



Revisión

Gammopatías monoclonales y otros trastornos de células plasmáticas: el rol emergente de la espectrometría de masas

Monoclonal gammopathies and other plasma cell disorders: the emerging role of mass spectrometry

Gema García de la Rosa, Silvia de las Heras Flórez, Mercedes Carretero Pérez, Jorge Nuevo García

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife

Recibido: 04/07/2024
Aceptado: 20/10/2024

Correspondencia: Gema García de la Rosa. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Carretera General del Rosario, 145. 38010 Santa Cruz de Tenerife
e-mail: ggarrosg@gobiernodecanarias.org

Palabras clave:

Gammopatías monoclonales.
Macroglobulinemia de Waldenström.
Amiloidosis de cadenas ligeras. Proteína monoclonal. Espectrometría de masas.

RESUMEN

Las gammopatías monoclonales y otros trastornos de células plasmáticas son enfermedades que implican la proliferación anormal de células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas clonales. Históricamente, el diagnóstico y el seguimiento de estas condiciones han dependido de técnicas, como la electroforesis de proteínas y la inmunofijación, que identifican y caracterizan las proteínas monoclonales generadas por estas células.

Agradecimientos: los autores agradecen a la Asociación Española del Laboratorio Clínico por financiar a la primera autora mediante la beca de Rotación Internacional 2023, llevada a cabo en la Unidad de Proteínas de la Clínica Mayo como parte del programa Visiting Laboratory Professional Program.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

DOI: 10.20960/revmedlab.00222

García de la Rosa G, de las Heras Flórez S, Carretero Pérez M, Nuevo García J. Gammopatías monoclonales y otros trastornos de células plasmáticas: el rol emergente de la espectrometría de masas. Rev Med Lab 2024;5(3):86-98

En los últimos años, la espectrometría de masas se ha posicionado como una tecnología clave en este campo. Esta herramienta avanzada ofrece una capacidad sin precedentes para detectar, identificar, cuantificar e isotipar proteínas monoclonales de manera precisa y temprana, con una mayor sensibilidad y especificidad. Esto no solo mejora el diagnóstico inicial, sino que también facilita una monitorización continua y más efectiva de la progresión de la enfermedad.

Keywords:

Monoclonal gammopathies.
Waldenström's macroglobulinemia. Light chain amyloidosis. Monoclonal protein. Mass spectrometry.

ABSTRACT

Monoclonal gammopathies and other plasma cell disorders are diseases involving the abnormal proliferation of plasma cells and the production of clonal immunoglobulins. Historically, the diagnosis and monitoring of these conditions have relied on techniques such as protein electrophoresis and immunofixation, which identify and characterize the monoclonal proteins produced by these cells.

In recent years, mass spectrometry has emerged as a key technology in this field. This advanced tool offers unprecedented capability to detect, identify, quantify, and determine the isotype of monoclonal proteins accurately and early, with increased sensitivity and specificity. This not only enhances initial diagnosis but also facilitates continuous and more effective monitoring of disease progression.

INTRODUCCIÓN

En un sistema inmune sano, las células plasmáticas de la médula ósea producen diferentes tipos de inmunoglobulinas (Ig) (Fig. 1) durante su proceso de maduración. Estas Ig, que desempeñan un papel crucial en la defensa del organismo, se producen en una cantidad cuidadosamente regulada para evitar que un tipo específico domine sobre los demás (1).

En enfermedades como el mieloma múltiple (MM) y sus etapas precursoras (gammopatías monoclonales de significado incierto [GMSI] y mieloma múltiple quiescente o asintomático [MMq]), una línea de células plasmáticas produce una cantidad excesiva de una Ig específica. Esta Ig monoclonal adicional se conoce como *proteína monoclonal* (PM) o paraproteína. En la mayoría de los pacientes, esta PM es una Ig completa (ya sea IgG, IgA, IgM, IgD o, rara vez, IgE), aunque algunos solo producen la cadena ligera libre (CLL) y otros no producen ningún componente de Ig (mieloma no secretor) (1).

Además, otras enfermedades, como la enfermedad de Waldenström (MW) y la amiloidosis de cadenas ligeras (AL), pueden generar la producción de PM anormales, aunque con características clínicas y patológicas distintas. La figura 2 ofrece una representación visual integrada de la incidencia de estas enfermedades, junto con las principales gammopatías monoclonales.

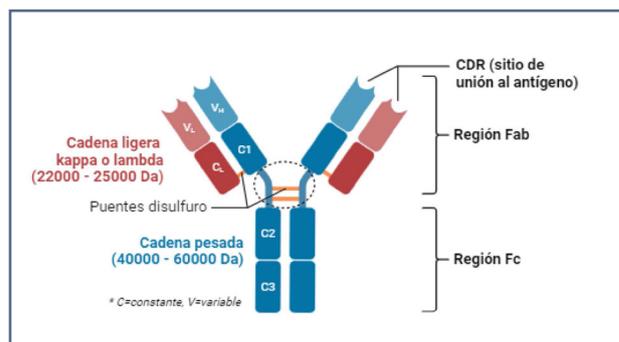


Figura 1 – Inmunoglobulina con características destacadas relevantes. CDR: región determinante de complementariedad (2).

Gammopatías monoclonales

La GMSI y el MMq son etapas previas al MM, consideradas premalignas porque no muestran síntomas atribuibles a la PM y por preceder la mayoría de los casos de MM hasta 8 años antes.

La GMSI, que generalmente se detecta de manera incidental durante el análisis de laboratorio, es relativamente común, con una prevalencia del 3 al 4 % en la población caucásica mayor de 50 años. Se define por la presencia de una PM de menos de 30 g/L y menos del 10 % de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea, si se realiza la biopsia (Tabla I).

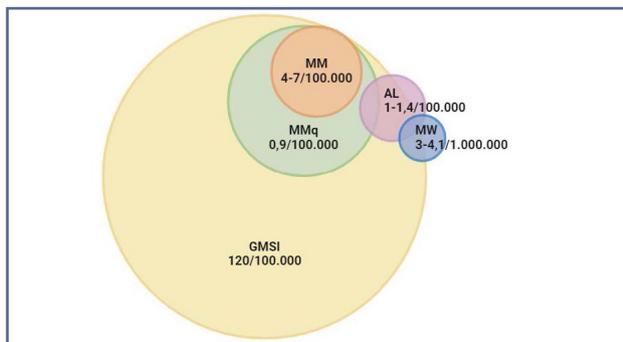


Figura 2 – Presentación esquemática de la incidencia de los trastornos relacionados de células plasmáticas. La gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) tiene una incidencia de aproximadamente 120 por 100 000 en personas mayores de 50 años; el mieloma múltiple quiescente (MMq) tiene una incidencia de aproximadamente 0,9 por 100 000 y el mieloma múltiple (MM) tiene una incidencia de 4 a 7 por 100 000. La amiloidosis de cadenas ligeras (AL) presenta una incidencia de 1 a 1,4 por 100 000 y la macroglobulinemia de Waldenström (MW) presenta una incidencia de 3 a 4 por cada millón de personas (3).

El MMq se considera una etapa intermedia entre GMSI y MM, caracterizada por una mayor cantidad de células plasmáticas en la médula ósea ($\geq 10\%$) o una mayor concentración de PM en el suero ($\geq 30\text{ g/L}$), pero sin síntomas de MM (Tabla I). El riesgo de progresión a MM es mayor al de las GMSI, aproximadamente un 10 % por año en los primeros 5 años después del diagnóstico.

El MM es la enfermedad maligna de células plasmáticas más frecuente y la segunda neoplasia hematológica más prevalente después del linfoma no Hodgkin. Se desarrolla principalmente en personas mayores, con una edad promedio de diagnóstico de 69 años. Es poco común en individuos menores de 40 años. Las células del mieloma residen en la médula ósea, donde pueden causar lesiones óseas y suprimir otras células. Sin embargo, la alta proporción de células plasmáticas en la médula ósea no es suficiente para diagnosticar el MM por sí solo, pues su diagnóstico se basa en la presencia de síntomas clínicos y hallazgos patológicos, como elevación del calcio sérico, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas líticas encapsulados bajo el acrónimo CRAB (4) (Tabla I).

Macroglobulinemia de Waldenström

La MW se clasifica dentro de los linfomas B indolentes y se caracteriza por la infiltración de la médula ósea por linfoma linfoplasmocítico, así como por la presencia de una PM IgM en el suero. Esta condición se manifiesta con síntomas relacionados tanto con la infiltración linfomatosa, como la anemia o el agrandamiento de ganglios linfáticos, como con síntomas asociados a la proteína IgM, tales como neuropatía, hemólisis o hiperviscosidad (5) (Tabla I).

Amiloidosis

La amiloidosis constituye un grupo de trastornos caracterizados por la deposición de fibrillas insolubles derivadas de proteínas mal plegadas en el espacio extracelular de varios órganos con la propiedad histológica patognomónica de birrefringencia verde cuando se observan bajo luz polarizada cruzada después de la tinción con rojo Congo (3). Aunque la amiloidosis puede afectar varios órganos y tejidos como riñones, sistema nervioso, hígado y tracto gastrointestinal, el corazón es uno de los órganos más afectados por la deposición de fibrillas, y la implicación cardíaca es el principal determinante de la supervivencia (Tabla I).

De entre los distintos tipos de amiloidosis, la AL es una enfermedad sistémica causada por la deposición anómala de CLL de Igs monoclonales (6). En la AL, el clon de células plasmáticas tiende a ser menos proliferativo y a secretar predominantemente, aunque no exclusivamente, CLL del tipo lambda. La incidencia de la AL es baja, de 1 a 2 casos por millón, con una edad de inicio más temprana en comparación con el MM. Aunque suelen presentarse de manera independiente, aproximadamente el 10 % de los casos de AL pueden coexistir con MM (3).

DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO EN EL LABORATORIO CLÍNICO

El diagnóstico y el seguimiento de las gammapatías monoclonales se han abordado históricamente mediante métodos tradicionales como la electroforesis de proteínas séricas (SPEP, por sus siglas en inglés) e inmunofijación (IFE, por su sigla en inglés) en suero, la medición de CLL en suero y la cuantificación de Ig totales. Sin embargo, el avance tecnológico ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías, con la espectrometría de masas emergiendo como una poderosa alternativa. Este enfoque innovador ofrece ventajas significativas en términos de sensibilidad y especificidad. Promete una mejora sustancial en la detección temprana, la monitorización y la caracterización detallada de estas condiciones.

MÉTODOS TRADICIONALES

Como pruebas individuales, las CLL, la SPEP y la IFE pueden detectar el 74 %, 79 % y 87 % de las Ig monoclonales, respectivamente. Sin embargo, al combinar las tres pruebas, la capacidad diagnóstica se eleva significativamente, detectando hasta el 98,6 % de las PM (4).

Tabla I.
Criterios diagnósticos y características clínicas de las principales gammopatías monoclonales, la macroglobulinemia de Waldenström y la amiloidosis de cadenas ligeras (47-52)

	Gammapatía monoclonal de significado incierto	Mieloma múltiple quiescente	Mieloma múltiple	Enfermedad de Waldenström	Amiloidosis de cadenas ligeras
Proteína monoclonal	IgG o IgA monoclonal en suero < 30 g/L* - Alrededor de un tercio presenta ratios alterados de cadenas ligeras libres	IgG o IgA monoclonal en suero ≥ 30 g/L o proteína monoclonal en orina ≥ 500 mg/día* - Alrededor de un 70 % presenta ratios alterados de cadenas ligeras libres	No-IgM monoclonal en suero ≥ 30 g/L - El IMM no secretor se define por la ausencia de proteína monoclonal en suero u orina y por no presentar anomalías detectables en la inmunofijación del suero o la orina - Más de un 90 % presenta ratios alterados de cadenas ligeras libres	Gammapatía monoclonal de IgM detectable (independientemente de la cantidad de la proteína monoclonal)*	Evidencia de un trastorno proliferativo de células plasmáticas monoclonales (proteína monoclonal en suero u orina, relación anormal de cadenas ligeras libres o células plasmáticas clonales en la médula ósea)*
Infiltración médula ósea	< 10 % de células plasmáticas clonales en la médula ósea*	10-60 % de células plasmáticas clonales en la médula ósea*	≥ 10 % de células plasmáticas clonales en la médula ósea o plasmocitoma probado por biopsia*	Infiltración con diferenciación de células plasmáticas y características linfoplasmocíticas o de linfoma linfoplasmocítico (independientemente del porcentaje)*	Tinción positiva de amiloide con rojo Congo en cualquier tejido (por ejemplo, aspirado de grasa, médula ósea o biopsia de órgano)*
Daño a órganos / síntomas	Ningún evento definitivo de mieloma o amiloidosis*	Ningún evento definitivo de mieloma o amiloidosis*	Uno o más de los siguientes eventos definitivos de mieloma*: - Uno o más de los caracterizados por CRAB: • Hipercalcemia: calcio sérico > 0,25 mmol/L (> 1 mg/dL) por encima del límite superior de normalidad o > 2,75 mmol/L (> 11 mg/dL) • Insuficiencia renal: aclaramiento de creatinina < 40 mL por min o creatinina sérica > 177 µmol/L (> 2 mg/dL) • Anemia: hemoglobina > 2 g/dL por debajo del límite inferior de lo normal o hemoglobina < 10 g/dL • Lesiones óseas: una o más lesiones osteolíticas en radiografía esquelética, TC o PET-CT - Uno o más de los siguientes biomarcadores de malignidad (BOM): • Porcentaje de células plasmáticas clonales en médula ósea ≥ 60 % • Relación de cadenas ligeras libres séricas involucradas: no involucradas ≥ 100 • Más de una lesión focal esquelética	Anemia, hiperviscosidad, esplenomegalia, hipogammaglobulinemia y pruebas de función renal y hepática anormales • Renal (a menudo proteinuria) • Cardíaco • Hepático • Nervioso (periférico o autónomo) • Tejidos blandos	Cualquier disfunción inducida por depósito de fibrillas de amiloide en los órganos: • Renal (a menudo proteinuria) • Cardíaco • Hepático • Nervioso (periférico o autónomo) • Tejidos blandos

(Continúa en página siguiente)

Tabla I (cont.).
Criterios diagnósticos y características clínicas de las principales gammapatías monoclonales, la macroglobulinemia de Waldenström y la amiloidosis de cadenas ligeras (47-52)

	Gammapatía monoclonal de significado incierto	Mieloma múltiple quiescente	Mieloma múltiple	Enfermedad de Waldenström	Amiloidosis de cadenas ligeras
Isotipos de inmunoglobulinas	IgG, 59 % IgA, 12 % IgM, 18 % IgD, 0.5 % Biclonal, 5 % Cadena ligera, 6 %	NA	IgG, 52 % IgA, 21 % IgM, 0.5 % IgD, 2 % Biclonal, 2 % Cadena ligera, 20 % No secretor, 3 %	IgM, 100 % El 80 % se trata de cadenas ligeras κ	La proporción de cadenas ligeras de kappa:lambda es de 1:3
Factores de riesgo de progresión	Relación anormal de cadenas ligeras libres MGUS no-IgG Proteína monoclonal ≥ 1,5 g/dL	Relación de cadenas ligeras libres > 20 Porcentaje de células plasmáticas clonales en la médula ósea > 20 % Proteína monoclonal > 2 g/dL	NA	NA	NA
Riesgo de progresión	1 % por año en general 5 %, 21 %, 37 % y 58 % a los 20 años cuando están presentes ninguno, uno, dos y tres factores de riesgo, respectivamente	10 % por año (en los primeros 5 años de seguimiento), 1-2 % por año (años restantes)	Aproximadamente el 80 % de los mieloma múltiple se origina a partir de MGUS no IgM y el 20 % de MGUS, de cadenas ligeras	NA	NA

* Criterios diagnósticos.

Electroforesis de proteínas e inmunofijación

La SPEP ha sido una prueba de detección tradicional y confiable para la detección de PM desde sus primeros usos en la década de los años treinta del siglo pasado (7). La SPEP normal deriva en una amplia banda gaussiana en la región catódica gamma, indicativa de la presencia de diversas Ig debido a los miles de clones de Ig secretados por las células plasmáticas normales. En el MM y sus etapas precursoras, la PM puede distinguirse como un pico elevado sobre el fondo policlonal gaussiano en el patrón de migración de la electroforesis (1) (Fig. 3).

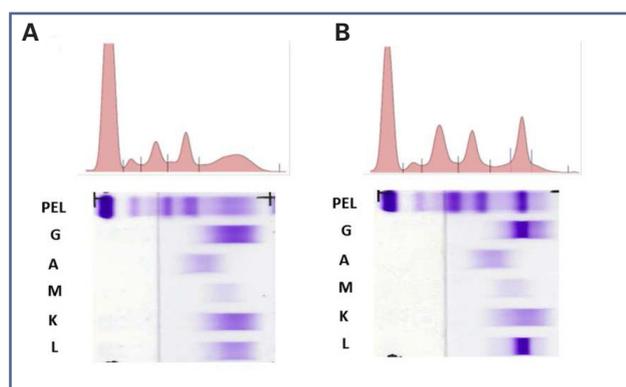


Figura 3 – Ejemplos de electroforesis de proteínas séricas (arriba) e inmunofijación (abajo) normal (A) y anormal (B). En la región gamma normal (A), se aprecia una migración amplia del fondo de inmunoglobulina policlonal, mientras que en la anormal (B) se observa una proteína monoclonal. La inmunofijación revela un isotipo IgG lambda (2).

La SPEP puede realizarse utilizando gel de agarosa o electroforesis capilar. La cuantificación se logra mediante la integración del pico de la PM en el electroferograma. Actualmente se utilizan dos métodos: corte perpendicular y corte tangencial (8). Sin embargo, el método más aceptado por los laboratorios sigue siendo el corte perpendicular (9).

La mayoría de las PM migran en la región gamma, por lo que la medición del pico mediante corte perpendicular captura necesariamente Ig policlonales que están presentes en la misma posición. En el momento del diagnóstico de MM, el pico de PM suele ir acompañado de la supresión de las Ig policlonales normales, lo que hace que la medición utilizando esta técnica sea lo suficientemente precisa y reproducible como para proporcionar una medida útil de la carga tumoral. Sin embargo, en el caso de PM de tamaño pequeño o moderado, como las que se encuentran en la mayoría de los pacientes con GMSI, o al seguir la respuesta a la terapia en pacientes con MM, la presencia de Ig policlonales que comigran crea una sobreestimación significativa (10).

Otro desafío importante surge cuando las PM no migran en la fracción gamma y comigran con otras proteínas como transferrina, β -lipoproteína y C3 hacia la región anódica. Este problema afecta principalmente a la IgA, que migra típicamente en la región β hasta en un 30 % de los casos (11). Sin embargo, otros isotipos ocasionalmente migran en las regiones β o α . Aunque este fenómeno rara vez obstaculiza el diagnóstico, puede plantear dificultades al intentar seguir el pico a lo largo del tiempo como indicador de la carga de la enfermedad o la respuesta al tratamiento (12). Reconociendo estos problemas, las pautas del International Myeloma Working Group (IMWG) de 2014 recomiendan medir la IgA total en lugar del pico de PM para seguir a los pacientes con proteínas de este isotipo que migran en la región β (13). Otra alternativa es la medición nefelométrica de los pares de cadenas pesadas / ligeras para IgA (IgA kappa por separado de IgA lambda), que Katzmann y cols. han demostrado que proporcionan resultados superiores a la combinación de SPEP, IFE y a la cuantificación de IgA total (14).

Cuando se sospecha la presencia de un pico en una SPEP, el procedimiento estándar es confirmar que la anomalía corresponde con una PM. Durante muchos años, la IFE en suero ha sido el estándar de oro para confirmar y caracterizar la detección inicial (7). La IFE mejora la sensibilidad de la SPEP aproximadamente 10 veces (de un límite de detección de 1,0 g/L en la SPEP a aproximadamente 0,1 g/L en la IFE); por lo tanto, una SPEP negativa o inconclusa debería ser seguida por una IFE si hay un alto índice de sospecha de MM o una enfermedad de células plasmáticas relacionada. Aunque la IFE puede determinar el isotipo de la PM, no debe usarse para su cuantificación (12).

En la práctica actual, la IFE suele realizarse con anti-sueros para IgG, IgA, IgM, kappa total y lambda total. Si se visualiza una CLL monoclonal sin una cadena pesada correspondiente, debe realizarse un gel de inmunofijación adicional con anti-sueros para identificar la posible presencia de cadenas pesadas de IgD o, muy raramente, IgE.

Tanto la electroforesis de proteínas en orina (UPEP) como la IFE en orina son herramientas útiles para identificar la presencia de proteinuria de Bence-Jones, es decir, CLL de una Ig monoclonal filtradas en el riñón. Una recolección de orina de 24 horas permite la cuantificación tanto de la albúmina como de la PM que ha sido eliminada rápidamente por los riñones. Sin embargo, el uso de ensayos de CLL séricas ha reducido la necesidad de ensayos electroforéticos de orina para la detección y la cuantificación de cadenas ligeras monoclonales cuando se sospecha de MM (11). El Grupo de Trabajo Internacional sobre Mieloma Múltiple (IMWG) ahora sugiere usar CLL séricas como parte de los crite-

rios de *screening* en combinación con la SPEP e IFE en suero en lugar de la UPEP y la IFE en orina si se sospechan gammapatías monoclonales distintas de la AL. En consecuencia, la solicitud de pruebas de orina se ha vuelto en gran medida innecesaria en la mayoría de los casos de MM, salvo en situaciones específicas, como la detección de proteinuria de Bence-Jones o casos de "escape de cadenas ligeras".

Cadenas ligeras libres en suero

A principios de la década de los 2000 se desarrolló un ensayo que medía las CLL de Ig en suero. Los anticuerpos policlonales reaccionan solo con aquellos epítomos que están ocultos cuando están unidos a la cadena pesada, pero que están disponibles cuando no están asociados con la cadena pesada. Este ensayo ha pasado a la práctica clínica basado en la creciente evidencia de su utilidad, aunque existen limitaciones técnicas de la prueba que hacen que su uso como medición seriada pueda ser problemático, incluyendo: variación de lote a lote e imprecisión del ensayo (15).

Para el diagnóstico se recomienda cuantificar tanto las concentraciones de CLL kappa y lambda y usar su relación para detectar síntesis desequilibrada de cadenas ligeras. Aunque la tasa de síntesis de kappa a lambda es aproximadamente de 1,8:1, la eliminación rápida de CLL kappa desplaza la mediana de la relación CLL kappa/lambda a 0,9 (0,26-1,65).

Se han detectado relaciones anormales de CLL séricas en el 100 % de los pacientes con MM de cadenas ligeras, en el 80-95 % de los pacientes con AL y en el 60-70 % de los pacientes con MM no secretor. Las relaciones anormales de CLL sérico se han detectado en el 90-95 % de los MM de Ig intacta y en el 40 % de los MGUS.

Inmunoglobulinas totales

Tanto la nefelometría como la turbidimetría utilizan la formación de complejos inmunes anticuerpo-antígeno para medir las concentraciones de Ig. Estos métodos miden tanto Ig monoclonales como policlonales, por lo que su uso diagnóstico para la identificación de PM no se recomienda. Sin embargo, la cuantificación de Igs es más útil que la SPEP para la detección de hipogammaglobulinemia (11).

MÉTODOS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La sensibilidad de las metodologías tradicionales es limitada (15). Gracias a los avances en el tratamiento

de los trastornos de células plasmáticas, más pacientes están logrando negatividad serológica con estas técnicas. Sin embargo, los resultados para quienes alcanzan la respuesta completa son variados y la mayoría recae eventualmente.

Se han realizado importantes esfuerzos en desarrollar pruebas más sensibles basadas en médula ósea para detectar la enfermedad mínima residual (MRD, por sus siglas en inglés). Estas pruebas pueden identificar una célula neoplásica entre 100 000 y 1 000 000 células y han demostrado tener valor pronóstico (16). Por esta razón se incorporaron a los criterios actualizados de la IMWG para la evaluación de la respuesta y la MRD en el mieloma en 2016 (17). Los pacientes con negatividad sostenida de MRD tienen una supervivencia libre de progresión más prolongada que aquellos que experimentan la reaparición de positividad de MRD en 12-24 meses (18).

Sin embargo, su aplicación en la práctica clínica es limitada debido al alto costo y a la necesidad de experiencia especializada. Además, las evaluaciones de médula ósea son procedimientos invasivos y dolorosos, y no pueden medir la respuesta de la enfermedad extramedular, presente en el 2,4-20 % de los pacientes con MM (19).

Por lo tanto, se ha llevado a cabo una extensa investigación para identificar formas más sensibles, no invasivas y prácticas de monitorizar las respuestas terapéuticas en sangre periférica. Los ensayos de espectrometría de masas (EM) están emergiendo como un método potencialmente adecuado. Se han desarrollado diversas metodologías que obtienen diferentes rendimientos analíticos y consideraciones prácticas respecto a su idoneidad potencial como reemplazo de las técnicas electroforéticas (Fig. 4). En todos los casos se realiza un proceso de enriquecimiento inmunológico antes del análisis para purificar las Ig y eliminar las proteínas no relacionadas, lo que mejora la sensibilidad (20). Los enfoques principales en EM se dividen en dos categorías: *bottom-up* y *top-down*. El enfoque *bottom-up* implica la digestión proteolítica de las inmunoglobulinas en fragmentos más pequeños (péptidos) antes de la identificación por EM. Por otro lado, el enfoque *top-down* analiza las proteínas intactas sin digestión previa, lo que permite una caracterización más directa de variantes y modificaciones posraduccionales. Ambas estrategias tienen aplicaciones en la caracterización y en la monitorización de PM.

Enfoque del péptido clonotípico

El enfoque del péptido clonotípico se basa en la identificación de péptidos específicos de la región determinante de complementariedad (CDR) de la Ig, que son

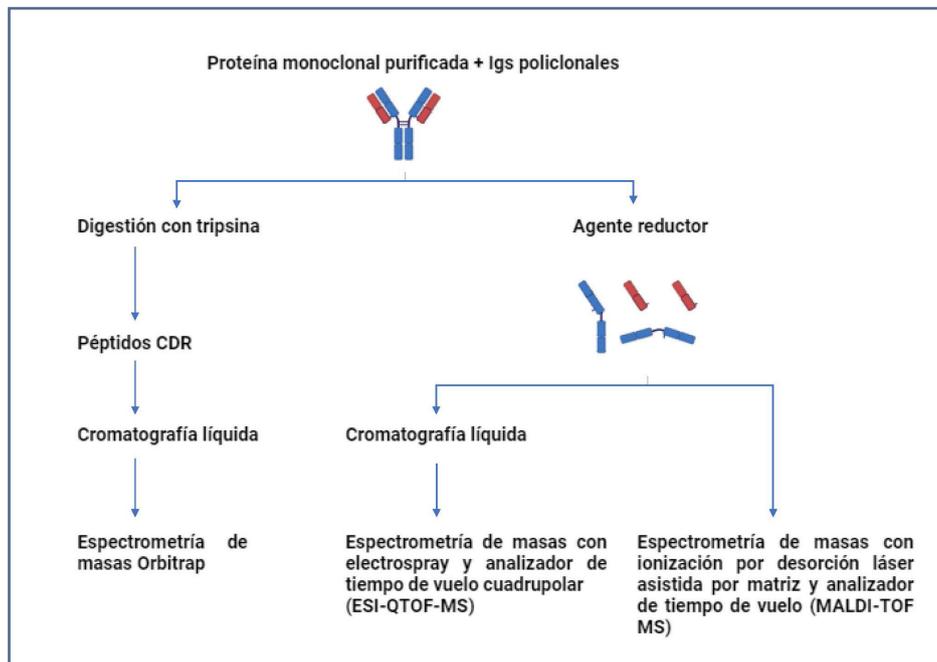


Figura 4 – Representación esquemática de los métodos publicados basados en espectrometría de masas para detectar proteína monoclonal. CDR: región determinante de complementariedad; ESI-QTOF-MS: espectrometría de masas con electrospray y analizador de tiempo de vuelo cuadrupolar; MALDI-TOF MS: espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (1).

únicos para la PM de cada paciente. Para ello, las Ig purificadas se digieren proteolíticamente con tripsina para generar fragmentos más pequeños. Los péptidos resultantes de la digestión se secuencian para identificar aquellos que son únicos, llamados péptidos clonotípicos, y que presentan sustituciones únicas de aminoácidos.

En todos los estudios realizados utilizando este enfoque de péptido clonotípico se detectaron PM asociadas a la enfermedad en el suero de pacientes tratados con MM que no fueron detectadas por técnicas electroforéticas tradicionales (21). Con esta técnica, es posible detectar PM incluso cuando no se expresan por encima del fondo policlonal, por lo que este método podría ser el más sensible (1). Estos resultados sugieren que el método de péptido clonotípico podría ser una metodología viable para la MRD (21) y para eliminar interferencias de las terapias con anticuerpos monoclonales (t-mAb, por sus siglas en inglés) (22).

La selección de los péptidos de CDR adecuados para cada paciente con MM es un proceso relativamente sofisticado y que actualmente lleva de 4 a 5 semanas (23). Además, es necesario identificar y verificar un péptido único de la región CDR de la PM, lo que puede ser complicado y, en algunos casos, imposible, especialmente cuando las concentraciones de la PM son bajas (2).

Esto, junto con los posibles reordenamientos de CDR, justifican la dificultad de su implementación en laboratorios clínicos rutinarios, incluso aunque se trate de un método analíticamente sensible (24). Además, la complejidad general del método y su largo tiempo preanalítico hacen que este enfoque sea poco práctico como método de cribado para PM (20).

Enfoque de cadena ligera intacta de inmunoglobulina

Un segundo enfoque para detectar PM utiliza el método de cadena ligera (CL) intacta, en el que las moléculas de Ig se reducen químicamente en cadenas pesadas y ligeras. Se analiza la distribución de masa de las CL para identificar la presencia de PM, que se presentan como picos en la distribución masa/carga de las CL, similar a las detecciones electroforéticas (2).

El desarrollo inicial del método de CL intacta, denominado *mediciones rápidas y precisas de masa de Ig monoclonal* (miRAMM, de sus siglas en inglés), se centró en el enriquecimiento de Igs mediante reducción química seguido de cromatografía líquida con ionización por electrospray y EM de tiempo de vuelo (TOF) en cuadrupolo. A diferencia de la electroforesis, la dis-

tribución masa/carga de las CL produce dos distribuciones amplias y distintas: una para kappa y otra para lambda, lo que mejora la especificidad del enfoque.

Utilizando miRAMM, el límite de detección de la PM se mejora en comparación con la electroforesis y la masa molecular precisa de la CL de la PM (medida dentro de 1 Da) podría utilizarse como biomarcador personalizado para el seguimiento de la enfermedad a lo largo de los años tanto en suero como en orina (25). Sin embargo, el método miRAMM también requiere equipos costosos y mayor experiencia para ejecutar las muestras (20). Aunque este método mejoró significativamente el tiempo analítico en comparación con el método de péptidos clonotípicos, los tiempos de análisis de 20 minutos no son adecuados para el volumen de pruebas para el cribado de PM (1).

Para abordar estas limitaciones, se modificó el método miRAMM eliminando la cromatografía y sustituyéndola por EM con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)-TOF. El ensayo utiliza cinco enriquecimientos inmunológicos separados de Ig séricas para IgG, IgA, IgM, kappa y lambda. Después de la elución y de la reducción de cada enriquecimiento en cadenas pesadas y ligeras, estas se dispensan en una placa de acero inoxidable junto con una matriz para su posterior ionización con láser. El tiempo de análisis es bastante rápido y los resultados pueden obtenerse en 20 segun-

dos para cada paciente. Los gráficos resultantes muestran las distribuciones masa/carga de los aislados de kappa y lambda (26).

En un paciente sano, las distribuciones masa/carga de lambda son cercanas a las gaussianas (Fig. 5A), mientras que las distribuciones masa/carga de kappa consisten en dos distribuciones gaussianas (Fig. 5B). En un paciente con una PM puede observarse un pico en la distribución masa/carga de las CL. Al examinar los cinco espectros, puede determinarse el isotipo de la PM (1). Además, los enriquecimientos inmunológicos también eliminan proteínas interferentes, como las proteínas β -migrantes y el fibrinógeno, que han dificultado la detección de PM mediante técnicas electroforéticas (2). Cuando se combina con la cuantificación de las Ig, el ensayo Mass-Fix puede, además, cuantificar simultáneamente la PM (27). Esto se logra mediante un algoritmo matemático que descarta el fondo policlonal de la cuantificación, lo que lo hace más preciso que las técnicas convencionales que utilizan cortes rectos.

MASS-FIX es el ensayo desarrollado por la Clínica Mayo que ha reemplazado la SPEP e IFE sérica en su laboratorio clínico tras la aprobación de su uso en lugar de la IFE por el IMWG (28). Sin embargo, EXENT/QIPMS es el primer ensayo comercial desarrollado por The Binding Site Ltd. (20).

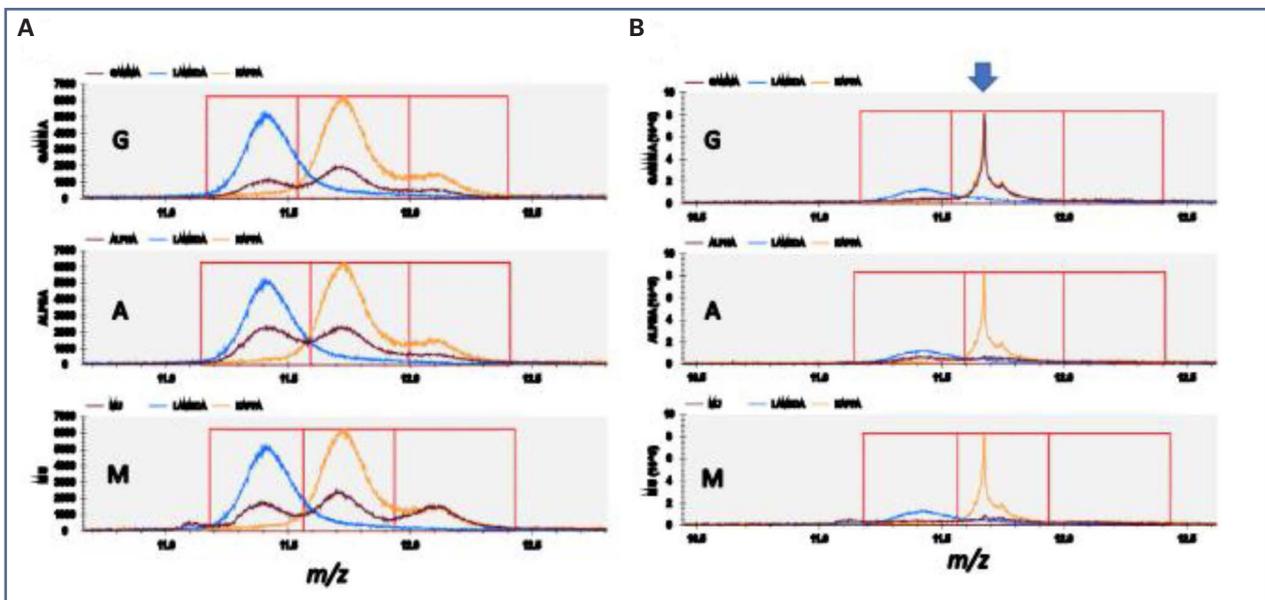


Figura 5 – Espectros MASS-FIX de (A) suero humano sano con distribuciones gaussianas, cadenas ligeras para todos los enriquecimientos inmunológicos (IgG [arriba], IgA [medio], IgM [abajo], kappa [naranja, todos los espectros] y lambda [azul, todos los espectros]) y (B) paciente con MM de IgG kappa que muestra un pico no gaussiano en la distribución de masa de cadenas ligeras asociadas con IgG (arriba), junto con el mismo pico en la distribución de masa total de cadenas ligeras kappa (naranja). En tres de los gráficos se muestran las distribuciones masa/carga de las CL que alguna vez estuvieron unidas a una IgG, IgA o IgM, respectivamente, y en todos los gráficos se muestran las distribuciones masa/carga de las CL kappa y lambda totales para replicar el formato de la IFE. El recuadro rojo grande representa el rango esperado para las cadenas ligeras de Ig. Murray DL y cols. (1).

Beneficios de la espectrometría de masas

Eficiencia

Los métodos actuales de SPEP e IFE son relativamente menos automatizados en comparación con otras pruebas de laboratorio. El ensayo MALDI-TOF, con su rápido tiempo de análisis, ofrece la posibilidad a los laboratorios clínicos de aumentar el número de resultados de pacientes por técnico de laboratorio (1). Un solo usuario puede procesar 320 muestras en un turno de 8 horas, algo impensable de asumir realizando SPEP e IFE, y que posibilita un 30 % más de cantidad de muestras/técnico/día (29). Además, el proceso mantiene una trazabilidad de las muestras, reduce el pipeteo manual, permite un seguimiento digital y mejora significativamente el tiempo de respuesta (30).

Sin embargo, se necesita un esfuerzo significativo para integrar el ensayo en el sistema de información del laboratorio, desarrollar un *software*, adquirir los equipos necesarios y capacitar a los técnicos de laboratorio para interpretar los resultados (1).

Sensibilidad y especificidad

Las evaluaciones intra- e interensayo de la sensibilidad analítica y la precisión de la cuantificación de PM utilizando los ensayos MALDI-TOF han demostrado que las PM pueden identificarse y cuantificarse con precisión hasta niveles de 0,05 a 0,1 g/L (31), significativamente más bajos que los alcanzados por técnicas tradicionales como SPEP, que tiene un límite inferior de detección, de aproximadamente 10 g/L (32). MALDI-TOF ha demostrado tener una sensibilidad analítica y clínica superior en comparación con SPEP e IFE y una sensibilidad clínica comparable a un panel de SPEP/IFE/CLL (33). Estas propiedades hacen que MALDI-TOF sea adecuado para su uso en laboratorios clínicos de rutina (20).

Giles y cols. (34) utilizaron MALDI-TOF ML para reexaminar a pacientes con MM no secretor. El estudio encontró que el 91 % de los casos clasificados como MM no secretor mediante pruebas tradicionales tenían una PM detectable por MALDI-TOF, lo que indica que la mayoría de los pacientes actualmente descritos como MM no secretor tienen una secreción de PM de bajo nivel en lugar de una no producción. Los ensayos de ML deberían permitir que una proporción significativa de pacientes con esta condición se definan como pacientes con enfermedad medible mediante ML, lo que llevaría a una mejor monitorización de la enfermedad.

Uno de los beneficios de usar EM sobre la SPEP e IFE en suero es la capacidad de determinar una caracterís-

tica fundamental de la PM, su masa de CL, que permite una descripción más específica de la PM que la disponible actualmente. Por lo tanto, en pruebas de seguimiento o si el paciente es examinado en otro laboratorio, la detección de la PM puede realizarse de manera más específica (1).

Aunque es posible que las distribuciones masa/carga de la PM y del t-mAb se superpongan, los estudios han revelado que aproximadamente el 85 % de las veces esta interferencia puede resolverse mediante MALDI-TOF (35). El uso del método miRAMM, de mayor resolución, ha sido capaz de resolver todos los casos que se han probado (36,37). Sin embargo, los métodos actuales para eliminar la interferencia del t-mAb en la IFE requieren el uso de un anticuerpo anti-t-mAb (38). Así, para cada nuevo t-mAb se necesita crear un anti-t-mAb. No obstante, usando EM, a medida que se disponen de nuevos t-mAb para el tratamiento, los laboratorios pueden identificar la masa de la CL del t-mAb basándose en su peso molecular único, lo que facilita su identificación en función de su relación masa/carga (39).

Nuevos marcadores de riesgo

Los ensayos MALDI-TOF han revelado características estructurales de las PM que no se habían apreciado anteriormente utilizando técnicas electroforéticas. En particular, se encontraron PM con CL que tenían su masa fuera del rango esperado. Estas CL presentaban N-glicosilación (40).

Se encontró que los pacientes con glicosilación de CL de IgG e IgA tenían un mayor riesgo de desarrollar trastornos de células plasmáticas, especialmente AL, en comparación con los pacientes sin glicosilación de CL (41) (Fig. 6). Los pacientes con glicosilación de CL de IgM presentaban un riesgo de desarrollar enfermedad de aglutininas frías (42,43).

Rol en la enfermedad mínima residual

La EM está ganando relevancia como método para la evaluación de la MRD en sangre periférica. Ofrece una alternativa menos invasiva en comparación con las pruebas tradicionales de médula ósea. Mientras que la secuenciación de última generación (NGS) y la citometría de flujo multiparamétrica (NGF) son los métodos recomendados por el IMWG para el seguimiento de la MRD en médula ósea (17), estudios recientes sugieren que la EM en suero puede ofrecer una sensibilidad comparable. Derman y cols. demostraron una alta correlación entre la detección de la MRD en sangre periférica mediante EM y la detección en médula ósea utilizando NGS y NGF (44).

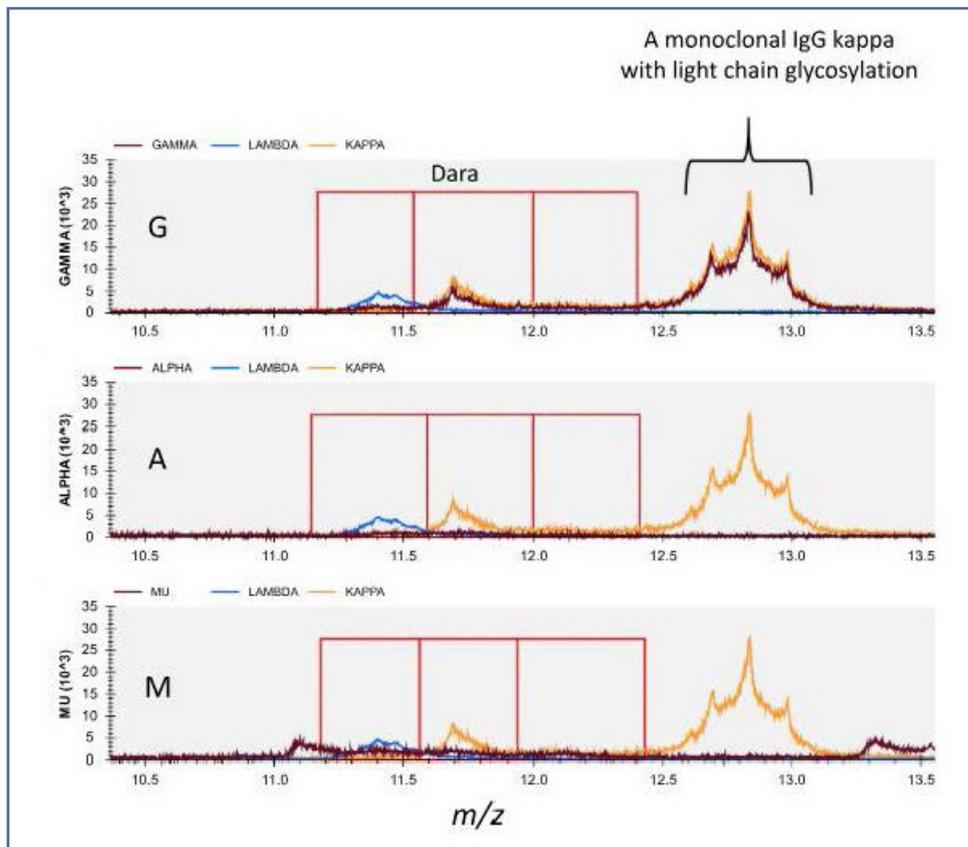


Figura 6 – Ejemplo de un paciente tratado con mieloma múltiple IgG kappa con daratumumab que presenta una cadena ligera glicosilada. El recuadro rojo grande representa el rango esperado para la distribución masa/carga para las cadenas ligeras de Ig lambda (izquierda) y kappa (centro y derecha). Las cadenas ligeras glicosiladas presentan un desplazamiento de masa fuera del rango esperado y muestran múltiples picos asociados con diversos motivos de glicosilación. Murray DL y cols. (1).

Además, Woodruff y cols. compararon la EM con NGS y NGF y destacaron que, aunque estas técnicas tradicionales siguen siendo fundamentales para la evaluación en médula ósea, la EM en sangre periférica ha demostrado detectar la presencia de enfermedad en pacientes que previamente eran negativos en las pruebas de médula ósea (45).

Otros estudios y ensayos clínicos han mostrado que la EM es capaz de detectar niveles muy bajos de PM, con sensibilidades comparables a las técnicas de médula ósea (46). Sin embargo, comparar las respectivas sensibilidades de los métodos de EM con las pruebas de médula ósea no es sencillo, ya que estos últimos calculan la sensibilidad en función del número de células plasmáticas por evento.

Además, usar una PM como marcador para MRD presenta algunas dificultades inherentes. La cantidad de PM en el suero depende de la tasa de síntesis de Ig por las células plasmáticas malignas. Sin embargo, no hay una forma directa de determinar esta tasa y podría

cambiar con el tratamiento. Además, las PM pueden reciclarse y su vida media varía según el isotipo, por lo que la detección de niveles bajos de PM podría deberse al reciclaje de Ig y no a la enfermedad activa. Por el contrario, las pruebas de médula ósea pueden complicarse por la naturaleza parcheada de la enfermedad y la enfermedad extramedular.

La evidencia actual sugiere que la detección de PM en suero por EM y la evaluación de la MRD en médula ósea son métodos complementarios cuyos resultados deben considerarse como parte de un enfoque multimodal (1).

CONCLUSIÓN

Esta revisión examina las limitaciones de las metodologías tradicionales en la detección y en el seguimiento de los trastornos relacionados de células plasmáticas, destacando la sensibilidad limitada de técnicas como la SPEP y la IFE. Se ha investigado extensamente el

potencial de la EM como método para superar estas limitaciones, que ha demostrado ser más sensible y específica en la detección de PM, incluso a niveles bajos no detectables por las técnicas convencionales.

Los métodos basados en EM, como el análisis de péptidos clonotípicos y CL intactas, han mostrado ser particularmente prometedores. A pesar de enfrentarse a desafíos como el alto costo y la necesidad de equipos especializados, la EM ofrece beneficios significativos en términos de eficiencia y precisión para transformar potencialmente la evaluación y el manejo de los trastornos relacionados con células plasmáticas en entornos clínicos.

Específicamente, la técnica de EM MALDI-TOF ha emergido como una alternativa prometedora aplicable en la práctica clínica diaria. Ha demostrado una sensibilidad analítica y clínica superior en comparación con la SPEP e IFE y una sensibilidad clínica comparable a un panel de SPEP/IFE/CLL. MALDI-TOF también ha mostrado ser capaz de resolver interferencias causadas por t-mAb, como el daratumumab, que hasta ahora han representado un desafío significativo para las técnicas tradicionales. Además, los ensayos MALDI-TOF han revelado características estructurales de las PM que no se habían apreciado anteriormente con técnicas electroforéticas, lo que ha permitido la identificación de nuevos marcadores de riesgo para AL y enfermedad de aglutininas frías.

BIBLIOGRAFÍA

- Murray DL. Bringing mass spectrometry into the care of patients with multiple myeloma. *Int J Hematol* 2022;115(6):790-8. DOI: 10.1007/s12185-022-03364-2
- Murray DL, Dasari S. Clinical Mass Spectrometry Approaches to Myeloma and Amyloidosis. *Clin Lab Med* 2021;41(2):203-19. DOI: 10.1016/j.cll.2021.03.003
- Derman B, Castillo JJ, Sarosiek S, Beksac M. When a Monoclonal Gammopathy Is Not Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2022;42:1-10. DOI: 10.1200/EDBK_349643
- Willrich MA, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med* 2016;54(6):907-19. DOI: 10.1515/cclm-2015-0580
- Grunenberg A, Buske C. How to manage waldenström's macroglobulinemia in 2024. *Cancer Treat Rev* 2024;125:102715. DOI: 10.1016/j.ctrv.2024.102715
- Pozzan M, Indennate C, Varrà GG, et al. Amyloidosis and Amyloidogenesis: One Name, Many Diseases. *Heart Fail Clin* 2024;20(3):249-60. DOI: 10.1016/j.hfc.2024.02.001
- Keren DF, Bocsi G, Billman BL, et al. Laboratory Detection and Initial Diagnosis of Monoclonal Gammopathies. *Arch Pathol Lab Med*. 2022;146(5):575-590. DOI: 10.5858/arpa.2020-0794-CP
- Turner KA, Frinack JL, Ettore MW, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part I: factors impacting limit of quantitation of serum protein electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(4):533-546. DOI: 10.1515/cclm-2019-1104
- Wijeratne N, Tate JR, Wienholt L, et al. Report of the Survey Conducted by RCPAQAP on Current Practice for Paraprotein and Serum Free Light Chain Measurement and Reporting: a Need for Harmonisation. *Clin Biochem Rev* 2019;40(1):31-42.
- Keren DF, Schroeder L. Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. *Clin Chem Lab Med* 2016;54(6):947-61. DOI: 10.1515/cclm-2015-0862
- Willrich MAV, Murray DL, Kyle RA. Laboratory testing for monoclonal gammopathies: Focus on monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Clin Biochem* 2018;51:38-47. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.05.001
- Bergstrom DJ, Kotb R, Louzada ML, et al. Consensus Guidelines on the Diagnosis of Multiple Myeloma and Related Disorders: Recommendations of the Myeloma Canada Research Network Consensus Guideline Consortium. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2020;20(7):e352-67. DOI: 10.1016/j.clml.2020.01.017
- Ludwig H, Miguel JS, Dimopoulos MA, et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. *Leukemia* 2014;28(5):981-92. DOI: 10.1038/leu.2013.293
- Katzmann JA, Willrich MA, Kohlhagen MC, et al. Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assays. *Clin Chem* 2015;61(2):360-7. DOI: 10.1373/clinchem.2014.231985
- Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23(2):215-24. DOI: 10.1038/leu.2008.307
- Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;123(20):3073-9. DOI: 10.1182/blood-2014-01-550020
- Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17(8):e328-46. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6
- Schmitz A, Brøndum RF, Johnsen HE, et al. Longitudinal minimal residual disease assessment in multiple myeloma patients in complete remission - results from the NMSG flow-MRD substudy within the EMN02/HO95 MM trial. *BMC Cancer* 2022;22(1):147. DOI: 10.1186/s12885-022-09184-1
- Usmani SZ, Heuck C, Mitchell A, et al. Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica* 2012;97(11):1761-7. DOI: 10.3324/haematol.2012.065698
- Giles HV, Wechalekar A, Pratt G. The potential role of mass spectrometry for the identification and monitoring of patients with plasma cell disorders: Where are we now and which questions remain unanswered? *Br J Haematol*. 2022;198(4):641-53. DOI: 10.1111/bjh.18226
- Bergen HR 3rd, Dasari S, Dispenzieri A, et al. Clonotypic Light Chain Peptides Identified for Monitoring Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma without Bone Marrow Aspiration. *Clin Chem* 2016;62(1):243-51. DOI: 10.1373/clinchem.2015.242651
- Noori S, Verkleij CPM, Zajec M, et al. Monitoring the M-protein of multiple myeloma patients treated with a combination of monoclonal antibodies: the laboratory solution to eliminate interference. *Clin Chem Lab Med* 2021;59(12):1963-71. DOI: 10.1515/cclm-2021-0399
- Langerhorst P, Noori S, Zajec M, et al. Multiple Myeloma Minimal Residual Disease Detection: Targeted Mass Spectrometry in Blood vs Next-Generation Sequencing in Bone Marrow. *Clin Chem* 2021;67(12):1689-98. DOI: 10.1093/clinchem/hvab187
- Dekker LJ, Zeneyedpour L, Brouwer E, et al. An antibody-based biomarker discovery method by mass spectrometry sequencing of complementarity determining regions. *Anal Bioanal Chem* 2011;399(3):1081-91. DOI: 10.1007/s00216-010-4361-9
- Barnidge DR, Dasari S, Botz CM, et al. Using mass spectrometry to monitor monoclonal immunoglobulins in patients with a monoclo-

- nal gammopathy. *J Proteome Res* 2014;13(3):1419-27. DOI: 10.1021/pr400985k
26. Barnidge DR, Dasari S, Ramirez-Alvarado M, et al. Phenotyping polyclonal kappa and lambda light chain molecular mass distributions in patient serum using mass spectrometry. *J Proteome Res* 2014;13(11):5198-205. DOI: 10.1021/pr5005967
 27. Mills JR, Kohlhagen MC, Dasari S, et al. Comprehensive Assessment of M-Proteins Using Nanobody Enrichment Coupled to MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2016;62(10):1334-44. DOI: 10.1373/clinchem.2015.253740
 28. Murray DL, Puig N, Kristinsson S, et al. Mass spectrometry for the evaluation of monoclonal proteins in multiple myeloma and related disorders: an International Myeloma Working Group Mass Spectrometry Committee Report. *Blood Cancer J* 2021;11(2):24. DOI: 10.1038/s41408-021-00408-4
 29. Dasari S, Kohlhagen MC, Dispenzieri A, et al. Detection of Plasma Cell Disorders by Mass Spectrometry: A Comprehensive Review of 19,523 Cases. *Mayo Clin Proc* 2022;97(2):294-307. DOI: 10.1016/j.mayocp.2021.07.024
 30. Kohlhagen M, Dasari S, Willrich M, et al. Automation and validation of a MALDI-TOF MS (Mass-Fix) replacement of immunofixation electrophoresis in the clinical lab. *Clin Chem Lab Med* 2020;59(1):155-63. DOI: 10.1515/ccclm-2020-0581
 31. Zhu X, Li H, Liu Y, et al. MALDI-TOF-MS for rapid screening analysis of M-protein in serum. *Frontiers in Chemistry* 2022;10:890745. DOI: 10.3389/fchem.2022.890745
 32. Verona R, Zudaire E, Li K, et al. Comparison of the Analytical Performance of EXENT[®], a Mass Spectrometry-Based Assessment of M-Protein, to SPEP and NGS-Based MRD in Multiple Myeloma Patient Samples. *Blood* 2022;140(Suppl.1):12446-7. DOI: 10.1182/blood-2022-160249
 33. Milani P, Murray DL, Barnidge DR, et al. The utility of MASS-FIX to detect and monitor monoclonal proteins in the clinic. *Am J Hematol* 2017;92(8):772-9. DOI: 10.1002/ajh.24772
 34. Giles HV, Cook MA, Drayson MT, et al. Redefining nonmeasurable multiple myeloma using mass spectrometry. *Blood* 2022;139(6):946-50. DOI: 10.1182/blood.2021013794
 35. Kohlhagen MC, Mills JR, Willrich MAV, et al. Clearing drug interferences in myeloma treatment using mass spectrometry. *Clin Biochem* 2021;92:61-6. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2021.02.011
 36. Mills JR, Kohlhagen MC, Willrich MAV, et al. A universal solution for eliminating false positives in myeloma due to therapeutic monoclonal antibody interference. *Blood* 2018;132(6):670-2. DOI: 10.1182/blood-2018-05-848986
 37. Santockyte R, Puig O, Zheng N, et al. High-Throughput Therapeutic Antibody Interference-Free High-Resolution Mass Spectrometry Assay for Monitoring M-Proteins in Multiple Myeloma. *Anal Chem* 2021;93(2):834-42. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03357
 38. Kirchhoff DC, Murata K, Thoren KL. Use of a Daratumumab-Specific Immunofixation Assay to Assess Possible Immunotherapy Interference at a Major Cancer Center: Our Experience and Recommendations. *J Appl Lab Med* 2021;6(6):1476-83. DOI: 10.1093/jalm/jfab055
 39. Mellors PW, Kohlhagen MC, Dasari S, et al. Belantamab mafodotin detection by MASS-FIX and immunofixation. *Clin Chem Lab Med* 2021;59(11):e430-3. DOI: 10.1515/ccclm-2021-0326
 40. Kumar S, Murray D, Dasari S, et al. Assay to rapidly screen for immunoglobulin light chain glycosylation: a potential path to earlier AL diagnosis for a subset of patients. *Leukemia* 2019;33(1):254-7. DOI: 10.1038/s41375-018-0194-x
 41. Dispenzieri A, Larson DR, Rajkumar SV, et al. N-glycosylation of monoclonal light chains on routine MASS-FIX testing is a risk factor for MGUS progression. *Leukemia* 2020;34(10):2749-53. DOI: 10.1038/s41375-020-0940-8
 42. Sidana S, Murray DL, Dasari S, et al. Glycosylation of immunoglobulin light chains is highly prevalent in cold agglutinin disease. *Am J Hematol* 2020;95(9):E222-5. DOI: 10.1002/ajh.25843
 43. Juskewitch JE, Murray JD, Norgan AP, et al. In from the cold: M-protein light chain glycosylation is positively associated with cold agglutinin titer levels. *Transfusion* 2021;61(4):1302-11. DOI: 10.1111/trf.16279
 44. Derman BA, Stefka AT, Jiang K, et al. Measurable residual disease assessed by mass spectrometry in peripheral blood in multiple myeloma in a phase II trial of carfilzomib, lenalidomide, dexamethasone and autologous stem cell transplantation. *Blood Cancer J* 2021;11(2):19. DOI: 10.1038/s41408-021-00405-z.
 45. Woodruff RK, Strahm BA, O'Connor PG, et al. Mass spectrometry for minimal residual disease detection in multiple myeloma: comparison with bone marrow-based methods. *J Clin Oncol* 2020;38(Suppl.15):8538. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.8538
 46. Yee AJ, Raju N. Minimal residual disease in multiple myeloma: why, when, where. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2021;2021(1):582-91. DOI: 10.1182/hematology.2021000249
 47. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538-48. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
 48. Rajkumar SV, Kyle RA, Buadi FK. Advances in the diagnosis, classification, risk stratification, and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance: implications for recategorizing disease entities in the presence of evolving scientific evidence. *Mayo Clin Proc* 2010;85(10):945-8. DOI: 10.4065/mcp.2010.0520
 49. Lakshman A, Rajkumar SV, Buadi FK, et al. Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria. *Blood Cancer J* 2018;8(6):59. DOI: 10.1038/s41408-018-0077-4
 50. Treon SP, Tedeschi A, San-Miguel J, et al. Report of consensus Panel 4 from the 11th International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia on diagnostic and response criteria. *Semin Hematol* 2023;60(2):97-106. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2023.03.009
 51. Hasib Sidiqi M, Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis diagnosis and treatment algorithm 2021. *Blood Cancer J* 2021;11(5):90. DOI: 10.1038/s41408-021-00483-7
 52. Perfetti V, Garini P, Vignarelli MC, et al. Diagnostic approach to and follow-up of difficult cases of AL amyloidosis. *Haematologica* 1995;80(5):409-15.