. Kristinsson SY, Eloranta S, Dickman PW, Andersson TML, Turesson I, Landgren O, et al. Patterns of survival in lymphoplasmacytic lymphoma/waldenström macroglobulinemia: A population-based study of 1,555 patients diagnosed in Sweden from 1980 to 2005. *Am J Hematol.* 2013; 88(1):60–5.
56. García-Sanz R, Montoto S, Torrequebrada A, De Coca AG, Petit J, Sureda A, et al. Waldenström macroglobulinaemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Haematol.* 2001; 115(3):575–82.
57. Kastritis E, Kyrtsolis MC, Morel P, Gavriatopoulou M, Hatjiharissi E, Symeonidis AS, et al. Competing risk survival analysis in patients with symptomatic Waldenström macroglobulinemia: the impact of disease unrelated mortality and of rituximab-based primary therapy. *Haematologica.* 2015; 100(11):e446–9.
58. Amaador K, Kersten MJ, Visser O, Posthuma EFM, Minnema MC, Vos JMI, et al. Conditional relative survival in Waldenström's macroglobulinaemia: a population-based study in The Netherlands. *Br J Haematol.* 2022; 196(5):1205–8.

59. Gertz MA, Anagnostopoulos A, Anderson K, Branagan AR, Coleman M, Frankel SR, et al. Treatment recommendations in Waldenstrom's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003; 30(2):121–6.
60. Buske C, Castillo JJ, Abeykoon JP, Advani R, Arulogun SO, Branagan AR, et al. Report of consensus panel 1 from the 11th International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia on management of symptomatic, treatment naïve patients. *Semin Hematol*. 2023; 60(2):73–9.
61. Castillo JJ, Advani RH, Branagan AR, Buske C, Dimopoulos MA, D'Sa S, et al. Consensus treatment recommendations from the tenth International Workshop for Waldenström Macroglobulinaemia. *Lancet Haematol*. 2020; 7(11):e827–37.
62. Tam CS, Opat S, D'Sa S, Jurczak W, Lee HP, Cull G, et al. A randomized phase 3 trial of zanubrutinib vs ibrutinib in symptomatic Waldenström macroglobulinemia: the ASPEN study. *Blood*. 2020; 136(18):2038–50.
63. Dimopoulos MA, Tedeschi A, Trotman J, Garcia-Sanz R, Macdonald D, Leblond V, et al. Phase 3 Trial of Ibrutinib plus Rituximab in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2018; 378(25):2399–410.
64. Garcia-Sanz R, Varettoni M, Jiménez C, Ferrero S, Poulain S, San-Miguel JF, et al. Report of Consensus Panel 3 from the 11th International workshop on Waldenström's Macroglobulinemia: Recommendations for molecular diagnosis in Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Hematol*. 2023; 60(2):90–6.
65. Ghobrial IM, Fonseca R, Greipp PR, Blood E, Rue M, Vesole DH, et al. Initial immunoglobulin M 'flare' after rituximab therapy in patients diagnosed with Waldenstrom macroglobulinemia: An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Cancer*. 2004; 101(11):2593–8.
66. Rodriguez S, Celay J, Goicoechea I, Jimenez C, Botta C, Garcia-Barchino MJ, et al. Preneoplastic somatic mutations including MYD88^{L265P} in lymphoplasmacytic lymphoma. *Sci Adv*. 2022; 8(3):eabl4644.
67. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998; 393(6685):595–9.

68. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, Maiso P, Moschetta M, Mishima Y, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood*. 2014; 123(26):4120–31.
69. Castillo JJ, Moreno DF, Arbelaez MI, Hunter ZR, Treon SP. CXCR4 mutations affect presentation and outcomes in patients with Waldenström macroglobulinemia: A systematic review. *Expert Rev Hematol*. 2019; 12(10):873–81.
70. Kaiser LM, Hunter ZR, Treon SP, Buske C. CXCR4 in Waldenström's Macroglobulinemia: chances and challenges. *Leukemia*. 2021; 35(2):333–45.
71. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*. 2003; 34(1):70–4.
72. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, 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(1):169–76.
73. Bagratuni T, Aktypi F, Theologi O, Sakkou M, Verrou KM, Mavrianou-Koutsoukou N, et al. Single-cell analysis of MYD88^{L265P} and MYD88^{WT} Waldenström macroglobulinemia patients. *HemaSphere*. 2024; 8(2):e27.
74. Roos-Weil D, Giacomelli B, Armand M, Della Valle V, Ghamlouch H, Decaudin C, et al. Identification of two DNA methylation subtypes of Waldenström's macroglobulinemia with plasma and memory B cell features. *Blood*. 2020; 136(5):585-595.
75. Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, Ferretti VV, Rizzo E, Malcovati L, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. 2017; 102(12):2077–85.
76. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Tsakmaklis N, Vos JM, Liu X, et al. Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2016; 128(6):827–38.

77. Jiménez C, Alonso-Álvarez S, Alcoceba M, Ordóñez GR, García-Álvarez M, Prieto-Conde MI, et al. From Waldenström's macroglobulinemia to aggressive diffuse large B-cell lymphoma: a whole-exome analysis of abnormalities leading to transformation. *Blood Cancer J.* 2017; 7(8):e591.
78. Poulain S, Roumier C, Bertrand E, Renneville A, Caillault-Venet A, Doye E, et al. TP53 Mutation and Its Prognostic Significance in Waldenström's Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(20):6325–35.
79. Roos-Weil D, Decaudin C, Armand M, Della-Valle V, Diop MK, Ghamlouch H, et al. A Recurrent Activating Missense Mutation in Waldenström Macroglobulinemia Affects the DNA Binding of the ETS Transcription Factor SPI1 and Enhances Proliferation. *Cancer Discov.* 2019; 9(6):796–811.
80. Guerrero ML, Tsakmaklis N, Xu L, Yang G, Demos M, Kofides A, 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(9):e408–11.
81. Maclachlan KH, Bagratuni T, Kastritis E, Ziccheddu B, Lu S, Yellapantula V, et al. Waldenström macroglobulinemia whole genome reveals prolonged germinal center activity and late copy number aberrations. *Blood Adv.* 2023; 7(6):971–81.
82. Treon SP, Gustine J, Xu L, Manning RJ, Tsakmaklis N, Demos M, et al. MYD88 wild-type Waldenström Macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *Br J Haematol.* 2018; 180(3):374–80.
83. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2015; 372(15):1430–40.
84. Treon SP, Gustine J, Meid K, Yang G, Xu L, Liu X, et al. Ibrutinib Monotherapy in Symptomatic, Treatment-Naïve Patients With Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol.* 2018; 36(27):2755–61.

85. Castillo JJ, Meid K, Gustine JN, Leventoff C, White T, Flynn CA, et al. Long-term follow-up of ibrutinib monotherapy in treatment-naive patients with Waldenstrom macroglobulinemia. *Leukemia*. 2022; 36(2):532–9.
86. Owen RG, McCarthy H, Rule S, D'Sa S, Thomas SK, Tournilhac O, et al. Acalabrutinib monotherapy in patients with Waldenström macroglobulinemia: a single-arm, multicentre, phase 2 study. *Lancet Haematol*. 2020; 7(2):e112–21.
87. Castillo JJ, Allan JN, Siddiqi T, Advani RH, Meid K, Leventoff C, et al. Venetoclax in Previously Treated Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 2022; 40(1):63–71.
88. Abeykoon JP, Paludo J, King RL, Ansell SM, Gertz MA, LaPlant BR, et al. MYD88 mutation status does not impact overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2018; 93(2):187–94.
89. Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013; 27(8):1722–8.
90. Jiménez C, Chillón MDC, Balanzategui A, Puig N, Sebastián E, Alcoceba M, et al. Detection of MYD88 L265P Mutation by Real-Time Allele-Specific Oligonucleotide Polymerase Chain Reaction. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014; 22(10):768–73.
91. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Rattotti S, Riboni R, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013; 121(13):2522–8.
92. Wu YY, Jia MN, Cai H, Qiu Y, Zhou DB, Li J, et al. Detection of the MYD88^{L265P} and CXCR4^{S338X} mutations by cell-free DNA in Waldenström macroglobulinemia. *Ann Hematol*. 2020; 99(8):1763–9.
93. Bagratuni T, Ntanas-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Mavrianou-Koutsoukou N, Liacos C, Patseas D, et al. Detection of MYD88 and CXCR4 mutations in cell-free DNA of patients with IgM monoclonal gammopathies. *Leukemia*. 2018; 32(12):2617–25.
94. Demos MG, Hunter ZR, Xu L, Tsakmaklis N, Kofides A, Munshi M, et al. Cell-free DNA analysis for detection of MYD88^{L265P} and CXCR4^{S338X}

- mutations in Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol.* 2021; 96(7). E250-3.
95. Bagratuni T, Markou A, Patseas D, Mavrianou-Koutsoukou N, Aktypi F, Liacos CI, et al. Determination of MYD88^{L265P} mutation fraction in IgM monoclonal gammopathies. *Blood Adv.* 2022; 6(1):189–99.
 96. Morley AA. Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif.* 2014;1(1):1-2.
 97. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96(16):9236–41.
 98. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal Chem.* 2011; 83(22):8604–10.
 99. Drandi D, Genuardi E, Dogliotti I, Ferrante M, Jiménez C, Guerrini F, et al. Highly sensitive MYD88^{L265P} mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica.* 2018; 103(6):1029–37.
 100. Ferrante M, Furlan D, Zibellini S, Borriero M, Candido C, Sahnane N, et al. MYD88^{L265P} Detection in IgM Monoclonal Gammopathies: Methodological Considerations for Routine Implementation. *Diagnostics.* 2021; 11(5):779.
 101. Morra E, Cesana C, Klersy C, Varettoni M, Cavanna L, Canesi B, et al. Predictive variables for malignant transformation in 452 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy. *Semin Oncol.* 2003; 30(2):172–7.
 102. Correa JG, Cibeira MT, Tovar N, Isola I, Pedrosa F, Díaz T, et al. Prevalence and prognosis implication of MYD88 L265P mutation in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2017; 179(5):849–51.
 103. Zanwar S, Abeykoon JP, Durot E, King R, Perez Burbano GE, Kumar S, et al. Impact of MYD88^{L265P} mutation status on histological transformation of Waldenström Macroglobulinemia. *Am J Hematol.* 2020; 95(3):274–81.
 104. Varettoni M, Zibellini S, Arcaini L, Boveri E, Rattotti S, Pascutto C, et al. MYD88 (L265P) mutation is an independent risk factor for progression in

- patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2013; 122(13):2284-5.
105. Hunter ZR, Manning RJ, Hanzis C, Ciccarelli BT, Ioakimidis L, Patterson CJ, et al. IgA and IgG hypogammaglobulinemia in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2010; 95(3):470–5.
106. Isola I, Moreno DF, Moga E, Mena MP, Tovar N, Rodríguez-Lobato LG, et al. Immunoparesis defined by heavy/light chain pair suppression in smoldering multiple myeloma shows initial isotype specificity and involves other isotypes in advanced disease. *Ann Hematol*. 2021; 100(12):2997–3005.
107. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, De Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007; 110(7):2586–92.
108. Rodríguez-Lobato LG, Fernández De Larrea C, Cibeira MT, Tovar N, Isola I, Aróstegui JI, et al. Prognostic impact of immunoparesis at diagnosis and after treatment onset in patients with light-chain amyloidosis. *Amyloid*. 2017; 24(4):238–45.
109. Isola I, Brasó-Maristany F, Moreno DF, Mena MP, Oliver-Calders A, Paré L, et al. Gene Expression Analysis of the Bone Marrow Microenvironment Reveals Distinct Immunotypes in Smoldering Multiple Myeloma Associated to Progression to Symptomatic Disease. *Front Immunol*. 2021; 12:792609.
110. Michallet M, Chapuis-Cellier C, Dejoie T, Lombard C, Caillon H, Sobh M, et al. Heavy+light chain monitoring correlates with clinical outcome in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2018; 32(2):376–82.
111. Rivas-Delgado A, Nadeu F, Enjuanes A, Casanueva-Eliceiry S, Mozas P, Magnano L, et al. Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Population-Based Study. *Clin Cancer Res*. 2021; 27(2):513–21.
112. Mithraprabhu S, Morley R, Khong T, Kalf A, Bergin K, Hocking J, et al. Monitoring tumour burden and therapeutic response through analysis of

circulating tumour DNA and extracellular RNA in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2019; 33(8):2022–33.

113. Kis O, Kaedbey R, Chow S, Danesh A, Dowar M, Li T, et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun*. 2017; 8(1):15086.