

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
U.M.A.E. ESPECIALIDADES "DR. ANTONIO FRAGA MOURET"
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA**

**EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR EN PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO DE MIELOMA MÚLTIPLE DE NOVO COMPARADA CON LA
DE INDIVIDUOS SANOS.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA**

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

ASESOR: DR. JORGE VELA OJEDA

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Jesús Arenas Osuna

División de Educación en Salud

Dr. Jorge Vela Ojeda

Director de Tesis

Títular del Curso Universitario.

Dra. María Guadalupe Rodríguez González

R4 Hematología

No. Protocolo R-2008-3501-1

Índice	Páginas
Antecedentes científicos	6
Material y Métodos.....	12
Análisis estadístico.....	15
Resultados.....	16
Discusión.....	28
Conclusiones.....	32
Referencias bibliográficas.....	33
Anexos.....	38

RESÚMEN.

Título: "Evaluación de la inmunidad celular en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo comparada con la de individuos sanos".

Objetivo: Evaluar la respuesta inmune celular en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo. Comparar las subpoblaciones linfocitarias de los enfermos con mieloma múltiple no tratados con sujetos sanos.

Material y métodos: Diseño de estudio. Retroprospectivo, descriptivo, transversal y comparativo. Se incluyeron 28 pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo, a quienes se les tomaron muestras de sangre periférica previo a inicio de tratamiento para medir por citometría de flujo la expresión de CD4, CD3, CD8, NK, NKT y NKT invariantes, se compararon los resultados con un grupo control de donadores sanos.

Análisis estadístico: t student para variables independientes, IC 95%, mediana.

Resultados: Se incluyeron 28 pacientes en el período de agosto de 2006 a febrero de 2008, 15 mujeres (53.57 %) y 13 varones (46.42%), con una mediana de edad de 59 años. La mediana de expresión de CD4 en pacientes fue de 471.8 y en donadores de 690.1. con una $p < 0.0001$. NK en pacientes fue de 250.7 y en donadores 407.3, $p < 0.001$. NKT invariante en pacientes fue de 37.41 y en donadores de 2.243, $p < 0.003$.

Conclusión los subtipos celulares de mayor peso en la respuesta inmune en pacientes con mieloma múltiple de novo son CD4+, células NK y la invariante $\alpha 24 \nu \beta 11$.

Palabras clave mieloma múltiple, linfocitos T, NK, NKT invariantes, inmunidad celular.

ABSTRACT.

Title: Comparison of the Cellular immunity response in patients with the novo multiple myeloma and normal donors.

Objective: To study the cellular immune response in patients with de novo multiple myeloma (MM). To compare the number of lymphocyte subsets in patients with MM and normal donors.

Material and methods: Study design: retrospective, descriptive, transversal and comparative. 28 patients with de novo MM were included. Before the start of treatment, flow cytometry analysis for quantification of CD3, CD4, CD8, NK, NKT, and NKT invariant lymphocytes was performed. We also quantified the same cells in a control group consisting in normal donors.

Statistical analysis: Mean, median, standard deviation, and 95% confidence intervals were calculated. A T test for independent samples was used to compare the results between patients and donors.

Results: Between August 2006 and February 2008 we included 28 patients, 15 (53.5%) women and 13 (46.5%) male, with a median age of 59 years. The median of lymphocyte subsets for patients with MM and donors was: CD4: $471.8 \times 10^6/L$ and $690.1 \times 10^6/L$ ($p < 0.0001$), NK cells: $250.7 \times 10^6/L$ and $407.3 \times 10^6/L$ ($p < 0.001$), and NKTi: $37.41 \times 10^6/L$ and 2.2 ($p < 0.003$), respectively.

Conclusion. Patients with de novo multiple myeloma have decreased number of CD4 and NK cells, as well as increased in NKTi cells. These findings could explain, in addition to other reported deficiencies, the increased risk of infection and the deficient antitumor response observed in these patients.

Keywords: multiple myeloma, lymphocyte subsets: CD4, NK, NKTi, cellular immunity.

I. Antecedentes Científicos.

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad caracterizada por producir alteraciones de la respuesta inmune tanto a nivel humoral como celular, lo cual ocasiona que los pacientes tengan una mayor predisposición a infecciones y a una respuesta antitumoral defectuosa.

Respuesta antitumoral en mieloma múltiple. Una respuesta inmune antitumoral adecuada depende de la correcta detección de las células tumorales y de la habilidad de provocar una respuesta efectiva por parte del sistema inmune del individuo. En los pacientes con MM ninguna de estas dos condiciones se cumple, debido a que existen alteraciones fenotípicas y funcionales en linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y células NK/LAK.

Linfocitos B en mieloma múltiple. Las poblaciones de linfocitos B y pre-B se encuentran disminuidas (1) y mas aún, los monocitos de los pacientes con MM inhiben la producción policlonal de inmunoglobulinas inducida *in vitro* por mitógenos, cuando se cultivan con linfocitos B normales o linfocitos B de pacientes con MM (2), lo cual resulta en reducción de la síntesis de inmunoglobulinas normales, ocasionando hipogamaglobulinemia grave.

Linfocitos T en mieloma múltiple. La destrucción de las células tumorales se lleva a cabo por medio de la activación eficiente de las células T efectoras, lo cual requiere de dos señales principales: a) la señal inicial es generada por el reconocimiento del receptor de células T (TCR) de péptidos antigénicos presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad, localizado en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas DC), b) la segunda señal se genera por medio de las moléculas coestimuladoras, de la que depende una correcta activación funcional y mas aún, la maduración de las DC (3).

Los pacientes con MM tienen una distribución alterada de linfocitos CD4 y CD8 (inversión del índice CD4/CD8) debido a reducción en el número absoluto y porcentaje de linfocitos

CD4+, particularmente la variedad de linfocitos vírgenes CD4+/CD45RA+ (4,5). Esta disminución celular es más pronunciada en pacientes con enfermedad avanzada y se ha demostrado que los pacientes con cifras de linfocitos CD4+ menores a $700 \times 10^6/L$, tienen una menor supervivencia y una mayor probabilidad de recaída. Sin embargo, los linfocitos de la sangre periférica son capaces de proliferar ante células tumorales autólogas e incluso tienen capacidad de citotoxicidad (6). Además, se han detectado otras alteraciones en los linfocitos T como anomalías en las moléculas de señalización, particularmente de cinasa de proteína C (PKC- α) y de factor nuclear kappa B (NF κ B) y susceptibilidad aumentada a la apoptosis provocada por un aumento en la expresión de Fas y disminución intracelular en los niveles de bcl-2 (7-9).

Las células tumorales de MM pueden evadir la respuesta inmune antitumoral por medio de modificaciones en la interacción célula-célula, en la presentación y procesamiento de antígeno y en las moléculas coestimuladoras. En general, las células tumorales de MM carecen de la expresión de CD80 en su membrana, lo cual se puede revertir por medio de la coestimulación con ligando de CD40 (CD40L), método que se está evaluando como medida terapéutica en MM (10). Interesantemente, se ha demostrado la expresión de CD28 en la mayoría de los linfocitos CD4+, en la mitad de los linfocitos CD8+, no así en las células tumorales de pacientes con MM en fases iniciales de la enfermedad, lo cual impediría una buena activación de la respuesta inmune y por lo tanto una buena respuesta antitumoral (11 y 12).

Células NK en mieloma múltiple. Las células natural killer (NK) son indispensables para la erradicación de enfermedades virales y oncológicas. Por medio de citometría de flujo podemos distinguir a estas células por su fenotipo CD3-CD16+CD56+. Se dividen en dos

grandes subtipos: a) NK CD56^{bright} (CD16^{dim}) que constituye el 10% del total de células NK y b) CD56^{dim} (CD16^{bright}) 90% de células NK. El primer subtipo se caracteriza por su gran capacidad de producir interleucinas con propiedades antitumorales como interferón gama y la segunda variedad de células NK CD16+, por definición posee el receptor III Fcγ (FcγRIII) de inmunoglobulinas (IgG1 e IgG3), lo cual le confiere una alta capacidad antitumoral por citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (13).

La función citolítica de estas células está regulada por la expresión de receptores de superficie que pueden inhibir o aumentar la citotoxicidad. Los receptores activadores (receptores naturales de citotoxicidad) incluyen NKp30, NKp44, NKp46 y NKG2D, así como co-receptores como 2B4. Se ha demostrado que estas células son capaces de destruir a las células malignas del MM (14), sin embargo, muchos autores han reportado que son anormales en cuanto a número, fenotipo y función en pacientes con enfermedades oncohematológicas (15,16).

Células NKT en mieloma múltiple. En el humano se pueden marcar por citometría de flujo por medio de anticuerpos dirigidos a las cadenas α y β del TCR invariante (V α 24 V β 11). En lugar de reconocer un péptido presentado en el MHC de las células dendríticas, interactúan con glicolípidos presentados en una molécula parecida a MHC llamada CD1d. (17).

Las células NKT constituyen el 0.02-0.2% del total de linfocitos T en la circulación periférica. Bajo la influencia de distintos estímulos, son capaces de producir tanto citocinas de tipo Th1 (IFN- γ , IL-2) como Th2 (IL-4, IL-10, IL-13).

Se ha reportado disminución de células NKT en la sangre periférica de pacientes con cáncer hematológico y no hematológico (18, 19). En los pacientes con MM en recaída o progresión y no así en pacientes con gamopatía monoclonal de significado incierto ni en MM en estadio

I, las células NKT son deficientes en la producción de IFN- γ inducida por alfa-galactosil-ceramida, lo cual indica una clara relación entre la pérdida en las funciones de estas células y la progresión clínica de la enfermedad (20,21).

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral. Las células tumorales del MM, como sucede en otros tipos de cáncer, pueden interferir con la respuesta inmune antitumoral por medio de la secreción de factores supresores o promoviendo la apoptosis de las células inmunoregulatoras. Una de las sustancias supresoras más importantes es el factor 1 de crecimiento transformador (TGF β -1) que es producido por las células de MM y que puede suprimir la proliferación de las células T por medio de la inhibición de la respuesta a IL-2 en linfocitos T estimulados de sangre periférica (22), además de que provoca falla en la maduración normal de las células dendríticas en pacientes con MM. Por otro lado el ligando de Fas (Fas-L) que induce muerte celular programada en las células que son sensibles o positivas a Fas, está expresado en las células de MM, por lo que las células tumorales pueden suprimir activamente a las células T que sean Fas+, siendo este un posible mecanismo por medio del cual las células tumorales evitan su destrucción por el sistema inmune (23). Otros inhibidores de la respuesta inmune antitumoral detectados en MM son: IL-10 (24), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (25), y mucina 1 (MUC-1) que juega un papel muy importante en la comunicación entre células y cuyos niveles de expresión se asocian con un alto potencial de metástasis y un pronóstico malo en algunas neoplasias epiteliales. En células de MM, MUC-1 produce una variante soluble que es capaz de suprimir la respuesta de células T a aloantígenos (26).

La IL-10 es uno de los factores inhibidores más importantes. Es una citocina pleiotrópica producida por las células B, monocitos, macrófagos y queratocitos que inhibe la síntesis de

citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, y TNF α . Además inhibe la función efectora de los linfocitos T. En los pacientes con MM se ha demostrado que cuando la enfermedad está controlada, los niveles de IL-10 son bajos (3.3%) comparados con niveles más altos (60%) en pacientes en fase terminal o leucemia de células plasmáticas (27). Así mismo, se ha reportado que los niveles de IL-10 en MM son más altos en comparación con pacientes controles y que los niveles de esta citocina se correlacionan directamente con el nivel de paraproteína en el suero (28).

Además de lo mencionado anteriormente, se sabe que la liberación tumoral de TGF- β altera fisiológicamente a algunos receptores de la células NK como NKp30 y NKG2D, así mismo, algunos tumores secretan sustancias solubles que inhiben el contacto entre la célula tumoral y las células NK como MICA y MICB (29,30).

Objetivos.**Objetivo principal:**

Evaluar la respuesta inmune celular en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo.

Objetivos específicos:

1. Analizar el porcentaje y la cifra total de linfocitos B en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo.
2. Estudiar el porcentaje y la cifra total de linfocitos T en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo.
3. Medir el porcentaje y la cifra total de células NK en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo.
4. Determinar el porcentaje y la cifra total de las células NKT y de las células NKT invariantes en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo.
5. Comparar las subpoblaciones linfocitarias de los enfermos con mieloma múltiple no tratados con sujetos sanos.

Material y métodos (Programa del Trabajo)

Características del lugar donde se realiza el estudio.

La población estudiada en el presente trabajo será la población atendida en el Centro Médico la Raza, hospital de tercer nivel y de concentración de pacientes de la delegación noreste del IMSS en la Ciudad de México. La forma en que los pacientes son ingresados en este complejo hospitalario es mediante consulta externa, los servicios de urgencias en caso de los Hospitales de Infectología, Ginecología y el Hospital General, además de por medio de Extensión Hospitalaria en el caso del Hospital de Especialidades.

Diseño de estudio.

Observacional, retroprospectivo, descriptivo, transversal y comparativo.

Grupo de estudio:

La muestra será escogida de los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo que ingresen al servicio del 20 de agosto del 2006 al 7 de febrero del 2008.

Criterios de selección.

Criterios de Inclusión.

1. Pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo.
2. Pacientes que no hayan recibido tratamiento previo para su enfermedad.
3. Edad (mayor o igual de 16 años en adelante)
4. Género indistinto
5. Cualquier estadio clínico según la clasificación de Durie y Salmon.
6. Consentimiento por escrito

Criterios de exclusión.

No aplica.

Criterios de no inclusión.

1. Amiloidosis
2. Mieloma indolente

Criterios de eliminación.

No aplica.

Descripción general del estudio.

Lugar de Realización.

- UMAE HECMNR

SERIS Y ZAACHILA SN COL LA RAZA, TERCER PISO

- LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA ESPECIAL

UMAE HECMNR

La población estudiada en el presente trabajo será la población atendida en el Centro Médico la Raza, hospital de tercer nivel y de concentración de pacientes de la delegación noreste del IMSS en la Ciudad de México. La forma en que los pacientes son ingresados en este complejo hospitalario es mediante consulta externa, los servicios de urgencias en caso de los Hospitales de Infectología, Ginecología y el Hospital General, además de por medio de Extensión Hospitalaria en el caso del Hospital de Especialidades.

Una vez diagnosticados y evaluados los criterios de inclusión, exclusión y no inclusión se procederá a la toma de muestra mediante ligadura del brazo, punción, y aspiración de sangre venosa, previo al inicio de tratamiento.

Previo consentimiento de los donadores, se extraerán 4.5mL de sangre con 0.5mL de citrato de sodio al 3.8% en 2 tubos al vacío.

Equipo

- Analizador automático para biometría hemática modelo Cell Dyn 3000 marca Abbott.
- Citómetro de flujo modelo "FACScalibur" de Becton Dickinson utilizando el programa de "Cell Quest Pro", versión 3.2.1 'apple system' 7.6.1 .

Anticuerpos.

CD19 PerCP

CD20 PerCP

CD4 PerCP

CD8 FITC

CD3/CD16+56= TNK, FITC/PE

CD3 – CD16+56 (+) NK, FITC/PE

CD3 FITC

Antiv α 24/CD3 PE/PerCP

Antiv β 11/CD3 FITC/PerCP

Materiales.

Tubos para el citómetro de flujo (Falcon 2052).

Tubos de plástico 12 x 75.

Tubo "vacutainer" tapón lila 12 x 75.

Papel "parafilm"

Portaobjetos.

Pipetas automáticas de 1.0, 0.1, 0.05, 0.02 ml.

Puntas para pipetas automáticas.

Reactivos.

Solución de lisis para glóbulos rojos 1 X

Amortiguador salino de fosfatos pH 7.35 (FACS flow)

Paraformaldehído al 1%.

Colorante de Wright y amortiguador de fosfatos pH 6.4

Análisis Estadístico.

Estadística descriptiva, t Student.

RESULTADOS

Del período del 20 de agosto de 2006 al 7 de febrero de 2008, se reclutaron 28 pacientes consecutivos del servicio de hematología del Hospital de Especialidades del CMN "La Raza".

De los 28 pacientes incluidos, 15 fueron mujeres (54 %) y 13 varones (46 %), cuyas edades oscilaban entre 40-79 años (mediana de 59 años).

En la tabla 1 se pueden observar las principales características clínicas de los pacientes incluidos en el trabajo. Solo en 20 pacientes se conoció el tipo de Mieloma múltiple: IgG en 10 (50%) pacientes, enfermedad de cadenas ligeras en 7 (35%), e IgA en 3 (15%) pacientes. En los ocho pacientes restantes, no se encontró determinación de Inmunoglobulinas ya que seis de ellos fallecieron antes de que se concluyera que tipo de MM presentaban; en los dos restantes, no se encontró el dato en su expediente clínico.

De los 28 pacientes solo se logró estadificar a 24 ya que los 4 restantes fueron pacientes de la consulta externa que fallecieron. El Estadio clínico de Durie y Salmon que se encontró en la gran mayoría de los pacientes fue III B (13= 54 %), nueve pacientes (37.5%) se presentaron en estadio III A y solo dos 2 pacientes (8 %) se estatificaron como II A. Respecto a lesiones líticas características de esta enfermedad, en 19 individuos se documentaron estas lesiones: en 12 pacientes (63 %) lesiones líticas grado 3, tipo 2 en 5 (26 %), y lesiones tipo 1 en 2 pacientes (10.5 %). Durante el periodo de observación de los pacientes, se documentó plasmocitoma en 21 enfermos (65%), siete de ellos (25%) lo tuvieron al momento del diagnóstico. Del total de plasmocitomas observados, 71% tenían localización torácica. La proteína de Bence Jones solo se determinó en 16 enfermos. En seis (37.5%) fue positiva y en el resto negativa.

**Tabla 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES CON
MIELOMA MÚLTIPLE**

<i>Variables</i>	<i>Frecuencia n</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
TIPO DE MM		
IgG	10	50
Cadenas Ligeras	7	35
IgA	3	15
TOTAL	20	100
ESTADIO CLÍNICO		
IIA	2	8.5
III A	9	37.5
III B	13	54.0
TOTAL	24	100
LESIONES LÍTICAS		
1	2	10.5
2	5	26.5
3	12	63.0
TOTAL	19	100
PLASMOCITOMA		
No	21	75
Sí	7	25
TOTAL	28	100
PROTEÍNA DE BJ		
Negativa	10	62.5
Positiva	6	37.5
TOTAL	24	100

El tratamiento de quimioterapia que recibieron los pacientes se puede observar en la tabla 2.

TABLA 2. Tratamiento inicial de los pacientes incluidos en el estudio.

<i>Tratamiento</i>	<i>Frecuencia</i> <i>n</i>	<i>Porcentaje</i> <i>(%)</i>
Melfalán-pred	3	12.5
Talidomida-Dex	17	71
VAD	4	16.5
TOTAL	24	100

Previo al inicio del tratamiento se procedió a tomar la muestra de sangre periférica de los 28 pacientes para ser analizada en el citómetro de flujo, siendo necesario siempre conocer la cuenta de leucocitos así como la cuenta absoluta de linfocitos, para poder así conocer la cantidad exacta de las subvariedades CD3, CD4, CD8, NK, y NKT en tres subtipos de acuerdo a su receptor de célula T ($\alpha 24$, $\nu\beta 11$ y $\alpha 24 \nu\beta 11$).

Se tomó como grupo control muestras de 59 donadores sanos de células hematopoyéticas para trasplante de médula ósea, midiéndose las mismas subpoblaciones. La comparación de los valores de subvariedades de linfocitos en donadores sanos y pacientes con mieloma múltiple de reciente diagnóstico, se puede observar en la tabla 3 y 4.

TABLA 3. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA INMUNE DE DONADORES SANOS Y PACIENTES MIELOMA MÚLTIPLE.

	LINFOS 10 ⁶ /L	CD8 10 ⁶ /L	CD4 10 ⁶ /L	CD3 10 ⁶ /L
DONADORES SANOS N= 59				
Media	2225.7	605.3	690.1	1099.3
Mediana	2130.0	541.3	640.3	1091.8
Desv. Típ.	652.6	274.8	266.7	427.8
Mínimo	1030	53.5	180.3	219
Máximo	3980	1578.8	1498.5	2588
MIELOMA MÚLTIPLE N= 28				
Media	2209.7	594.1	471.8	1065.3
Mediana	2050	470.9	312.4	824.6
Desv. Típ.	1359.4	468.4	519.5	896
Mínimo	1682	68.8	35.6	84.4
Máximo	2739	2164.9	2714.8	4701.1

TABLA 4. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA INMUNE DE DONADORES SANOS Y PACIENTES MIELOMA MÚLTIPLE.

	NK 10 ⁶ /L	NKT 10 ⁶ /L	va24 10 ⁶ /L	vb11 10 ⁶ /L	A24b11 10 ⁶ /L
DONADORES SANOS N= 59					
Media	407.3	65.7	3.5	2.1	2.2
Mediana	390.8	45.1	2.5	1.8	.7050
Desv. Típ.	218.4	77.9	3.4	1.3	10.8
Mínimo	8.7	.00	.47	.19	.18
Máximo	1025.2	489.7	22.7	6.0	84.3
MIELOMA MÚLTIPLE N= 28					
Media	250.7	65.6	7.5	2.8	1.7
Mediana	202.5	24.8	3.2	2.1	1.4
Desv. Típ.	198.6	89.1	13.4	3.1	1.7
Mínimo	26.6	.00	.00	.00	.00
Máximo	735.2	371.1	64.2	12.9	8.6

TABLA 5. RESULTADOS DE LAS VARIABLES CON SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA EN LA PRUEBA DE T PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES.

	Medi a	Desviación Estándar	Error Estándar	IC < 95%	IC > 95%	VALOR DE P
NK don	407.3	218.4	28.44	350.4	464.2	<0.001
NK MM	250.7	198.6	37.54	173.7	327.7	
CD4 don	690.1	266.7	34.72	620.6	759.7	<0.0001
CD4 MM	471.8	519.6	98.19	270.3	673.3	
Va24vb11don	2.2	10.89	1.418	-0.5956	5.081	<0.003
Va24vb11MM	1.7	188.5	35.62	-35.67	110.5	

Se realizaron comparaciones entre las diferentes poblaciones celulares de los donadores sanos y pacientes con Mieloma múltiple, encontrándose diferencias altamente significativas estadísticamente entre linfocitos CD4 [donadores mediana de 690 $10^6/L$ (s.d. 266.7, IC 95% 620.6 a 759.7); pacientes con mieloma: mediana 471.8 $10^6/L$ (s.d. 519.6, IC 95% 270.3 a 673.3), $p < 0.0001$]. (ver figura 1 y tablas 3, 4 y 5).

Al comparar la población de linfocitos CD8 no hubo diferencias estadísticamente significativas: 605.4 $10^6/L$ (s.d. 274.8, IC 95% 533.8 a 677.0) vs 594.2 (s.d. 468.4, IC 95% 412.5 a 775.8), $p = 0.2$.

Otras de las poblaciones medidas fue CD3 teniendo en los donadores sanos una mediana de $1099 \times 10^6/L$ (s.d. 427.8, IC 95% 987.8 a 1211); y en los pacientes con MM una mediana de $1065 \times 10^6/L$ (s.d. 896, IC 95% 717.9 a 1413), $p= 0.1$.

Las células NK también fueron comparadas entre los dos grupos encontrándose que están disminuidas en pacientes con MM: grupo de donadores sanos mediana de $407.3 \times 10^6/L$ (s.d. 218.4, IC 95% 350.4 a 464.2) y en el grupo de MM la mediana fue de $250.7 \times 10^6/L$ (s.d. 198.6, IC 95% 173.7 a 327.7), $p<0.0001$. (ver figura 2 y tablas 3, 4 y 5).

Al comparar las células NKT entre el grupo de donadores y pacientes con MM, se encontraron también diferencias importantes, pues los pacientes con mieloma múltiple tienen valores más altos que las personas sanas: sanos: mediana $65.75 \times 10^6/L$, (s.d. 77.90, IC 95% 45.45 a 86.05); pacientes con MM: mediana $65.65 \times 10^6/L$, (s.d. 89.19, IC 95% 31.07 a 100.2) , $p<0.2$ (ver figura 3 y tablas 3, 4, y 5).

Las células NKT son consideradas parte del sistema inmune innato. Estas células poseen un receptor de célula T semiinvariante con una expresión uniforme del gen de la cadena α en la región variable en el segmento 24 ($V\alpha 24$) preferentemente apareado con el gen de la cadena β en la región variable en el segmento 11 ($V\beta 11$) y expresan CD161, un marcador comúnmente encontrado en células NK. En el ser humano se pueden marcar por citometría de flujo mediante anticuerpos dirigidos a las cadenas α y β del receptor de célula T (TCR) invariante ($V\alpha 24 V\beta 11$), esto se realizó tanto en los donadores sanos y en los pacientes con mieloma múltiple encontrando que la mediana de la invariante $V\alpha 24$ en sanos fue $3.534 \times 10^6/L$ (s.d. 3.483, IC 95% 2.626 a 4.44) en comparación con el grupo de MM donde la mediana fue $7.531 \times 10^6/L$ (s.d. 13.45, IC 95% 2.314 a 12.75) con una p 0.2.

También se realizó determinación de la $\text{V}\beta 11$ tanto en el grupo de donadores sanos como en el grupo de MM, encontrando una mediana en el primer grupo de $2.152 \cdot 10^6/\text{L}$ (s.d. 1.324, IC 95% 1.807 a 2.497), en el segundo grupo la mediana fue de $38.44 \cdot 10^6/\text{L}$ (s.d. 188.3, IC 95% -34.56 a 111.4) obteniéndose una $p = 0.8$.

Se obtuvo una $p < 0.003$ al comparar la $\text{V}\alpha 24$ $\text{V}\beta 11$ del grupo de donadores sanos y del grupo de MM, en el grupo de donadores sanos se tuvo una mediana de $2.243 \cdot 10^6/\text{L}$ (s.d. 10.89, IC 95% -0.5956 a 5.081) y en el grupo de MM la mediana fue $37.41 \cdot 10^6/\text{L}$ (s.d. 188.5, IC <95% -35.67 a 110.5).

La mediana de supervivencia global en los pacientes con mieloma múltiple no se ha alcanzado y la media fue de 11.2 meses (IC 95% 8.3 – 14.1 meses). (ver figura 5).

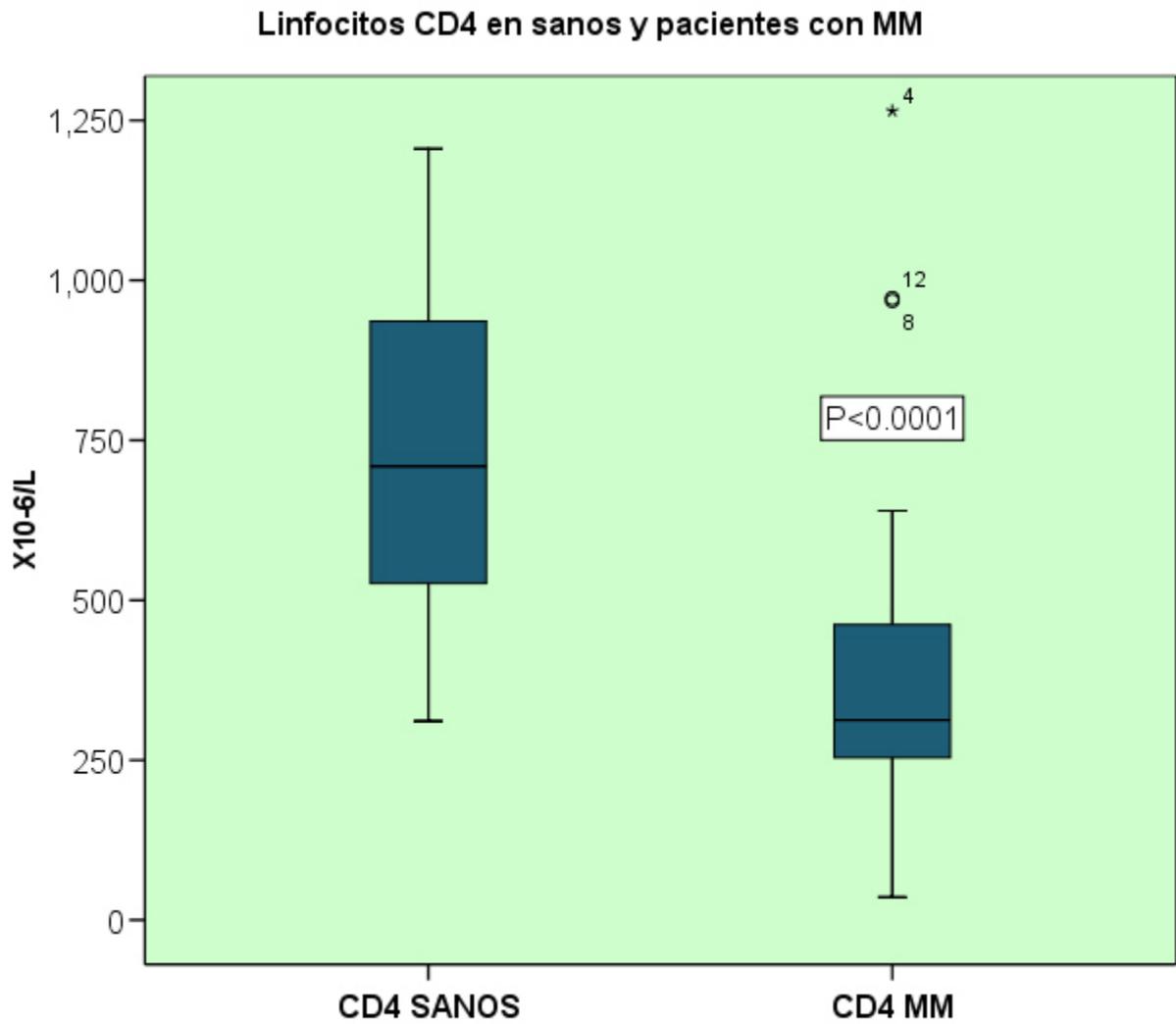


FIGURA 1. Comparación entre cantidad de linfocitos CD4+ en donadores sanos y pacientes con diagnóstico reciente de mieloma múltiple sin tratamiento. Se observa una franca disminución de estas células en los enfermos con mieloma.

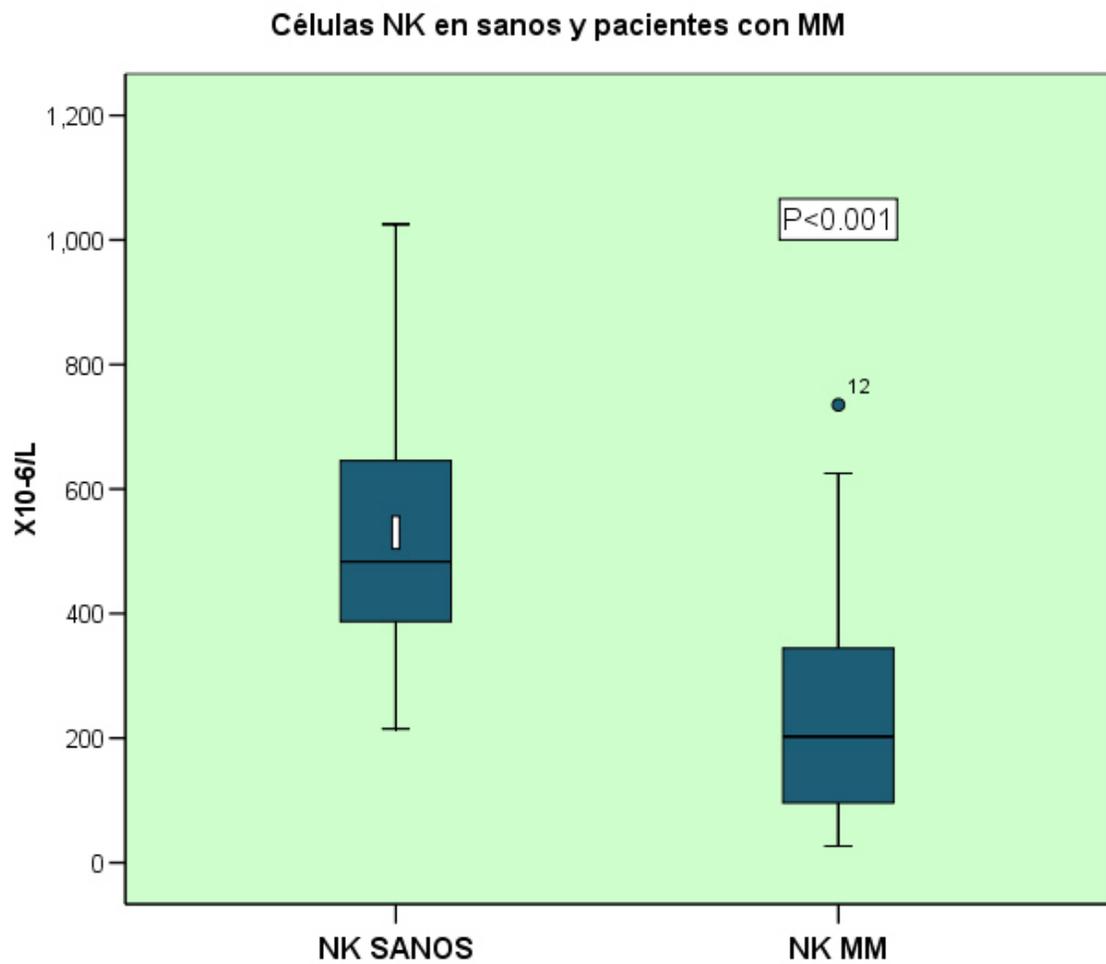


FIGURA 2. COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK DE DONADORES SANOS Y PACIENTES CON MM.

En la Figura 2 se compara el número de células NK de donadores sanos contra las células NK de pacientes con MM observando que estas células se encuentran en menor cantidad en MM, las células NK en personas sanas son indispensables para la erradicación de enfermedades virales y oncológicas.

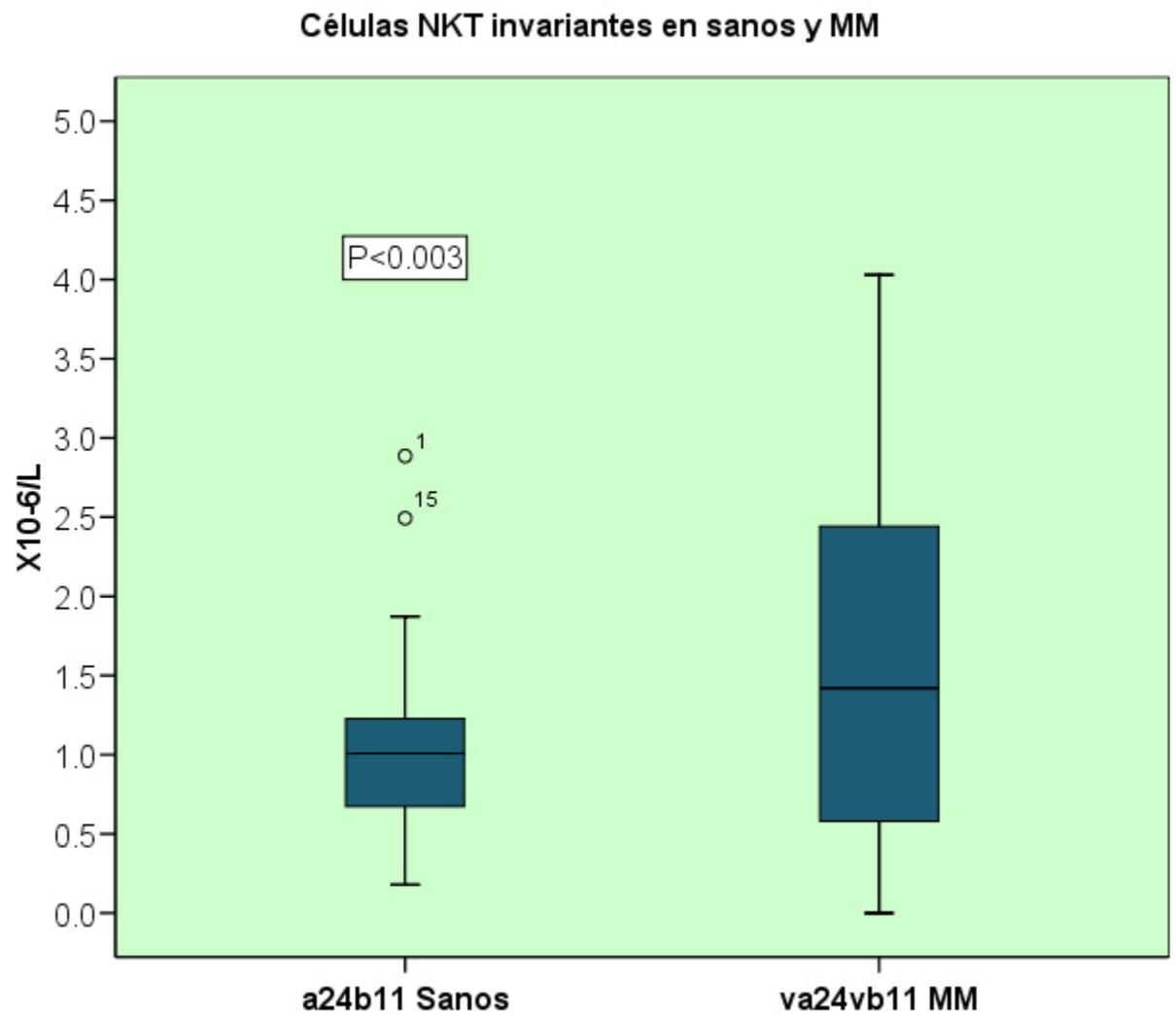
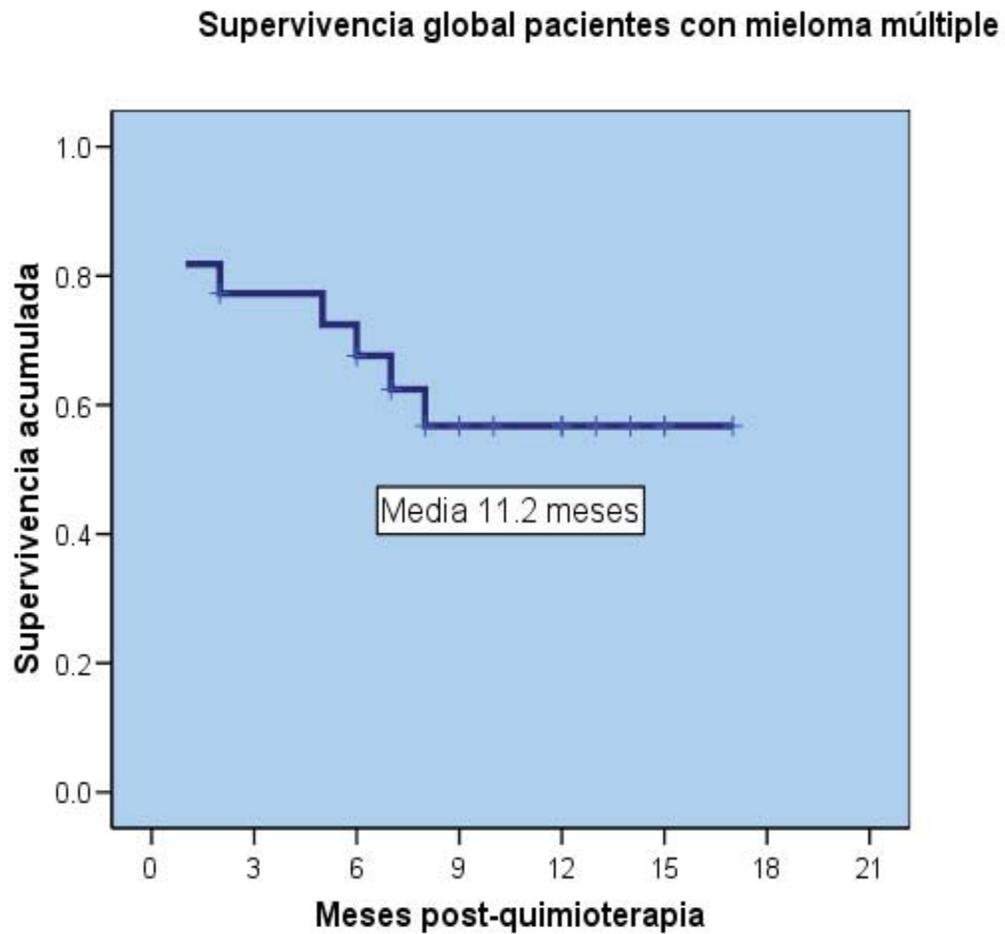


FIGURA 3. Comparación entre linfocitos NKT invariantes en sujetos sanos y pacientes con mieloma múltiple sin tratamiento. Se observa aumento en esta población en pacientes con mieloma.

FIGURA 4. SUPERVIVENCIA GLOBAL EN LOS PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.



RESUMEN DEL PROCESAMIENTO DE LOS CASOS

		Censurado	
No. Total	No. de eventos	No.	Porcentaje
22	9	13	59.1%

TABLA 6. MEDIA DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE.

Intervalo de Confianza al 95%			
<i>Estimación</i>	<i>Error típico</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
11.268	1.487	8.353	14.182

DISCUSIÓN

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de alteraciones de la respuesta inmune, tanto a nivel humoral como celular. Esto ocasiona que los pacientes tengan una mayor predisposición a infecciones y a una respuesta antitumoral defectuosa. (1,2)

En este estudio se examinó la respuesta inmune en pacientes con mieloma múltiple de reciente diagnóstico previo al inicio de tratamiento comparando con un grupo de sanos midiendo las células que intervienen en la inmunidad celular.

Esta reportado en estudios previos que los pacientes con MM tienen una distribución alterada de linfocitos CD4 y CD8 (inversión del índice CD4/CD8) debido a reducción en el número absoluto y porcentaje de linfocitos CD4+, en particular la variedad de linfocitos vírgenes (naive) CD4+ CD45RA. (4,5) Esta disminución celular es más pronunciada en pacientes con enfermedad avanzada y se ha demostrado que los pacientes con cifras de linfocitos CD4+ menores a $700 \times 10^6 /L$ tienen una menor supervivencia y una mayor probabilidad de recaída (6). Este dato se corroboró en nuestro estudio encontrando en el grupo de MM una mediana de 471.8 en comparación con donadores sanos que fue de 690.1 y obteniendo una $p = < 0.0001$.

Dentro de los hallazgos más significativos de este estudio observamos que las células NK se encuentran disminuidas en los pacientes con mieloma múltiple en comparación con los sujetos sanos, teniendo una $p < 0.001$: Las células natural killer (NK) son indispensables para la erradicación de enfermedades virales y oncológicas. La función citolítica de estas células está regulada por la expresión de receptores de superficie que pueden inhibir o

aumentar la citotoxicidad. Se ha demostrado que estas células son capaces de destruir a las células malignas del MM (14), sin embargo, muchos autores han reportado que son anormales en cuanto a número, fenotipo y función en pacientes con enfermedades oncohematológicas (15,16).

Las células NKT constituyen 0.02-0.2 por ciento del total de linfocitos T en la circulación periférica. Bajo la influencia de distintos estímulos son capaces de producir tanto citocinas de tipo Th1 (IFN- γ , IL-2) como Th2 (IL-4, IL-10, IL-13). (18,19,31,32) Se ha demostrado que la cantidad y función de las células NKT están disminuidas en algunas enfermedades autoinmunes, en pacientes trasplantados, y en alergias. Así mismo, se ha reportado disminución de estas células en la sangre periférica de pacientes con cáncer hematológico y no hematológico (18,19). En los pacientes con MM en recaída o progresión y no así en pacientes con gammopatía monoclonal de significado incierto ni en MM en estadio I, las células NKT son deficientes en la producción de IFN- γ inducida por alfa-galactosil-ceramida, lo cual indica una clara relación entre la pérdida en las funciones de estas células y la progresión clínica de la enfermedad (20).

En este estudio al momento de comparar las células NKT invariantes $\nu\alpha 24v\beta 11$ en el grupo de donadores sanos y en el grupo mieloma múltiple, encontramos que en este último las células NKTi están aumentadas en relación a los donadores sanos ($p < 0.003$), lo cual es un hallazgo que en mieloma múltiple no se ha reportado aún. Muchos estudios han sugerido una función supresora importante de las células NKT en la respuesta inmune contra infecciones y algunos tumores, por lo que este dato explicaría en parte otra alteración de la respuesta inmune en pacientes con MM, pues estas células supresoras pueden inhibir la respuesta citotóxica de los linfocitos T activados (33,34).

Las células NKT poseen un receptor de célula T semiinvariante con una expresión uniforme del gen de la cadena α en la región variable en el segmento 24 ($v\alpha 24$) preferentemente pareado con el gen de la cadena β en la región variable en el segmento 11 ($V\beta 11$) y expresan CD161, un marcador comúnmente encontrado en células NK. (32,33)

El papel principal para las células NKT $v\alpha 24$ parece estar en la regulación de la tolerancia inmune y el control de autoinmunidad. (31) La depleción o mal funcionamiento de estas células han sido observados en pacientes con diabetes, esclerosis sistémica y esclerosis múltiple. Por otra parte, las células NKT pueden ser citotóxicas contra líneas de células tumorales *in vitro* y jugar un papel en el rechazo de metástasis *in vivo* posiblemente por vía de la IL12 mediando la activación de células NK. (31,32)

Las células NKT $v\alpha 24$ y su contraparte murina, las células NKT $v\alpha 14$, son activadas e inducidas para proliferar en respuesta para estimulación específica por α -galactosilceramida, un efecto aumentado por la adición de IL2 y dependiente de la expresión en CD1d de células tales como monocitos y células dendríticas. Las células NKT activadas rápidamente en modelos murinos, secretan grandes cantidades de IL-4 e IFN gamma y pueden ejercer una actividad antitumoral potente directa e indirectamente y también en células tumorales humanas (33). Estas células también tienen funciones importantes en la regulación inmune y esta reportado que tienen una actividad inmune estimuladora y supresora dependiendo de las circunstancias o del modelo de sistema. Hay evidencias significativas que indican que las células NKT son protectoras contra autoinmunidad y EICH. (34-35)

Varios estudios reportan que tanto la inmunidad celular como la humoral se encuentran alteradas en los pacientes con mieloma múltiple (4,) y esto fue demostrado en este estudio al encontrar que los pacientes portadores de mieloma múltiple con diagnóstico de novo que no han recibido tratamiento, presentan una cantidad disminuida de las células CD8, CD3 NKT y células NKT invariantes, en comparación con los individuos sanos, donde los niveles de estas células se encuentran en cantidad normal. Y aunque estos subtipos celulares se encuentran alterados al momento de comparar con el grupo de donadores sanos, no se encontró una p estadísticamente significativa (CD8 $p = 0.2$, CD3 $p = 0.1$, NKT $p = 0.2$, $v\alpha 24 p = 0.2$, $v\beta 11 p = 0.8$), por lo que esto sugiere que aunque estos subvariedades celulares son importantes para la respuesta inmune, hay otros de mayor peso como son CD4, NK y algo nuevo que no se había reportado en mieloma múltiple es la importancia de las células NKT invariantes $v\alpha 24 v\beta 11$.

Una de las limitantes que tiene el presente estudio fue la falta de información de datos clínicos en el expediente, ya que no en todos los pacientes se tuvo la determinación de inmunoglobulinas y esto fue porque en cuatro de los pacientes no se recabó dicho resultado ya que fallecieron antes de recibirlo, y en 8 pacientes no se realizó determinación de proteína de Bence jones; solo en 19 pacientes se pudo determinar el tipo de lesiones líticas ya que no se encontraba la descripción de la serie ósea metastásica en el expediente de todos los pacientes, por lo que sería importante tener todos los datos completos y de esta manera correlacionar la presentación clínica con la respuesta inmune en sangre periférica en pacientes con mieloma múltiple de recientes diagnóstico y la supervivencia de acuerdo a estas características.

CONCLUSIONES

Con el presente estudio se concluye que los subtipos celulares de mayor importancia en la respuesta inmune en pacientes con mieloma múltiple de novo son CD4+, células NK y células NKT invariantes $v\alpha 24$ $v\beta 11$.

Por otra parte este estudio arroja una información que podría ser valiosa para continuar estudiando la respuesta inmune en pacientes con MM y tener un entendimiento más profundo de la comunicación entre las células NKT invariantes y otros tipos celulares y posteriormente servir como blanco terapéutico para esta enfermedad.

Se puede inferir que el estudio inmunológico de los pacientes con MM es fundamental, pues de su profundo conocimiento y por medio de proyectos de investigación basados en inmunología básica y clínica, con seguridad en un futuro se podrán corregir las alteraciones señaladas.

Bibliografia.

1. Bataille R, Boiron JM, Haagen IA, Cantaloube JF, Zhang XG, Boucheix C, Klein B. No expansion of the pre-B and B-cell compartments in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Cancer Res* 1991; 51:3224-3228.
2. Peest D, Brunkhorst U, Schedel I, Deicher H. In vitro immunoglobulin production by peripheral blood mononuclear cells from multiple myeloma patients and patients with benign monoclonal gammopathy. Regulation by cell subsets. *Scand J Immunol* 1984; 19:149-157.
3. Geppert T, Davis LS, Gur H, Walholtz M, Lipsky PE. Accessory cell signals involved in T cell activation. *Immunol Rev* 1990; 117:5-66.
4. San Miguel JF, Gonzalez M, Gascon A, Moro MJ, Hernandez JM, Ortega F, Jimenez R, Guerras L, Romero M, Casanova F, Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1992; 80:305-309.
5. Serra HM, Mant MJ, Ruether BA, Ledbetter JA, Pilarski LM. Selective loss of CD4+CD45RA+ T cells in peripheral blood of myeloma patients. *J Clin Immunol* 1988; 8:259-265.
6. Yi Q, Bergenbrant S, Osterborg A, Osby E, Ostman R, Bjorkholm M, Holm G, Lefvert AK.. T cell stimulation induced by idiotypes on monoclonal immunoglobulins in patients with monoclonal gammopathies. *Scand J Immunol* 1993; 38:529-534.
7. Kolenko V, Bloom T, Rayman P, Bukowski R, His E, Finke J. Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis

- without detectable activation of caspase-1 and -3. *J Immunol.* 1999; 15; 163:590-598.
8. Bianchi A, Mariani S, Beggiato E, Borrione P, Peola S, Boccadoro M, Pileri A, Massaia M. Distribution of T cell signaling molecules in human myeloma. *Br J Haematol* 1997; 97:815-820.
 9. Massaia M, Borrione P, Attisano C, Barral P, Beggiato E, Montacchini L, Bianchi A, Boccadoro M, Pileri A. Dysregulated Fas and bcl-2 expression leading to enhanced apoptosis in T cells on multiple myeloma patients. *Blood* 1995; 85:3679-3687.
 10. Urashima M, Chauhan D, Uchiyama H, Freeman GJ, Anderson KC. CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma. *Blood* 1995; 85:1903-1912.
 11. Robillard N, Jegou G, Pellat-Deceunynck C, Pineau D, Puthier D, Mellerin MP, Barille S, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1521-1526.
 12. Sze DM, Brown RD, Yuen E, Gibson J, Ho J, Raitakari M, Basten A, Joshua DE, Fazekas De ST, Groth B. Clonal Cytotoxic T cells in myeloma. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:1667-1674.
 13. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-640.
 14. Frohn C, Hoppner M, Schlenke P, Kirchner H, Koritke P, Luhm J. Anti-myeloma activity of natural killer lymphocytes. *Br J Haematol* 2002; 119:660-664.
 15. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and

- function of natural killer cell triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99:3661-3667.
16. Konjevic G, Jurisic V, Banicevic B, Spuzic I.. The difference in NK-cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 1999; 104:144-151.
 17. Van Der Vliet HJ, Molling JW, Von Blomberg BME, Nishi N, Kölgen W, Van Der Eertwegh AJM, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer cells in disease. *Clin Immunol* 2004; 112:8-23.
 18. Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bubley GJ, Wilson SBBalk SP, Exley MA. Loss of IFN- γ production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 2001; 167:4046-4050.
 19. Fujii S, Shimizu K, Klimek V, Geller MD, Nimer SD, Dhodapkar MV. Severe and selective deficiency of interferon-gamma-producing invariant natural killer T cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2003; 122:617-622.
 20. Dhodapkar MV, Geller MD, Chang DH, Shimizu K, Fujii S, Dhodapkar KM, Krasovsky J. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J Exp Med* 2003; 197:1667-1676.
 21. Guven H, Gilljam M, Chambers BJ, Ljunggren HG, Christensson B, Kimbi E, Dilber MS. Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia* 2003; 17:1973-1980.

22. Cook G, Campbell JD, Carr CE, Boyd KS, Franklin IM. Transforming growth factor beta from multiple myeloma cells inhibits proliferation and IL-2 responsiveness in T lymphocytes. *J Leukocyte Biol* 1999; 66:981-988.
23. Villunger A, Egle A, Marschitz I, Kos M, Bock G, Ludwig H, Geley S, Kofler R, Greil R. Constitutive expression of Fas (Apo-1/Cd95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood* 1997; 90:12-20.
24. Brown R, Murray A, Pope B, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D. Either interleukin-12 or interferon-gamma can correct the dendritic cell defect induced by transforming growth factor beta in patients with myeloma. *Br J Haematol* 2004; 125:743-748.
25. Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1998; 160:1224-1232.
26. Treon SP, Maimonis P, Bua D, Young G, Raje N, Mollick J, Chauhan D, Tai YT, Hideshima T, Shima Y, Hilgers J, von Mensdorff-Pouilly S, Belch AR, Pilarski LM, Anderson KC. Elevated soluble MUC1 levels and decreased anti-MUC1 antibody levels in patients with multiple myeloma. *Blood* 2000; 96:3147-3153.
27. Lu ZY, Zhang XG, Rodriguez C, et al. Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. *Blood* 1995;85:2521-2527.

28. Stasi R, Brunetti M, Bussa S, Pagano A. Serum interleukin-10 in plasma-cell dyscrasias. *Am J Hematol.* 1997; 54(4):335-337.
29. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:4120-4125.
30. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102:1389-1396.
31. Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, Chiba S, Miura O, Sakamaki H, Hirai H. Recovery of V α 24 β 11 NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 34, 595–602.
32. Crough T, Nieda M, Nico A. J Granulocyte Colony-Stimulating Factor Modulates -Galactosylceramide-Responsive Human V α 24_V β 11_NKT Cells. *The Journal of Immunology*, 2004, 173: 4960–4966.
33. Hammond K and Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity?. *Current Opinion in Immunology* 2003, 15:1–7.
34. Kim C., Johnston B, Butcher E. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V α 24V β 11 NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood.* 2002;100:11-16.
35. Baev D, Peng X, Song L, Barnhart J, Crooks G, Weinberg K, Metelitsa L. Distinct homeostatic requirements of CD4⁺ and CD4⁻ subsets of V α 24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood.* 2004;104:4150-4156.

ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLINICA

Lugar y Fecha

México, D.F. Agosto del 2006

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

Evaluación de la Inmunidad Celular en pacientes con Diagnóstico de Mieloma Múltiple de novo comparada con la de individuos sanos.

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:

El objetivo del estudio es:

Evaluar la respuesta inmune celular en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

*Toma de muestra de sangre periférica.***Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:***Este estudio no implica ningún riesgo contra su salud, ya que la única complicación que podría presentarse es una flebitis que se puede presentar por la punción en vena periférica, sin embargo los beneficios que se obtendrán será conocer como se encuentra la cantidad de células que participan en su sistema de defensa (inmune) y de esta manera conocer si esto tiene algún valor pronóstico en su enfermedad y de acuerdo a esto que tenga algún efecto en la sobrevida.*

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable.

Jorge Vela Ojeda

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:

*Tel. 57245900 Ext 23213**Tel. 044 55 20895819*

Testigos

Este formato constituye sólo un modelo que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación y sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810 – 009 – 013

a

a

ANEXO

CLASIFICACIÓN POR ESTADIOS DEL MIELOMA MÚLTIPLE (DURIE Y SALMON).

Estadio	Criterios	Masa tumoral (células x $10^{12}/m^2$)
I	Todos los siguientes: 1. Hemoglobina >10 g/dl 2. Calcemia normal 3. Radiología ósea normal 4. Bajo componente monoclonal: a. IgG < 5 g/dl b. IgA < 3 g/dl c. Eliminación de cadenas ligeras en orina < 4g/24 h	Baja (<0.6)
II	No clasificable en estadio I ni III	Intermedia (0.6-1.2)
III	Uno o más de los siguientes: 1. Hemoglobina <8.5 g/dl 2. Calcemia corregida > 11.5 mg/dl 3. Lesiones óseas avanzadas (escala 3) 4. Alto componente monoclonal: a. IgG > 7 g/dl b. IgA > 5 g/dl 5. Cadenas ligeras orina >12 g/24 h	Alta (>1.2)
Subclasificación	I A. creatinina < 2 mg/dl B. creatinina \geq 2 mg/dl	

Tomado de : Greipp P., San Miguel J., Durie B.. International Staging System for multiple myeloma. J. Oncol 2005; 23(15) 3412-3420.

ANEXO

NUEVO SISTEMA DE CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

Estadio	Criterios	Supervivencia mediana (meses)
I	B2-microglobulina sérica <3.5 mg/L Albúmina sérica \geq 3.5 g/dl	62
II	No estadio I ni III	44
III	B2-microglobulina sérica \geq 5.5 mg/L	29

Tomado de : Greipp P., San Miguel J., Durie B.. International Staging System for multiple myeloma. J. Oncol 2005; 23(15) 3412-3420.