



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Caracterización molecular de los genes B7, MDR y ATCs como factor pronóstico en Mieloma Múltiple

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:  
ADRIÁN DE LA CRUZ ROSAS

ASESORA DE TESIS: DRA. IRMA OLARTE CARRILLO  
CO-ASESOR DE TESIS: DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Caracterización molecular de los genes B7, MDR y ATCs como factor pronóstico en Mieloma Múltiple.**

Que presenta el pasante: **Adrián De la Cruz Rosas**

Con número de cuenta: 308022711 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Andrés Romero Rojas	
<b>VOCAL</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Ma. Llasbeth Hernández Calderón	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Este trabajo fue apoyado por CONACYT con el número de proyecto 162269 así como por la Dirección de Investigación del Hospital General de México con los números de registro DIC/09/04/03/131, DIC/08/204/04/017, DIC/12/204/05/01

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todo el amor, el esfuerzo, el cariño, las enseñanzas y los sacrificios requeridos para forjar el camino sobre el cual me enseñaron a andar. A pesar de las vicisitudes y las breves tempestades que existen en el camino, estoy completamente seguro de que ha sido el correcto para mí y que no elegiría otras manos que no fueran las de ustedes para tomar la mía y recorrerlo. Espero no haberlos defraudado tanto en lo que va del camino y espero algún día poder retribuirles un poco de todo lo que me han brindado. Un párrafo nunca será suficiente para expresar todo el agradecimiento que siento y sentiré toda la vida. Gracias por ser mis padres, estoy orgulloso de ustedes. Pa, Ma, los amo.

A mi hermano, mi compañero de vida, porque a pesar de no ser yo el mejor hermano mayor ni el mejor ejemplo de cómo hacer bien las cosas, estás ahí para mí. Gracias por todo el apoyo, por las lecciones que me has brindado y por todo el amor incondicional que siempre has demostrado. Quiero que sepas que estoy muy orgulloso de ti y que siempre estaré para ti. Te amo hermano.

A la familia Rosas Morales, en especial a mis tíos: Silvia, Beatríz y Carlos, por todo su cariño, sus enseñanzas y el apoyo incondicional que está presente a pesar de la distancia o el tiempo.

A la familia De la Cruz González, por todo su apoyo desde el inicio de mi formación académica.

A la Doctora Irma Olarte Carrillo, por adoptarme como su alumno, su compañero de trabajo y como miembro de su familia postiza; por todo el conocimiento compartido, tanto académico como de vida; por la confianza, por esos jalones de orejas y todos los triunfos que han ido cosechándose a lo largo del camino. Es un enorme placer ser su alumno y aprender de usted cada día. Gracias por la paciencia Doctora, ¡lo logramos!

Al Doctor Adolfo Martínez Tovar, por todo el apoyo y la confianza. Gracias por compartir ese enorme conocimiento y por todas las facilidades que me ha brindado desde el día en que llegué al laboratorio. Gracias por permitirme formar parte de este formidable equipo de trabajo, excelente grupo de amigos y sobre todo, de esta gran familia, de la cual he aprendido un sinfín de lecciones.

A Anel, por toda la sabiduría, la profunda confianza y la enorme amistad que han ido cosechándose a lo largo de este viaje. Gracias por demostrarme que la verdadera amistad puede encontrarse en los lugares menos imaginados; por todas las lecciones, por la compañía en esos tragos dulces y en los no tan dulces, por las risas y las caras largas, por los consejos y los regaños, y por ser ese oído siempre dispuesto a escuchar.

A Rafael, por las incontables enseñanzas académicas y de vida compartidas, incluso sin saberlo. Gracias por ser el mejor ejemplo de que el esfuerzo y la dedicación son la base para lograr grandes cosas. Gracias por ser un modelo a seguir, un formidable maestro y una inagotable fuente de inspiración. Sobre todo, gracias por esta hermandad que, sin duda, me ha hecho crecer como profesional y como persona. Gracias por todo, hermano.

A Iveth, por todo el conocimiento y el buen humor siempre tan necesarios en un equipo de trabajo. Gracias por la amistad y el apoyo que me has demostrado desde que llegué al laboratorio.

A Daniela, por darle significado a la palabra "amistad". Nunca podré terminar de expresar el inconmensurable agradecimiento y cariño que siento. Gracias por la paciencia, por la incondicionalidad, por el apoyo, por ser guía, por ser camino. Gracias por ser, gracias por estar. Gracias por TODO. Te quiero, Maic.

A Alejandra, por toda la paciencia, el cariño y la ternura que nunca me han abandonado. Gracias por demostrarme que la amistad verdadera perdura a pesar de todo y que las caídas y los golpes sirven para aprender a sanar y levantarse.

A mis eternos amigos: Mónica, por todos los consejos, lecciones y situaciones que me han hecho crecer como ser humano; Carla, por enseñarme a afrontar la vida con una sonrisa y buen humor; Daniel, por la sabiduría y el conocimiento que me han convertido en una mejor persona; y Oscar, por enseñarme que la Vida te pone en el lugar correcto en el momento indicado. Gracias a los cuatro por su apoyo, el cual ha sido invaluable en varias etapas de mi vida.

A cada uno de los médicos, químicos, laboratoristas, técnicos, auxiliares, administrativos y personal en general del servicio de Hematología del Hospital General de México que me brindaron su apoyo y su ayuda a lo largo de este proyecto.

A mi amada Universidad, por todos los conocimientos, las lecciones y las personas que me dejó a lo largo de este proceso de formación humana y profesional. Estaré eternamente agradecido y lleno de orgullo por pertenecer a esta gloriosa Institución. ¡GOYA!

Al Doctor Andrés Romero Rojas, por su asesoría, apoyo y disposición, que hicieron este trabajo posible. Gracias por los conocimientos compartidos en la escuela y por contribuir a la formación académica y profesional mía y de cada alumno en proceso de formación.

A cada uno de los Maestros y profesores que me han guiado a lo largo de todo éste proceso. Gracias por contribuir a la formación profesional de los jóvenes de este país y aportar un poco al mejoramiento de esta sociedad, que tanto lo necesita.

A la Vida, por permitirme ser, por permitirme estar; por ponerme en el lugar correcto, en el momento correcto, en la situación correcta; por darme tanto y colmarme de bendiciones.

# I. ÍNDICE GENERAL

<b>I. ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>II. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>III. ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>IV. ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>V. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
1.1 CÁNCER.....	2
1.2 MIELOMA MÚLTIPLE .....	2
1.2.1 <i>Introducción</i> .....	2
1.2.2 <i>Definición</i> .....	4
1.2.3 <i>Etiología</i> .....	4
1.2.4 <i>Epidemiología</i> .....	5
1.2.5 <i>Clasificación</i> .....	5
1.2.5.1 <i>Clasificación Inmunológica</i> .....	6
1.2.5.2 <i>International Staging System (ISS)</i> .....	6
1.2.5.3 <i>Clasificación Durie-Salmon</i> .....	7
1.2.5.4 <i>Clasificación molecular</i> .....	7
1.2.5.5 <i>Formas extrañas de mieloma múltiple</i> .....	8
1.2.6 <i>Diagnóstico</i> .....	8
1.2.7 <i>Fisiopatología de la enfermedad</i> .....	10
1.2.8 <i>Tratamiento</i> .....	13
1.3 MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS DE LA FAMILIA B7 .....	16
1.3.1 <i>B7-1/B7-2 (CD80/CD86)</i> .....	18
1.3.2 <i>B7H1 (PD-L1, CD274)</i> .....	19
1.3.3 <i>B7H2 (ICOSL/CD275/B7h)</i> .....	19
1.3.4 <i>B7H3 (CD276)</i> .....	20
1.3.5 <i>B7H4 (B7x/B7S1/VTCN1)</i> .....	20
1.3.6 <i>B7H5 (VISTA/PD-1H/Gi24/DIES1)</i> .....	21
1.3.7 <i>B7H6</i> .....	21
1.3.8 <i>B7H7 (HHLA2)</i> .....	21
1.4 ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER (ATC/CTA).....	23

1.4.1	<i>Expresión normal</i> .....	24
1.4.2	<i>Expresión en células tumorales</i> .....	24
1.4.3	<i>Regulación de la expresión</i> .....	24
1.4.4	<i>Función de los ATC</i> .....	25
1.4.5	<i>Familia MAGE</i> .....	26
1.4.6	<i>NY-ESO1</i> .....	26
1.4.7	<i>SSX1</i> .....	27
1.5	GENES DE MULTI-DROGO RESISTENCIA (MDR) .....	29
1.5.1	<i>Fenómeno de Multi-Drogo Resistencia</i> .....	29
1.5.2	<i>Estructura y función</i> .....	29
1.5.3	<i>P-gp/ABCB1 (MDR1)</i> .....	30
1.5.3.1	Polimorfismo 3437C >T.....	32
1.5.4	<i>BCRP/ABCG2</i> .....	32
1.5.4.1	Polimorfismo 421C >A .....	33
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	35
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES .....	35
<b>5.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>36</b>
5.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	36
5.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	36
5.3	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	36
5.4	VARIABLES EXPERIMENTALES .....	36
5.4.1	<i>Variables independientes</i> .....	36
5.4.2	<i>Variables dependientes</i> .....	36
5.5	TAMAÑO DE LA MUESTRA .....	36
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
6.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
6.1.1	<i>Aspirado de médula ósea (AMO)</i> .....	37
6.1.2	<i>Líneas celulares</i> .....	37
6.1.3	<i>Tejido testicular</i> .....	37
6.2	AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS DE AMO.....	38
6.3	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL.....	38
6.4	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO .....	39
6.5	CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y LA INTEGRIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO .....	39



6.6	SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA).....	39
6.7	RT-PCR DE LOS GENES ESTUDIADOS .....	40
6.8	QRT-PCR DE LA FAMILIA DE GENES ABC .....	41
6.9	GENOTIPIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS C3435T (ABCB1) Y C421A (ABCG2).....	42
6.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CORRELACIÓN CLÍNICA .....	42
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
7.1	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN.....	43
7.2	EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO Y ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DE LA MUESTRA.....	46
7.3	EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS B7 EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE .....	47
7.3.1	<i>Controles positivos de reacción .....</i>	<i>47</i>
7.3.2	<i>Frecuencia de expresión de los genes B7 .....</i>	<i>48</i>
7.4	EXPRESIÓN DE GENES ATC EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE .....	52
7.4.1	<i>Controles de reacción .....</i>	<i>52</i>
7.4.2	<i>Frecuencia de expresión de los genes ATC .....</i>	<i>52</i>
7.5	EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES ABC .....	55
7.5.1	<i>Normalización del estudio .....</i>	<i>55</i>
7.5.2	<i>Expresión de los genes ABCB1 y ABCG2 .....</i>	<i>56</i>
7.6	IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS 3435C >T Y 421C >A .....	58
7.7	CORRELACIÓN CLÍNICA: EXPRESIÓN VS DATOS CLÍNICOS .....	60
<b>8.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
8.1	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN.....	62
8.2	EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS B7.....	62
8.3	EXPRESIÓN DE LOS GENES ATC .....	65
8.4	EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES ABC .....	67
8.5	GENOTIPIFICACIÓN .....	71
8.6	CORRELACIÓN CLÍNICA: EXPRESIÓN DE LOS GENES VS DATOS CLÍNICOS .....	74
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>89</b>
12.1	ABREVIATURAS .....	89
12.2	SECUENCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS .....	90

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Morfología de las células plasmáticas normales	3
<b>Figura 2.-</b> Diagnóstico morfológico del Mieloma Múltiple	10
<b>Figura 3.-</b> Eventos oncogénicos asociados a la progresión del Mieloma Múltiple	12
<b>Figura 4.-</b> Rol del nicho medular en la patogénesis del mieloma múltiple	13
<b>Figura 5.-</b> Supervivencia general en pacientes con Mieloma Múltiple	14
<b>Figura 6.-</b> Sinapsis co-estimuladora	17
<b>Figura 7.-</b> Estructura general de la familia de moléculas B7	17
<b>Figura 8.-</b> Regulación epigenética de la expresión de genes ATC	25
<b>Figura 9.-</b> Supervivencia con base en el patrón de expresión de genes ATC	28
<b>Figura 10.-</b> Estructura y mecanismo general de los transportadores ABC	30
<b>Figura 11.-</b> Estructura de la glicoproteína-P (P-gp/ABCB1)	31
<b>Figura 12.-</b> Estructura de la BCRP/ABCG2	32
<b>Figura 13.-</b> Verificación de la integridad de DNA en 10 pacientes	46
<b>Figura 14.-</b> Verificación de la integridad de RNA en 9 pacientes con Mieloma Múltiple	46
<b>Figura 15.-</b> Genes constitutivos $\beta$ 2-microglobulina (394pb) y GAPDH (221pb)	47
<b>Figura 16.-</b> Controles de reacción para genes B7	47
<b>Figura 17.-</b> Controles de reacción para genes ATC	52
<b>Figura 18.-</b> Plot de discriminación alélica para el polimorfismo 421C >A	59

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Distribución clonal en Mieloma Múltiple	6
<b>Tabla 2.-</b> Sistema internacional de estratificación para Mieloma Múltiple (ISS)	6
<b>Tabla 3.-</b> Sistema de clasificación Durie-Salmon	7
<b>Tabla 4.-</b> Clasificación molecular de Mieloma Múltiple	8
<b>Tabla 5.-</b> Seguimiento diagnóstico para Mieloma Múltiple	9
<b>Tabla 6.-</b> Parámetros confirmatorios de Mieloma Múltiple	10
<b>Tabla 7.-</b> Translocaciones comunes en el locus IgH	11
<b>Tabla 8.-</b> Componentes del sistema B7 de co-estimulación/co-inhibición	18
<b>Tabla 9.-</b> Miembros ATC mayormente caracterizados	23
<b>Tabla 10.-</b> Principales sustratos de la glicoproteína-P	31
<b>Tabla 11.-</b> Sustratos quimioterapéuticos principales de la BCRP	33
<b>Tabla 12.-</b> Líneas celulares y tejidos utilizados como controles	37
<b>Tabla 13.-</b> Reactivos utilizados para los ensayos de PCR	40
<b>Tabla 14.-</b> Perfiles térmicos de las reacciones	41
<b>Tabla 15.-</b> Sondas Taqman® empleadas para cuantificación de niveles de expresión	41
<b>Tabla 16.-</b> Medias y rangos de los valores clínicos de la población de estudio	44
<b>Tabla 17.-</b> Presencia/ausencia de genes B7 en la población de estudio	49
<b>Tabla 18.-</b> Presencia/ausencia de genes ATC en la población de estudio	53
<b>Tabla 19.-</b> Correlación clínica entre la expresión de genes B7 vs los parámetros clínicos analizados	60
<b>Tabla 20.-</b> Correlación clínica entre la expresión de genes ATC y los parámetros clínicos analizados	61
<b>Tabla 21.-</b> Comparación de los estadios clínicos en pacientes con sobreexpresión de MDR1	68
<b>Tabla 22.-</b> Comparativa de los niveles de expresión de ABCB1 contra el genotipo presentado	72
<b>Tabla 23.-</b> Comparativa de los niveles de expresión de ABCG2 contra el genotipo presentado	73

## IV. ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.-</b> Características generales de la población	43
<b>Gráfico 2.-</b> Características clínicas de la población	45
<b>Gráfico 3.-</b> Frecuencia de expresión de los genes B7 en la población de estudio	48
<b>Gráfico 4.-</b> Frecuencia de expresión de genes B7 por grupos de edad	50
<b>Gráfico 5.-</b> Frecuencia de expresión de los genes B7 por estadio clínico ISS	50
<b>Gráfico 6.-</b> Frecuencia de expresión de los genes B7 por estadio Durie-Salmon	51
<b>Gráfico 7.-</b> Frecuencia de expresión de los genes ATC en la población de estudio	53
<b>Gráfico 8.-</b> Frecuencia de expresión de los genes ATC por estadio clínico ISS	54
<b>Gráfico 9.-</b> Frecuencia de expresión de los genes ATC por estadio clínico Durie-Salmon	55
<b>Gráfico 10.-</b> Niveles de los expresión relativos de ABC-B1 y ABC-G2 en donadores sanos	56
<b>Gráfico 11.-</b> Expresión relativa de los genes ABC-B1 y ABC-G2	56
<b>Gráfico 12.-</b> Niveles de expresión de ABCB1 en pacientes con MM y en donadores sanos	57
<b>Gráfico 13.-</b> Niveles de expresión de ABC-G2 en pacientes con MM y en donadores sanos	57
<b>Gráfico 14.-</b> Distribución de la frecuencia genotípica del polimorfismo 3435C >T	58
<b>Gráfico 15.-</b> Distribución de la frecuencia genotípica del polimorfismo 421C >A	59

## V. RESUMEN

El mieloma múltiple es una enfermedad perteneciente al grupo de las llamadas neoplasias hematológicas. Esta enfermedad representa el 2% de todos los cánceres en todo el mundo y alrededor del 13% de las neoplasias hematológicas. Considerada hasta hace no mucho como una enfermedad propia de la tercera edad, el mieloma múltiple cuenta con una edad al diagnóstico de 66 años, siendo ésta cada vez menor y encontrándose casos a edades cada vez más tempranas. Esta neoplasia consiste en la presencia anormal de células plasmáticas en médula ósea, acompañada de anemia, lesiones osteolíticas, hipercalcemia y falla renal. Las células mielomatosas hacen uso de diversos mecanismos que le permiten proliferar y sobrevivir, con lo que se da la progresión de la enfermedad. Estos mecanismos incluyen evasión a la respuesta inmunológica del hospedero, evasión de la apoptosis y aumento del ciclo celular, y la generación de resistencia a la quimioterapia. Existen varios genes de los cuales se valen las células tumorales para controlar estos mecanismos, siendo de los más importantes los genes de la familia de moléculas co-estimuladoras B7, que codifican para proteínas que estimulan o inhiben la activación linfocitaria contra antígenos extraños; los genes que codifican para los antígenos testiculares de cáncer (ATC), cuya acción interviene directamente en el ciclo celular y la alteración de procesos celulares como la apoptosis; y los genes ABC, que codifican para transportadores cuya función es proteger a las células de agentes citotóxicos (como los agentes quimioterapéuticos) a través de su expulsión del citoplasma celular y la consecuente disminución de su acción.

En el presente trabajo se analizó la expresión de los genes B7.1, B7.2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6 (pertenecientes a la familia de moléculas co-estimuladoras B7), MAGE-A3, MAGE-C1, NY-ESO1, SSX-1 (pertenecientes a la familia de genes ATC) mediante ensayos de RT-PCR en punto final, y los genes ABC-B1, ABC-G2, ABC-C1 y ABC-A3 (pertenecientes a la familia de transportadores ABC) mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) a partir de muestras de aspirado de médula ósea con el fin de evaluar su utilidad clínica en el posible pronóstico del paciente.

Se encontró que los genes B7H4 y SSX1 se expresan en la mayoría de la población, encontrándose una correlación directa con los niveles de albúmina sérica y la edad, respectivamente. También se determinaron los niveles de expresión relativa de los genes ABC-B1 y ABC-G2, teniéndose pacientes con sobre-expresión, expresión normal, baja expresión y expresión nula. Además, se detectaron los polimorfismos 3435C>T y 421A>T de los genes de multi-drogo resistencia ABC-B1 y ABC-G2, respectivamente.

A pesar de no haber encontrado datos estadísticamente significativos que asocien el panel de genes analizados con un pronóstico, estos genes pueden dar una idea general del estado inmunológico de la enfermedad, así como de los mecanismos que controlan el ciclo celular y la resistencia a fármacos por parte de las células tumorales.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 CÁNCER

El cáncer representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, pues es una de las principales causas de morbilidad en todo el mundo: en 2012 se registraron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer<sup>1</sup>. Diversos factores tanto ambientales como propios de la célula son cruciales para que se dé una serie de alteraciones moleculares a nivel celular que desembocan en la generación del cáncer. Las células neoplásicas presentan características que les permiten proliferar y prevalecer. Estas características incluyen: evasión de supresores de crecimiento, evasión de la respuesta inmunológica, aumento en la replicación, inflamación crónica, migración celular, inducción de angiogénesis, inestabilidad génica y mutación continua, resistencia a muerte celular, desregulación de nutrición celular y señalización proliferativa sostenida<sup>2</sup>.

Con base en el tipo celular a partir del cual se desarrollan, los cánceres son clasificados en carcinomas (neoplasias formadas a partir de células del epitelio), sarcomas (neoplasias originadas en tejido conectivo o tejido muscular), y neoplasias hematológicas (derivadas de tejido troncal hematopoyético), las cuales comprenden a las leucemias, los linfomas y el **mieloma múltiple**<sup>3</sup>.

## 1.2 MIELOMA MÚLTIPLE

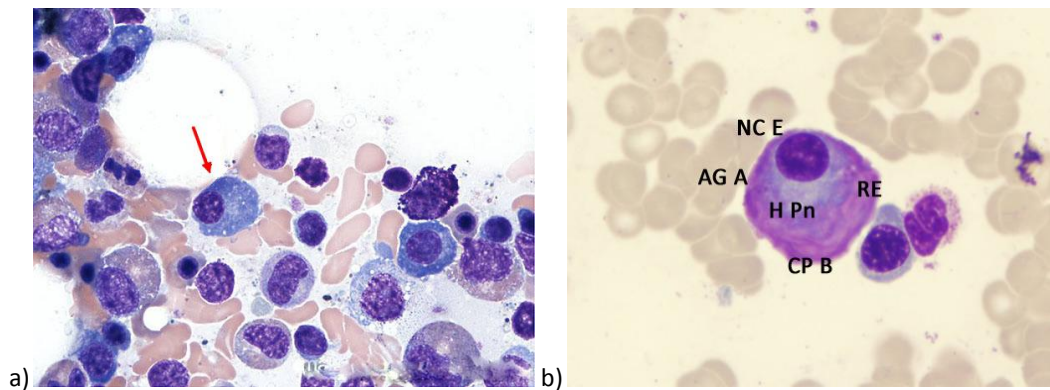
### 1.2.1 INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple es una enfermedad que atañe a la serie linfocítica B y su forma más madura, la célula plasmática. Las células B se originan a partir de células troncales hematopoyéticas pluripotenciales. Este proceso, en sus etapas más tempranas, se desarrolla en entornos libres de antígenos extraños en la médula ósea. La maduración y diferenciación de las células B comprende dos fases mayores: una primera fase que consiste en la generación de receptores resultantes de los reordenamientos génicos que tienen lugar en órganos linfoides primarios y que no requieren la presencia de antígenos extraños; y una segunda fase en la cual las células B se activan y diferencian en respuesta a antígenos extraños<sup>4-8</sup>.

La estimulación de las células B foliculares por el linfocito T mediante su unión por el ligando de CD40 induce la generación de distintos tipos celulares, entre los que se encuentran las células plasmáticas productoras de Inmunoglobulinas (Ig)<sup>9</sup>.

Las células plasmáticas son células secretoras de anticuerpos postmitóticas<sup>10</sup>. Existen en todos los órganos linfoides, aunque la frecuencia es un tanto variable entre cada uno. Las células plasmáticas también se encuentran presentes, aunque con baja frecuencia, en médula ósea. Este órgano es considerado el sitio para el mantenimiento a largo plazo de las células plasmáticas que surgen de una inmunización<sup>11</sup>.

Morfológicamente, las células plasmáticas presentan núcleos característicos, citoplasma abundante con un retículo endoplásmico rugoso denso, lugar donde se sintetizan proteínas (en su mayoría anticuerpos), y complejos de Golgi perinucleares diferenciados, donde las inmunoglobulinas maduran a sus formas finales y se empaquetan para su secreción (Figura 1). Aproximadamente un 50% del RNA mensajero de las células plasmáticas codifican para anticuerpos<sup>12</sup>.



**Figura 1.-** Morfología de las células plasmáticas normales. **a)** Frotis de médula ósea donde se observa una célula plasmática, indicada con la flecha roja. **b)** Imagen de célula plasmática aislada. **NC E:** Núcleo Celular Excéntrico. **AG A:** Aparato de Golgi Abundante. **RE:** Retículo Endoplásmico rugoso **H Pn:** Halo Perinuclear. **CP B:** Citoplasma basófilo. La célula plasmática tiene un diámetro de 10 a 20  $\mu\text{m}$  y presenta generalmente forma ovalada. Su núcleo es redondo y excéntrico con una disposición de la heterocromatina como “ruedas de carreta”. El citoplasma se caracteriza por un gran desarrollo de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi.

Aunque todas las células B  $\text{slg}^+$  (Inmunoglobulina de superficie positivas) tienen la capacidad para generar células plasmáticas secretoras de anticuerpos, no todas las células plasmáticas son idénticas. Existen diferencias en el tiempo de vida media, expresión de marcadores de superficie y la cantidad e isotipo de anticuerpo que secretan<sup>6</sup>. Estas diferencias dependen de la naturaleza del antígeno que induce la diferenciación, el microambiente del órgano en el que son desarrolladas y el microambiente del órgano en el que residen. Con base en estas diferencias, la célula plasmática es clasificada como célula plasmática de vida larga (médula ósea y bazo) y células plasmáticas de

vida corta (sangre periférica y bazo), correspondiendo a células plasmáticas en su etapa más madura y en proceso de maduración, respectivamente<sup>9</sup>.

Las anomalías genéticas en genes indispensables para el desarrollo, la regulación el control del crecimiento y la apoptosis de células B y células plasmáticas, producen diversas enfermedades que involucran inmunodeficiencias, autoinmunidades y neoplasias<sup>13</sup>.

### 1.2.2 DEFINICIÓN

El mieloma múltiple, o enfermedad de Kahler, pertenece al grupo de desórdenes conocidos como gammopatías monoclonales y se define como una neoplasia progresiva de células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Es una malignidad relacionada al desarrollo de células B que se caracteriza por la presencia de una inmunoglobulina monoclonal (generalmente isoformas IgA e IgG, o cadenas ligeras), conocida como proteína M; y plasmocitosis en médula ósea. La proliferación plasmomedular da lugar a destrucción ósea, con osteólisis, hipercalcemia, anemia y, en ocasiones, plasmocitomas extramedulares<sup>14</sup>. De igual manera, la sobreproducción de la paraproteína monoclonal tiene como consecuencias: a) insuficiencia renal, b) infecciones recurrentes o c) síndrome de hiperviscosidad.

El mieloma múltiple es una enfermedad heterogénea, habiendo pacientes cuya esperanza de vida va de semanas al diagnóstico, a más de 10 años. La razón de esta heterogeneidad es que existe una asociación muy fuerte entre los factores del hospedero y las características intrínsecas de la enfermedad, tales como las genéticas, las cuales dictan el curso clínico de la enfermedad<sup>15</sup>.

### 1.2.3 ETIOLOGÍA

La etiología del mieloma múltiple permanece desconocida, aunque se ha reportado una mayor incidencia en personas expuestas a radiaciones, pesticidas e insecticidas<sup>16</sup>. Estudios recientes indican que la seropositividad a virus de hepatitis B aumenta levemente el riesgo de desarrollar mieloma múltiple<sup>17</sup>, aunque esto no implica una etiología vírica consistente.

El mieloma múltiple casi siempre emerge a partir de casos de gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS, por sus siglas en inglés: *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*), o de mieloma quiescente<sup>18</sup>. Dado que el mieloma múltiple es una enfermedad progresiva, actualmente se considera que aparece como consecuencia de varios sucesos oncogénicos ocurridos en la diferenciación y maduración de la serie linfocítica B que pueden ocurrir en meses o años. Diversos estudios moleculares y citogenéticos han demostrado la



presencia de alteraciones cromosómicas en la fase de MGUS, afectando principalmente el locus IgH (14q32.3). La adquisición de nuevas anomalías citogenéticas favorece la progresión a un mieloma sintomático.

#### 1.2.4 EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial, se estima que se diagnostican más de 100,000 casos de mieloma múltiple al año<sup>19</sup>, representando alrededor del 2% de todos los cánceres y alrededor del 13% de todas las neoplasias hematológicas diagnosticadas<sup>18</sup>. En nuestro país, el mieloma múltiple constituye del 4.2 al 7.7% de las enfermedades onco-hematológicas diagnosticadas, aunque esto sólo corresponde a la experiencia de un solo centro<sup>20</sup>. A pesar de no contar con un registro exacto de la enfermedad a nivel nacional, en el Hospital General de México se realizó un seguimiento durante 6 años en los cuales se registraron 144 casos de mieloma de 2000 a 2006, representando el 8% del total de neoplasias hematológicas registradas en ese periodo<sup>21</sup>. La media de edad al diagnóstico es de 66 años, siendo el 10% de los pacientes diagnosticados antes de los 50 años y sólo el 2% antes de los 40 años<sup>18</sup>.

La incidencia del mieloma múltiple es de dos a tres veces más elevada en afro-americanos, convirtiéndola en la neoplasia hematológica más frecuente en este grupo étnico<sup>22</sup>. La afección es un poco más común en hombres que en mujeres, aunque no existen diferencias relevantes en la incidencia por sexos<sup>23</sup>. En cuanto a grupos ocupacionales, se ha observado un aumento en el riesgo de padecer mieloma múltiple en mineros, trabajadores con exposición a metales, agricultores y productores de papel, entre otros<sup>24</sup>. También se ha reportado el incremento del riesgo de hasta 3.7 veces en individuos con un familiar de primer grado con mieloma múltiple<sup>25</sup>, aunque los casos familiares son excepcionales.

Actualmente, la supervivencia global a los 3 años es de alrededor del 80%, mientras que para 5 años el porcentaje se reduce a alrededor del 60%<sup>26</sup>.

#### 1.2.5 CLASIFICACIÓN

La secuencia de eventos que llevan a la progresión de MGUS a un mieloma sintomático ha sido ampliamente investigada, obteniendo una visión general de las diversas anomalías genéticas y las alteraciones en el microambiente de la médula ósea que existen en las distintas etapas de la progresión. Se ha demostrado la existencia de una heterogeneidad considerable entre pacientes en cuanto a estas alteraciones, lo cual ha llevado a nuevas clasificaciones de la enfermedad en base a las diferencias en su biología.

Distintos sistemas de clasificación han sido implementados en el manejo del mieloma múltiple. Estas clasificaciones involucran la naturaleza de la enfermedad, el comportamiento clínico que puede llevar a un pronóstico y las características moleculares y citogenéticas presentes.

### 1.2.5.1 CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA

Dada la naturaleza secretora de las células implicadas en el mieloma múltiple y las diferentes características que presenta la enfermedad según los diferentes tipos de Ig secretada, es posible clasificar esta neoplasia en base al tipo monoclonal que predomina. La estratificación del carácter monoclonal de la enfermedad es útil para comprender su naturaleza, predecir el comportamiento y sus características clínicas. La clasificación del mieloma múltiple según el tipo de inmunoglobulina incluye: IgG, IgA, cadenas ligeras (Bence Jones), IgD, no secretor, IgE e IgM. Estos dos últimos son casos excepcionales<sup>27</sup>. En la tabla 1 se recoge la distribución según el tipo de secreción presente.

**Tabla 1.-**Distribución clonal en Mieloma Múltiple

Tipo	Frecuencia (%)
IgG	55
IgA	25-30
Bence Jones	15
IgD	2
Biclonal	2
No Secretor	1
IgM, IgE	> 0.5

Ig: Inmunoglobulina

### 1.2.5.2 INTERNATIONAL STAGING SYSTEM (ISS)

Este sistema permite discriminar tres grupos de riesgo independientemente de la edad, región geográfica o tipo de tratamiento (quimioterapia convencional o trasplante), con la ventaja de que se utilizan parámetros fácilmente cuantificables en cualquier laboratorio. Se basa en las concentraciones de albúmina y  $\beta$ 2-microglobulina, valores que han sido correlacionados con el pronóstico de la enfermedad<sup>28</sup>. La estratificación de los factores de riesgo se ilustra en la tabla 2.

**Tabla 2.-** Sistema internacional de estratificación para Mieloma Múltiple (ISS)

Estadio	$\beta$ 2-microglobulina	Albúmina	Supervivencia media (meses)
I	< 3.5 mg/dL	$\geq$ 3.5 g/dL	62
II	< 3.5 mg/dL ó 3.5 – 5.5 mg/dL	< 3.5 g/dL	44
III	$\geq$ 5.5 mg/dL	-	29

mg: miligramos. dL: decilitros

## 1.2.5.3 CLASIFICACIÓN DURIE-SALMON

La clasificación propuesta por Durie y Salmon en 1975 permite estratificar a los pacientes con mieloma múltiple con base en la carga tumoral presente, lo cual permite tener un panorama de la evolución clínica, la respuesta al tratamiento y la supervivencia general<sup>29</sup>. Los criterios de clasificación incluyen valores de hemoglobina, calcemia, radiología ósea (evaluación de las lesiones óseas), IgG, IgA y cadenas ligeras en orina (Tabla 3).

Tabla 3.- Sistema de clasificación Durie-Salmon

Estadio	Parámetros	Carga tumoral
<b>I (TODOS los criterios siguientes deben ser cumplidos)</b>		
Hemoglobina	> 10 g/dL	< 6x10 <sup>12</sup> células/m <sup>2</sup> Baja carga tumoral.
Calcio sérico	< 12 mg/dL	
Radiología	Sin destrucción ósea (escala 0), o plasmocitoma aislado	
Producción baja de paraproteína	IgG sérica < 5g/dL, IgA sérica <3 g/dL o cadenas ligeras en orina < 4 g/24h	
<b>II</b>		6 –1.2x10 <sup>12</sup> células/m <sup>2</sup> Carga tumoral intermedia
<b>III (Al menos uno de los siguientes criterios debe ser cumplido)</b>		
Hemoglobina	< 8.5g/dL	> 12x10 <sup>12</sup> células/m <sup>2</sup> Alta carga tumoral
Calcio sérico	> 12mg/dL	
Radiología	Lesiones líticas avanzadas (escala 3)	
Alta producción de paraproteína	IgG sérica > 7g/dL ó IgA sérica > 5g/dL ó cadenas ligeras en orina > 12g/24h	
Creatinina sérica < 2 mg/dL		
Creatinina sérica ≥ 2 mg/dL		

mg: miligramos. g: gramos. dL: decilitros. Ig: Inmunoglobulina. m<sup>2</sup>: metro cuadrado

## 1.2.5.4 CLASIFICACIÓN MOLECULAR

Este esquema de clasificación propuesto por el grupo internacional de trabajo para el mieloma (International Myeloma Working Group, IMWG), se basa enteramente en los factores biológicos del origen de la enfermedad, tales como aberraciones genéticas y citogenéticas<sup>15</sup>. Varios grupos o subclasificaciones son incluidos en este esquema, pues la enfermedad involucra diversas anomalías citogenéticas, las cuales pueden ser divididas en primarias y secundarias. Al igual que los esquemas de clasificación previamente descritos, este esquema tiene un valor predictivo y, a futuro, terapéutico, pues el desarrollo de terapias dirigidas contra los cambios genéticos primarios (como la inhibición de BCR-ABL en leucemia mieloide crónica con imatinib), aunque dichas terapias aún no existen para mieloma múltiple<sup>15</sup>.

En general, los eventos genéticos primarios son clasificados en 2 categorías mayores: hiperdiploidías (que involucran numerosas trisomías cromosómicas y una baja prevalencia de translocaciones IgH) y no-hiperdiploidías (en los cuales están incluidos hipodiploidías, tetraploidías, pseudodiploidías y un alto número de translocaciones IgH)<sup>15</sup>.

Los eventos genéticos secundarios engloban deleciones y monosomía del cromosoma 13, deleción del 17, anormalidades del cromosoma 1, activación de NF-κB, mutaciones de Ras, deleciones del 12, metilación de p16, inactivación de p18, desregulación de microRNAs y anormalidades en el cromosoma 16<sup>15</sup>. (Tabla 4)

**Tabla 4.-** Clasificación molecular de Mieloma Múltiple

Eventos genéticos primarios		Eventos genéticos secundarios
Hiperdiploidías	No hiperdiploidías	
	Translocaciones IgH	- Deleciones y monosomía del cromosoma 13
	-11q23	- Deleción del 17
	-6p21	- Anormalidades del cromosoma 1
	-16q23	- Activación de NF-κB
	-20q11	- Mutaciones de Ras
	-4p16	- Deleciones del 12
	-Otros	- Metilación de p16
		- Inactivación de p18
		- Desregulación de microRNAs
		- Anormalidades en el cromosoma 16

**IgH:** cadena pesada de inmunoglobulina. **NF-κB:** factor nuclear kappa-B

#### 1.2.5.5 FORMAS EXTRAÑAS DE MIELOMA MÚLTIPLE

Existen discrasias de células plasmáticas que no encajan en los criterios diagnósticos y de abordaje del mieloma múltiple<sup>14</sup>. Estas formas no convencionales de mieloma múltiple incluyen las formas de mieloma no secretor, mieloma *evolving*, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extramedular, mieloma osteosclerótico y la leucemia de células plasmáticas<sup>30-34</sup>. Generalmente estas presentaciones clínicas son formas secundarias o alternativas de un mieloma múltiple convencional y pueden tener un mejor o peor pronóstico que un mieloma primario.

#### 1.2.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del mieloma múltiple actualmente se lleva a cabo en estadios cada vez más tempranos que en el pasado. Los signos clásicos que orientan a un diagnóstico de mieloma múltiple son dolor en espalda baja (particularmente en pacientes de mayor edad) y extremidades, y anemia de origen incierto. Las pruebas que se realizan a partir de una sospecha por estos signos, incluyen cuantificación de proteínas totales en suero, electroforesis de proteínas en suero y orina, inmunofijación en suero y orina, detección de cadenas ligeras de

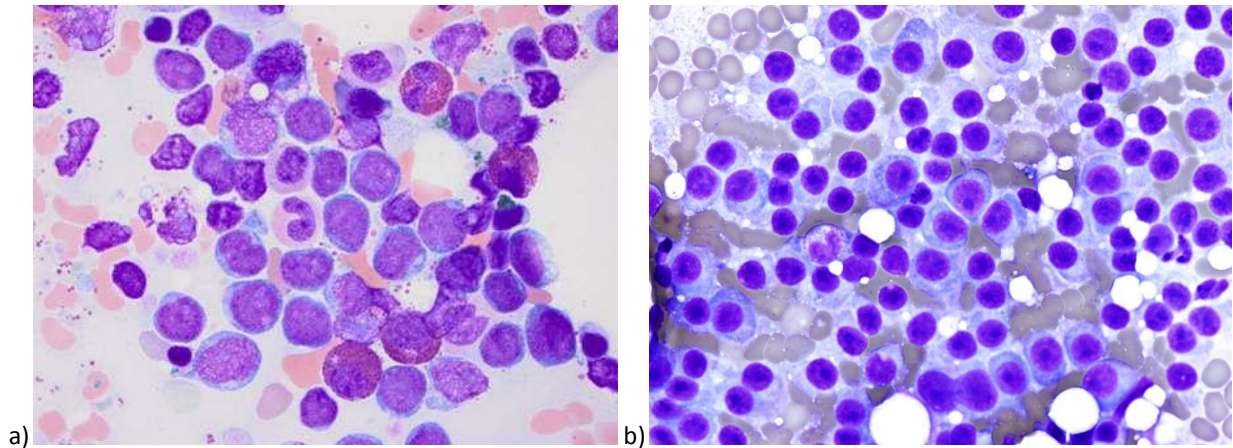
inmunoglobulinas en suero, y estudios clínicos que involucran: biometría hemática completa, creatinina sérica, y medición de electrolitos que incluyen calcio, deshidrogenasa láctica (DHL) y  $\beta 2$  microglobulina<sup>26</sup>. En la tabla 5 se recogen las pruebas que se realizan para un diagnóstico de mieloma múltiple.

**Tabla 5.-** Seguimiento diagnóstico para Mieloma Múltiple

Muestra	Prueba
Sangre periférica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electroforesis de proteínas e inmunofijación</li> <li>• Cuantificación de inmunoglobulinas séricas</li> <li>• Ensayo de cadenas ligeras libres</li> <li>• Proteínas totales, albúmina, creatinina, calcio, electrolitos, DHL, <math>\beta 2</math>-microglobulina</li> <li>• Hemoglobina, conteo leucocitario, conteo diferencial y conteo plaquetario</li> </ul>
Orina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electroforesis de proteínas e inmunofijación</li> <li>• Orina de 24 horas para cuantificación de proteínas totales y cadenas ligeras</li> </ul>
Médula ósea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspirado y biopsia para conteo de células plasmáticas y morfología</li> <li>• Evaluación citogenética y FISH para del 13, del 17p13, t(4;14), t(14;16), 1q+</li> </ul>
Huesos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exploración ósea con rayos X o escaneo CT</li> </ul>
Complementarias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MRI, PET-CT, biopsia de tejido para plasmocitoma solitario o extraóseo</li> </ul>

**DHL:** deshidrogenasa láctica. **MRI:** imagen por resonancia magnética. **PET-CT:** tomografía por emisión de positrones. *Tomada y modificada de Röllig, 2015*

La confirmación del diagnóstico se da a través de un aspirado de médula ósea o una biopsia de hueso (Figura 2) Si se detecta la presencia de proteína monoclonal o niveles patológicos de la misma a través de la cuantificación de cadenas ligeras, y un conteo celular de células plasmáticas igual o mayor a 10%, el diagnóstico de mieloma múltiple es confirmado. De igual modo, en pacientes con menos de 10% de células plasmáticas pero con un componente monoclonal igual o mayor a 3g/100mL se puede confirmar un diagnóstico de mieloma múltiple<sup>35</sup>. En casos de mieloma no secretor, el diagnóstico es confirmado con la presencia de más de 30% de plasmocitos en médula ósea, o la detección de un plasmocitoma en biopsia<sup>36</sup>. Los parámetros confirmatorios de diagnóstico se muestran en la tabla 6.



**Figura 2.-** Diagnóstico morfológico del Mieloma Múltiple. **a) Médula ósea normocelular.** Se observan distintos tipos celulares con escasas células plasmáticas. **b) Médula ósea de paciente con mieloma múltiple:** Se observan abundantes células plasmáticas fácilmente reconocibles por su citoplasma altamente basófilo, núcleo excéntrico y su halo perinuclear característicos.

**Tabla 6.-** Parámetros confirmatorios de Mieloma Múltiple

Confirmación de Diagnóstico
<b>1.- Más de 10% de células plasmáticas en médula ósea</b> <b>2.- Presencia de paraproteína en suero (&gt;3g/dL)</b> <b>3.- Presencia de paraproteína urinaria</b> <b>4.- Lesiones osteolíticas</b>
<i>Para confirmar mieloma múltiple se requiere del criterio 1 y al menos uno de los otros 3. Sólo aplica para mieloma secretor</i>
<b>g/dL:</b> gramos por decilitro

La razón más común de consulta médica inicial en pacientes con mieloma múltiple es la aparición de lesiones óseas y la anemia sin origen específico. Sin embargo, son cuatro manifestaciones principales las que indican un daño orgánico secundario en esta enfermedad. Estas manifestaciones incluyen, además de anemia y lesiones osteolíticas, hipercalcemia y falla renal, las cuales aparecen en etapas más avanzadas de la enfermedad y surgen a partir de la liberación constante de calcio debida a las lesiones osteolíticas. Estas manifestaciones son las más frecuentes y se resumen con el acrónimo de **CRAB** (**C**alcium increase, **R**enal impairment, **A**nemia y **B**one lesion)<sup>23</sup>.

### 1.2.7 FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

El mieloma múltiple representa la contraparte neoplásica de células B completamente diferenciadas y secretoras de Ig, llamadas células plasmáticas de vida larga. Estas células, como se mencionó anteriormente, son una subpoblación de células plasmáticas caracterizadas por tener un tiempo de vida media de meses o años en la médula ósea<sup>9, 12</sup>.

Con base en la secuenciación de la región variable de la IgH en células de mieloma, los primeros eventos oncogénicos en esta neoplasia ocurren en el centro germinal, al parecer durante el proceso de cambio de clase de isotipo y de hipermutación somática de las células B<sup>37</sup>. Si bien estas mutaciones primarias han sido encontradas en células mielomatosas, estos eventos por sí solos no son suficientes para provocar la patogénesis de la enfermedad, pues estas mutaciones se han encontrado en pacientes con MGUS y/o mieloma asintomático. Se cree que una vez que la clona cancerígena es diferenciada completamente en célula plasmática de vida larga, ocurren eventos oncogénicos posteriores en la médula ósea que desencadenan la patogénesis del mieloma múltiple sintomático<sup>38</sup>.

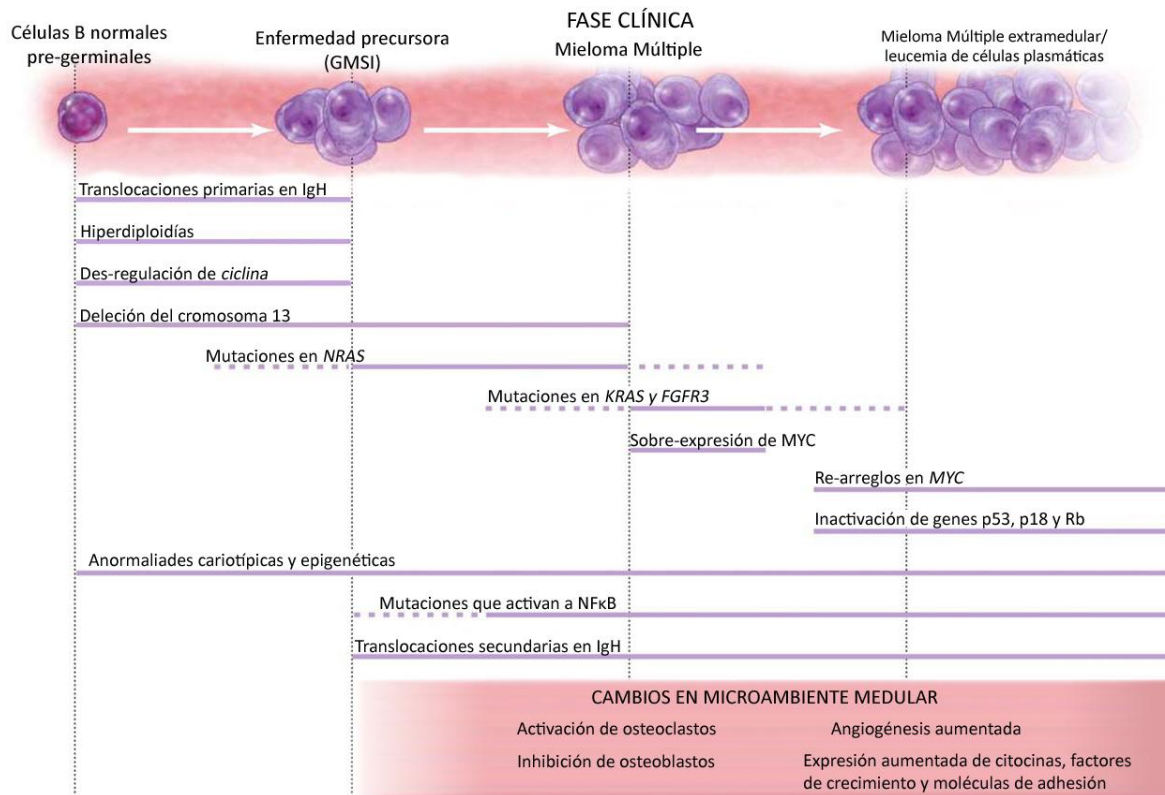
Los eventos primarios pueden ser divididos en no hiperdiploidías e hiperdiploidías, apareciendo estas últimas en el 50 – 60% de los casos y siendo caracterizadas por trisomías en cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21). Por otro lado, los eventos no hiperdiploides incluyen translocaciones entre el locus de IgH (14q32) y alguno de varios oncogenes como MAF, MAFB, dominio de MMSET, receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), y ciclinas D1 y D3<sup>39</sup>. Las translocaciones más comunes que involucran el locus IgH se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.-** Translocaciones comunes en el locus IgH

Translocación	Genes involucrados/ Asociación clínica	Frecuencia
<b>t(11;14)(q13;q32)</b>	<i>bcl-1, IGH</i> / Asociado a buen pronóstico <sup>40</sup>	15 - 20%
<b>t(4;14)(p16;q32)</b>	<i>WHSC1, FGFR3, IGH</i> / Asociado a una alta prevalencia de deleciones y monosomía del cromosoma 13, y a un pronóstico desfavorable <sup>41</sup>	~ 14%
<b>t(14;16)(q32;q23)</b>	<i>IGH, c-MAF</i> / Asociado a un mal pronóstico <sup>42</sup>	6 - 7%

**bcl-1:** *B-cell lymphoma 1*. Gen 1 de linfoma de células B. **IGH:** locus de cadena pesada de inmunoglobulina. **WHSC1:** *Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1*. Candidato 1 de síndrome de Wolf – Hirschhorn. **FGFR3:** *Fibroblast growth factor receptor 3*. Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos. **c-MAF:** *Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene*. Oncogen de fibrosarcoma musculoaponeurótico.

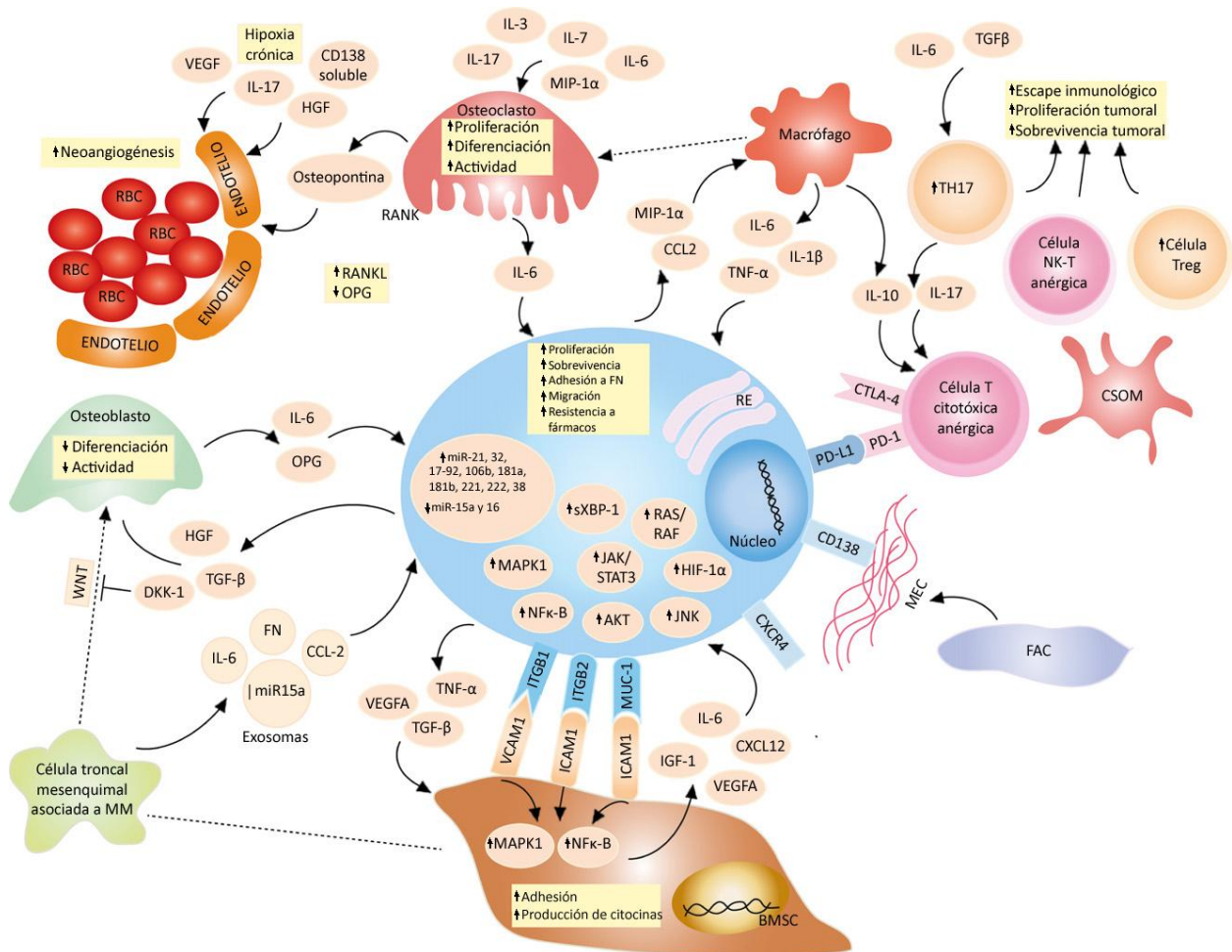
En cuanto a los eventos oncogénicos posteriores o secundarios, se tienen identificadas mutaciones o activaciones mediadas por expresión de oncogenes, como K-RAS, N-RAS, MYC, PI3K, AKT y BRAF; así mismo, existe pérdida de función de genes supresores de tumor, como p53 o RB1, lo cual facilita la progresión de la enfermedad y provoca desestabilización genómica<sup>39</sup> (Figura 3).



**Figura 3.-** Eventos oncogénicos asociados a la progresión del Mieloma Múltiple. Tomada y modificada de Korde; 2011.

Además de todos estos eventos oncológicos mayores, existen otras anomalías que contribuyen con el progreso de la enfermedad, como el aumento en la síntesis de miRNAs (micro RNA) que favorecen la producción de citocinas estimulantes de proliferación (como IL-6, TNF- $\alpha$ , VEGFA); aumento de actividad en vías de señalización antiapoptóticas, proliferativas y de diferenciación, como XBP, RAS/RAF, MAPK, JAK/STAT, HIF, NF- $\kappa$ B, AKT y JNK; aumento de la expresión de moléculas de adhesión, de inhibición inmunitaria y de resistencia a fármacos. Así mismo, aumenta la síntesis de factores estimulantes parácrinos, con los cuales existe una desregulación de vías de señalización importantes en la interacción con el nicho medular, por ejemplo, la inhibición de la vía WNT-1, que genera el desequilibrio entre la resorción ósea y la síntesis, lo que provoca una pérdida neta de masa ósea; o la sobreproducción de IL-6 por parte de las células estromales estimuladas por el TNF- $\alpha$  producido por la célula mielomatosa<sup>39, 43, 44</sup>. En la Figura 4 se ilustran los eventos que ocurren tanto en las células de mieloma como en células del estroma.



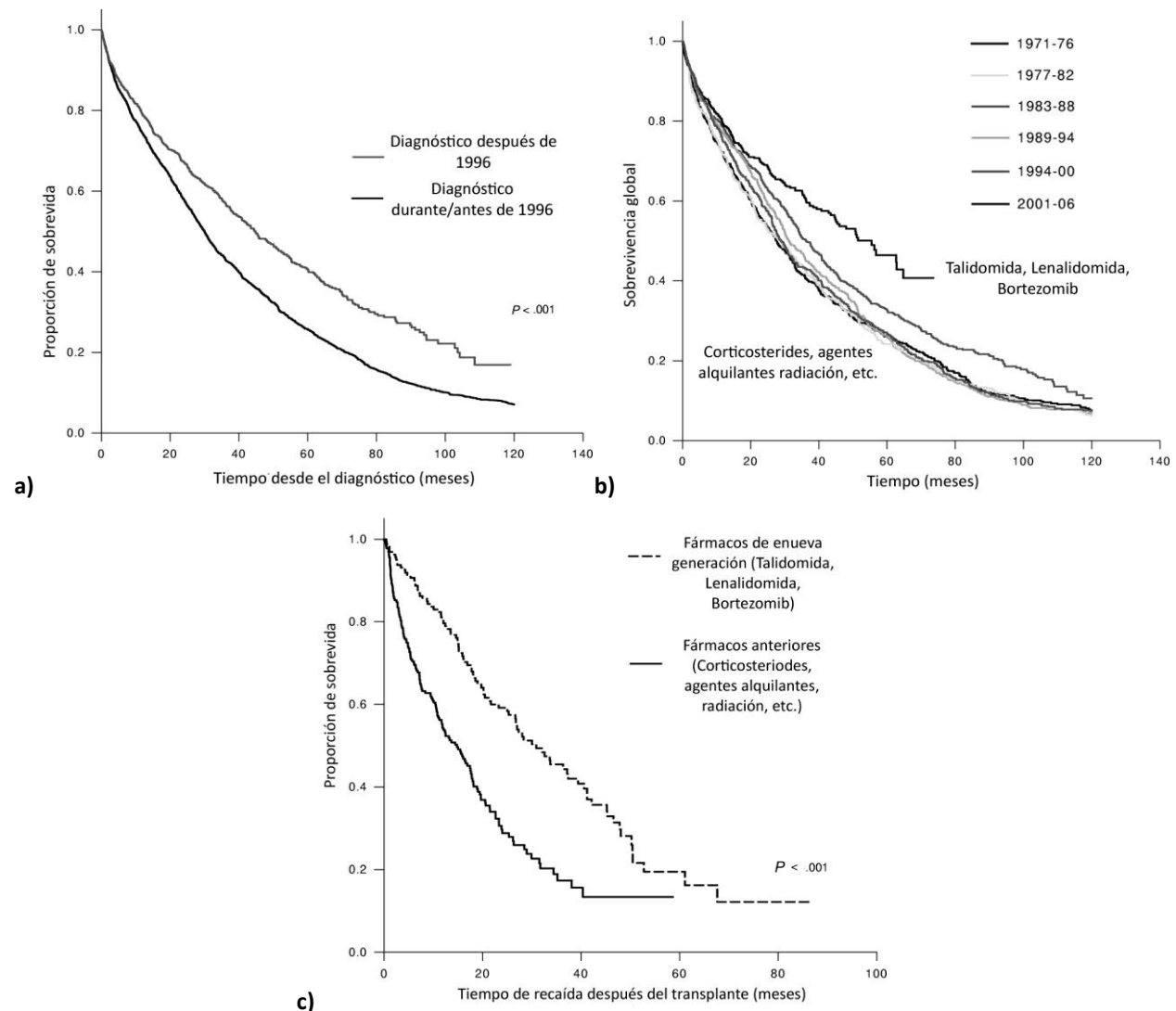


**Figura 4.-** Rol del nicho medular en la patogénesis del mieloma múltiple. El óvalo azul central representa a la célula plasmática mielomatosa. Las líneas punteadas indican diferenciación, mientras que las líneas sólidas indican secreción y/o efecto en la célula blanco. *Tomada y modificada de Bianchi; 2015*

### 1.2.8 TRATAMIENTO

El mieloma múltiple actualmente sigue siendo considerado como una enfermedad incurable, a pesar de que su tratamiento se ha modificado considerablemente en los últimos 15 años. El tratamiento depende en gran medida de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. Los casos de mieloma quiescente y gammapatía monoclonal de significado incierto no tienen indicación de tratamiento debido a que no existe evidencia de beneficio con la aplicación de tratamiento en etapas tempranas<sup>45</sup>.

Los esquemas de tratamiento del mieloma múltiple anteriormente se basaban en esquemas de quimioterapia con agentes alquilantes (melfalán, ciclofosfamida), doxorubicina y corticoides; posteriormente apareciendo nuevos fármacos que transformaron el tratamiento del mieloma múltiple, en particular en pacientes mayores a 65 años. Estos fármacos incluyen agentes inmunomoduladores (IMiDS) derivados de la talidomida e inhibidores selectivos del proteosoma, como el bortezomib. Estos fármacos han mejorado indudablemente la calidad de vida de los pacientes y han hecho posible el aumento de la supervivencia general de los pacientes (Figura 5).



**Figura 5.-** Sobrevivencia general en pacientes con Mieloma Múltiple. **a)** Sobrevivencia general de los pacientes diagnosticados antes de 1996 y después de 1996. **b)** Sobrevivencia general de los pacientes con base en la década de diagnóstico. **c)** Sobrevivencia general de los pacientes a partir de la recaída post-transplante con fármacos de nueva generación y quimioterapia convencional. *Tomada y modificada de Kumar; 2008.*

La elección del tratamiento depende en gran medida de diversos factores como la edad, las co-morbilidades y el estadio clínico de la enfermedad. Tomando en cuenta estos factores, los pacientes se consideran desde 2 puntos de vista: los que pueden recibir quimioterapia en dosis altas con rescate con células progenitoras (transplante), y los que por edad o co-morbilidades o son candidatos a esta estrategia<sup>23</sup>.

Los pacientes candidatos a transplante son tratados con un régimen parecido al de las leucemias agudas, pues son sometidos a una fase de inducción a la remisión, una de consolidación (transplante), y una fase de mantenimiento. Por otro lado, los pacientes sin opción de transplante son tratados bajo un régimen de inducción a la remisión y un tratamiento de rescate<sup>23</sup>.

De igual modo, el control de los síntomas y complicaciones de la enfermedad es de alta importancia, pues parte de la mejoría en la supervivencia de los pacientes es atribuible a la reducción de la mortalidad derivada de infecciones, hipercalcemia e insuficiencia renal.

En la actualidad se encuentran en desarrollo fármacos que promueven y potencian la respuesta inmunológica del hospedero contra las células tumorales. Estas terapias logran su efecto mediante la activación o el bloqueo de ciertas moléculas, llamadas moléculas **co-estimuladoras**, que tienen como función modular la acción de las células inmunitarias mediante distintos mecanismos. Esta modulación se da tanto positiva como negativamente, es decir, la respuesta puede verse aumentada o disminuida por la acción de estas moléculas. Las células tumorales, al sobre-expresar algunas de estas moléculas, aprovechan esta propiedad para evadir la respuesta inmunológica y generar tolerancia periférica a sus antígenos.

Es por lo anterior, que el estudio de estas moléculas co-estimuladoras es crucial tanto para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas como para el monitoreo inmunológico del paciente con mieloma y con cáncer en general.

### 1.3 MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS DE LA FAMILIA B7

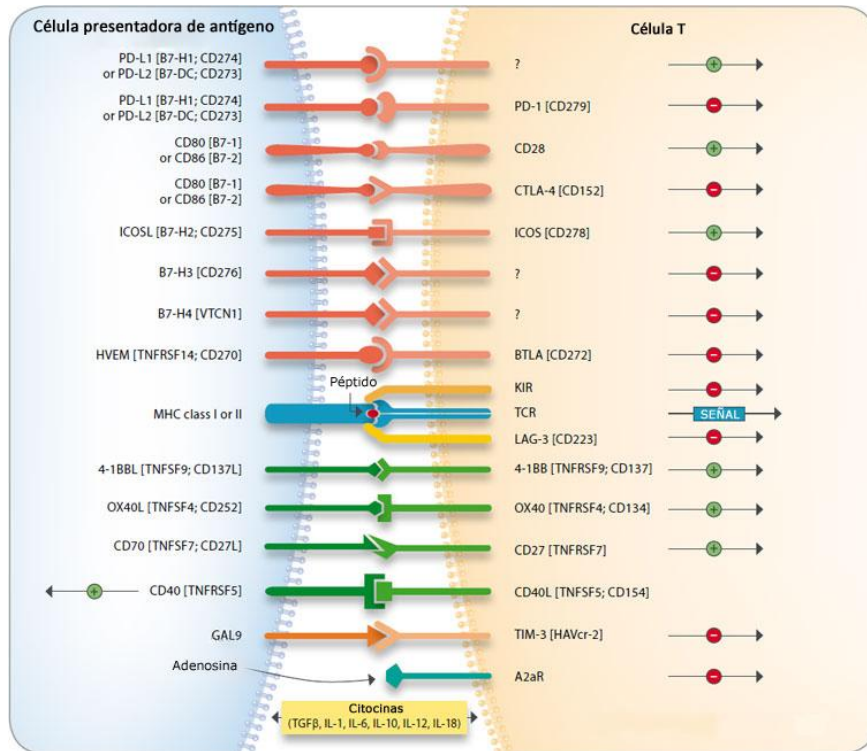
Las células neoplásicas expresan antígenos aberrantes específicos de tumor y por ello, necesitan evadir el proceso de detección y respuesta inmunológica para sobrevivir, ya sea induciendo estados de inmunosupresión o derivando señales de sobrevivencia a partir de células reguladoras<sup>47</sup>.

La respuesta inmunológica está regulada por una serie de moléculas requeridas tanto para el montaje contra señales patógenas externas como para el mantenimiento de la tolerancia contra antígenos propios. Esto se da a través de la regulación de la función de la célula T, cuya activación requiere de dos señales: la primera señal se da mediante el receptor de células T (TCR) por el reconocimiento del antígeno presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en células presentadoras de antígeno (APCs). La segunda señal involucra la unión de moléculas moduladoras expresadas tanto en APCs como en las células T<sup>48</sup>. Estas moléculas pertenecen a las familias B7 y del factor de necrosis tumoral (TNF). La señalización secundaria brinda activación, sostenimiento y atenuación de la respuesta de las células T. La ausencia de estas señales secundarias implica la activación sin respuesta (anergia), la pérdida de la tolerancia periférica o la generación de autoinmunidad<sup>49</sup>. (Figura 6)

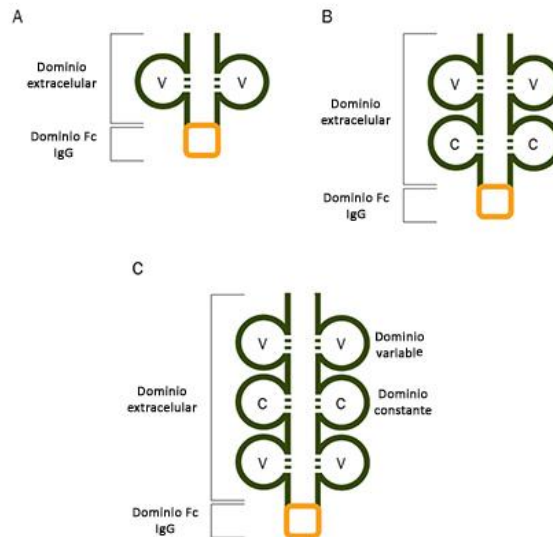
El sistema B7 es uno de los mecanismos de señalización secundaria más importante en el mantenimiento del balance delicado entre la potencia inmunológica y la supresión de la autoinmunidad<sup>51</sup>. Esto se da mediante la activación de vías estimulatorias o inhibitorias a través de la unión de estas moléculas con sus ligandos.

Esta familia consta de ligandos proteicos de superficie celular que se encuentran íntimamente relacionados en cuanto a estructura. Son proteínas transmembranales o asociadas a glicosilfosfatidil inositol (GPI), caracterizadas por poseer un dominio Ig de tipo variable (IgV), un dominio Ig de tipo constante (IgC), y una región transmembranal (Figura 7). La interacción con sus ligandos usualmente se da a través de los dominios IgV<sup>52</sup>.

A la fecha se han descrito 10 miembros pertenecientes a esta familia de reguladores, los cuales conforman distintos ejes estimuladores o inhibitorios. En la tabla 8 se enlistan los miembros que componen a la familia de moléculas coestimuladoras B7 y la función general que ejercen.



**Figura 6.-** Sinapsis co-estimuladora. En Rojo se indican los miembros de la familia B7 y en verde se indican los miembros de la familia TNF. Tomada y modificada de Pardoll; 2012.



**Figura 7.-** Estructura general de la familia de moléculas B7. Algunos miembros de la familia B7 cuentan con varios dominios variables en el dominio extracelular. Así mismo, algunos de estos cuentan con dominios constantes intercalados con los variables. Tomada y modificada de Wang; 2014.

**Tabla 8.-** Componentes del sistema B7 de co-estimulación/co-inhibición

Miembro	Ligando(s)	Efecto
<b>B7.1 (CD80)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD28</li> <li>• CTLA-4 (CD152)</li> <li>• B7H1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación</li> <li>• Inhibición</li> <li>• Estimulación</li> </ul>
<b>B7.2 (CD86)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD28</li> <li>• CTLA-4 (CD152)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación</li> <li>• Inhibición</li> </ul>
<b>B7H1 (CD274/PD-L1)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PD-1</li> <li>• B7.1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición</li> <li>• Inhibición</li> </ul>
<b>B7-CD (CD273/PD-L2)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PD-1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición</li> </ul>
<b>B7H2 (CD275/B7h/ICOSL)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICOS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación</li> </ul>
<b>B7H3 (CD276)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición/estimulación*</li> </ul>
<b>B7H4 (B7x/B7S1/VTCN1)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición</li> </ul>
<b>B7H5 (VISTA/PD-1H/Gi24/DIES1)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición</li> </ul>
<b>B7H6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NKp30</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación</li> </ul>
<b>B7H7 (HHLA2)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición</li> </ul>

\*Se han presentado ambos efectos en distintos estudios

### 1.3.1 B7-1/B7-2 (CD80/CD86)

Estas moléculas fueron los primeros miembros de esta familia en ser descritos. Forman parte de la vía B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4, la cual constituye la vía secundaria más importante en términos de co-estimulación y co-inhibición. Los genes que codifican para las proteínas B7.1 y B7.2 se encuentran íntimamente relacionados, y su expresión está restringida a células linfoides, principalmente a células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, células B y macrófagos<sup>53</sup>. Ambas moléculas tienen afinidad por los ligandos CD28 y CTLA4, los cuales tienen funciones co-estimuladoras y co-inhibitorias, respectivamente.

La unión de B7.1 y B7.2 con CD28, expresado constitutivamente en la superficie de células T vírgenes, conlleva al reclutamiento de proteínas que se unen a tirosinas en el motivo activador por tirosina del inmunoreceptor (*ITAM – Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif*) en el extremo terminal de CD28. Esta unión tiene efectos estimulatorios que incluyen: disminución del umbral para la activación óptima del linfocito T, inducción de la proliferación de linfocitos T, sobreexpresión de la molécula antiapoptótica Bcl-XL y el aumento de la producción de IL-2<sup>49-55</sup>. La falta de esta señal secundaria conlleva a una respuesta anérgica.

Por otro lado, el ligando CTLA-4 (Antígeno de linfocito T citotóxico 4/ Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) es una proteína transmembranal expresada transitoriamente en la superficie de las células T después de 24-48 horas después de su activación, y constitutivamente expresadas en células T reguladoras<sup>56</sup>. Este homodímero compete contra CD28 con una mayor afinidad por B7.1 y B7.2, resultando en una reducción de la activación de las células T. Esto se da mediante el reclutamiento de fosfatasa a través del motivo inhibidor por tirosina del inmunoreceptor (ITIM – *Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motif*) en el extremo terminal de CTLA4. La reducción de la actividad de las células T se da por el aumento del umbral de activación, la sobreexpresión de indolamina 2,3- dioxigenasa (IDO) y la reducción de la producción de IL-2<sup>56</sup>.

### 1.3.2 B7H1 (PD-L1, CD274)

Esta molécula es una proteína transmembranal tipo 1 que consiste en un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio transmembranal, una secuencia señal y dominios intracelulares. Se encuentra constitutivamente expresada en células presentadoras de antígeno, células no hematopoyéticas y órganos no linfoides como corazón, pulmón, placenta e hígado<sup>49</sup>. B7H1 forma parte de la vía co-inhibitoria más ampliamente estudiada: PD-1: PD-L1/PD-L2.

PD-1 (*Programmed Death 1*) es una molécula ampliamente relacionada con CD28 y CTLA-4<sup>57</sup>. Se expresa en células T efectoras, T reguladoras, T senescentes, células B, monocitos activados, células dendríticas, células NK y células T-NK. Consiste en un dominio transmembranal y un dominio intracelular que contiene un motivo ITIM y un motivo de *switch* por tirosina del inmunoreceptor (ITSM). PD-1 tiene afinidad por 2 ligandos: B7H1 y B7CD. La unión PD-1 y B7H1 da como resultado la fosforilación de tirosinas intracelulares en los motivos ITIM e ITSM, las cuales se unen a las fosfatasa SHP1 y SHP2 para brindar una señal inhibitoria a la célula T por medio de la disminución de la expresión de Bcl-XL y la regulación de la diferenciación de las mismas. De esta manera, esta unión induce indirectamente la muerte celular y por ende, la disminución de la respuesta inmunitaria<sup>48</sup>.

De igual manera, B7H1 es capaz de unirse a CTLA-4 para brindar una señal inhibitoria alterando la producción de citocinas y la maduración de las células T<sup>49</sup>. Debido a esto, actualmente la vía PD-1: PD-L1: CTLA-4 representa un blanco terapéutico en tumores sólidos, ya que su inhibición implica una potenciación indirecta de la respuesta inmunológica frente a células tumorales.

### 1.3.3 B7H2 (ICOSL/CD275/B7H)

Esta proteína se encuentra expresada constitutivamente en células B, células dendríticas y macrófagos, y puede ser inducida en células hematopoyéticas en respuesta a señales inflamatorias<sup>58</sup>. Este ligando tiene afinidad por los receptores CD28, CTLA-4 e ICOS (*Inducible Co-Stimulator*). El receptor ICOS es un homodímero glicosilado con una estructura muy similar a CD28 que se encuentra sobreexpresado en células T activadas<sup>59</sup>. La unión de B7H2 con

ICOS contribuye a la formación de células T cooperadoras foliculares a través de la inducción del factor de transcripción Bcl6, siendo crítica para la formación del centro germinal<sup>60</sup>. Así mismo, este acoplamiento induce la producción de varias citocinas en la célula T, como IL-10, IL-4, IL-5, interferon (IFN)- $\gamma$ , e IL-17. Todos estos efectos pueden influenciar en la función tanto de células T reguladoras como de células T efectoras, teniendo como consecuencia la generación tanto de regulación como de estimulación, dependiendo del tipo celular en el que predominen los efectos<sup>48</sup>.

#### 1.3.4 B7H3 (CD276)

Este miembro de la familia B7, al igual que la mayoría de ellos, es una proteína transmembranal de tipo 1 que contiene dominios IgV e IgC. A nivel de RNA, se encuentra ampliamente expresado en órganos tanto linfoides como no linfoides, sin embargo, la expresión a nivel de proteína se encuentra limitada a monocitos, células T, células B y células NK recientemente activados<sup>61</sup>. Niveles elevados de expresión han sido correlacionados con condiciones homeostáticas, como cáncer o sepsis<sup>62</sup>.

Se han reportado funciones tanto estimuladoras como inhibitorias para este miembro de la familia B7, sin embargo, a la fecha, los receptores para esta molécula no han sido concluyentemente identificados. Un posible candidato de unión para B7H3 es TLT-2 (*TREM-like Transcript 2*), el cual induce el aumento en la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  en las células T, dándole la función estimuladora a este ligando<sup>63</sup>. Por otra parte, existen estudios en los que no fue posible confirmar la unión a TLT-2 y se presentó un efecto inhibitorio<sup>64</sup>.

#### 1.3.5 B7H4 (B7x/B7S1/VTCN1)

B7H4 es otro miembro de la familia B7 que cumple con funciones inhibitorias. Al igual que los demás miembros, es una proteína transmembranal de tipo 1 con dominios IgV e IgC. A nivel de RNA, es detectable en la mayoría de los tejidos no hematopoyéticos, sin embargo, la expresión proteica se restringe de manera inducida a células presentadoras de antígeno y células neoplásicas<sup>65</sup>. Al igual que B7H3, el receptor de B7H4 permanece desconocido a la fecha, aunque se ha descrito como una molécula co-inhibitoria cuya unión disminuye la proliferación y la producción de IL-2 en células T, así como la expansión de progenitores neutrofílicos<sup>66</sup>. La sobreexpresión de B7H4 ha sido asociada con protección contra autoinmunidad mediada por linfocitos CD4/CD8 y a la mayor supervivencia posterior al trasplante alogénico<sup>67</sup>.

La expresión de esta molécula también ha sido asociada a diversos tipos de cáncer, por ejemplo, se ha reportado una correlación entre el número de macrófagos que expresan B7H4 con el tamaño y la actividad metastásica en carcinoma de pulmón, carcinoma esofágico y en melanoma<sup>68-70</sup>.



### 1.3.6 B7H5 (VISTA/PD-1H/GI24/DIES1)

También conocido como VISTA o GI24, es uno de los miembros de reciente identificación. A diferencia de los otros miembros, esta proteína consta sólo de un dominio IgV con 3 residuos adicionales de cisteína. Otra diferencia que presenta con respecto a otros miembros de la familia es que no presenta ningún motivo de señalización en la porción terminal citoplasmática<sup>71</sup>. La expresión de B7H5 se encuentra restringida a tejido hematopoyético y se encuentra altamente expresado en células presentadoras de antígeno maduras como macrófagos peritoneales, células dendríticas de médula ósea, neutrófilos y células dendríticas CD11<sup>+</sup>; y en menor medida se encuentra expresado en células T y T reguladoras activadas<sup>48</sup>.

B7H5 se une a un receptor desconocido cumpliendo funciones inhibitorias mediante el arresto de ciclo celular e inhibición de proliferación y producción de citocinas en células T reguladoras<sup>71</sup>. También ha sido demostrado que la expresión en células neoplásicas promueve el crecimiento tumoral a través de la metaloproteínasa membranal de matriz tipo 1 (MMP), aumentando así la motilidad celular<sup>72</sup>. Además de estas funciones, B7H5 ha sido identificado como componente crítico para la diferenciación de células troncales embrionales, particularmente en la vía de señalización BMP4<sup>73</sup>.

### 1.3.7 B7H6

Esta molécula recientemente identificada pertenece al grupo de miembros con acción estimuladora. Consta de un dominio IgC, IgV una región transmembranal y un dominio citoplasmático terminal que contiene motivos señalizadores como ITIM, dominio de unión a SH2 y a SH3<sup>74</sup>. La expresión a nivel de RNA mensajero y de proteína es nula en tejidos sanos, se encuentra restringida a células de sangre periférica o de médula ósea provenientes de neoplasias hematológicas, como Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) y Linfoma no Hodgkin (LNH)<sup>75</sup>.

B7H6 tiene afinidad por la molécula NKp30, un receptor perteneciente al grupo de los receptores de citotoxicidad natural (NCR's/ *Natural cytotoxicity receptors*), expresado en la superficie de las células NK<sup>76</sup>. La vía B7H6/NKp30 está implicada en la actividad antitumoral mediante la potenciación de la actividad de las células NK gracias al aumento de la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ <sup>77</sup>.

### 1.3.8 B7H7 (HHLA2)

Inicialmente conocida como HHLA2 (*Human endogenous retrovirus-H Long terminal Associating 2*), este miembro de la familia B7 consta de 3 dominios extracelulares: 2 dominios IgV y un dominio IgC, siendo el primer dominio IgV el que tiene un mayor grado de homología con otros miembros de la familia B7<sup>49</sup>. A nivel de mRNA, B7H7 se

expresa en células presentadoras de antígeno y en órganos no linfoides, tales como testículo, colon, pulmón, riñón y páncreas. En contraste, la expresión de la proteína se encuentra restringida a macrófagos derivados de monocitos en presencia de IFN- $\gamma$ , indicando que esta es una molécula principalmente inducible.

El homólogo de CD28, CD28H, ha sido identificado como el receptor específico de B7H7. Esta unión induce fuertemente la proliferación de células T cooperadoras y la producción de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, todo esto a través de la activación de una cascada de señalización dependiente de AKT en presencia de sinapsis por TCR<sup>77</sup>. La co-estimulación dada por la vía CD28H/B7H7 parece ser dependiente de una interacción B7-CD28 primaria. Actualmente se ha encontrado involucramiento de esta molécula en enfermedades autoinmunes o en cáncer<sup>74</sup>.

Además de regular la inmunidad mediada por células T, se ha demostrado que los miembros de esta familia de moléculas también influyen en la activación de las células NK efectoras. Este hecho es particularmente relevante en neoplasias hematológicas, como el mieloma múltiple, dado el amplio uso de terapias monoclonales con anticuerpos que ejercen una citotoxicidad anticuerpo-dependiente mediada por células NK. En el caso particular del mieloma, el uso de agentes inmunomoduladores, como la talidomida o lenalidomida, pueden aumentar esta citotoxicidad mediante la disminución de moléculas co-estimuladoras con efecto inhibitorio, como B7H1<sup>78</sup>.

Por otra parte, el rol de esta familia no sólo se limita a interacciones entre células neoplásicas y células efectoras de la respuesta adaptativa, pues también se expresan en células normales pertenecientes al microambiente tumoral. En estas células, las moléculas co-estimuladoras juegan un papel importante en la generación de un nicho favorable para el crecimiento y supervivencia tumoral en las neoplasias hematológicas, incluido el mieloma múltiple. Un ejemplo de esto es la generación de factores tróficos secretados por monocitos activados a través de estas moléculas que promueven angiogénesis y regulan la inmunidad del hospedero, lo cual favorece el crecimiento de células tumorales y una evasión inmunológica por parte de éstas<sup>79</sup>.

Como ha podido observarse a lo largo de esta sección, las moléculas co-estimuladoras pertenecientes a la familia B7 forman parte de un mecanismo de vital importancia en el desarrollo y progresión del mieloma múltiple y el cáncer en general. A la fecha, la mayoría de los miembros de esta familia son grandes candidatos a blancos terapéuticos debido a los mecanismos inmunomoduladores que representan. Además de estas moléculas, existen otros candidatos que por sus propiedades altamente inmunogénicas y su implicación en el desarrollo del cáncer, se encuentran siendo estudiados como posibles blancos terapéuticos. Estas moléculas pertenecen al grupo de los llamados **antígenos testiculares de cáncer (ATC/CTA)**, los cuales han sido ampliamente estudiados en los últimos años tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos.

## 1.4 ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER (ATC/CTA)

Los antígenos testiculares de cáncer son una enorme familia de antígenos asociados a tumor expresados en tumores humanos provenientes de diferentes orígenes histológicos. Estos antígenos no se encuentran expresados en tejido normal, excepto en testículo y placenta<sup>80</sup>. A la fecha han sido descritos más de 140 miembros repartidos en al menos 70 familias.

Los ATC pueden ser divididos en aquellos codificados en el cromosoma X y aquellos que se encuentran ubicados a lo largo de todos los demás cromosomas<sup>81</sup>. Alrededor del 10% de los genes ubicados en el cromosoma X pertenecen a la familia de los ATC. Los ATC codificados en el cromosoma X representan más de la mitad del total de la familia ATC y con frecuencia constituyen familias multigéncias organizadas en clústeres bien definidos a lo largo del cromosoma X. Por ejemplo, la región Xp11 contiene todos los genes de la familia SSX y las superfamilias GAGE/PAGE/XAGE; o la región Xq24-q28, en donde se encuentra la mayor densidad de genes ATC, incluyendo a las familias MAGE-A, MAGE-C y NY-ESO-1<sup>81</sup>. En la tabla 9 se ilustran los miembros de la superfamilia ATC mejor caracterizados.

**Tabla 9.-** Miembros ATC mayormente caracterizados

	ATC	Número de genes	Localización cromosómica
ATC codificados en cromosoma X	<i>Familia MAGE</i>		
	MAGE-A	12	Xq28
	MAGE-B	6	Xp21.3
	MAGE-C	3	Xp26-27
	<i>Superfamilia GAGE/PAGE/XAGE</i>		
	GAGE-A	8	Xp11.23
	GAGE-B	8	Xp11.23
	PAGE	5	Xp11.23
	XAGE	5	Xp11.21-11.22
	<i>Familia SSX</i>		
	SSX	5	Xp11.2
	<i>Familia NY-ESO</i>		
	CTAG	3	Xq28
	<i>Sin familia</i>		
CAGE	1	Xq22.11	
HOM-TES-85	1	Xq23	
SAGE	1	Xq26	
ATC no codificados en cromosoma X	BAGE	5	21p11.1
	BORIS	1	20q13.2
	CT9/3BRDT	1	1p22.1
	HAGE	1	6q12-13
	OY-TES-1	1	12p12-13
	SCP-1	1	1q12P13
	SPO11	1	20q13.2-q13.3

Los métodos de identificación para cada uno de estos genes incluyen métodos moleculares de clonación y análisis de bibliotecas y bases de datos de expresión de cDNA y mRNA

#### 1.4.1 EXPRESIÓN NORMAL

En tejido testicular sano, los ATC codificados en el cromosoma X se expresan fundamentalmente a nivel espermatogonia (células troncales proliferativas), mientras que los que no son codificados en el cromosoma X se encuentran expresados en células germinales con estadios más tardíos de diferenciación, como los espermatozoides<sup>94</sup>. Además de la expresión en testículo, se ha encontrado expresión de algunos miembros de las familias MAGE y GAGE en tejido placentario<sup>82</sup>.

De igual manera, se ha encontrado expresión de varios ATC en algunos tejidos somáticos, como páncreas, hígado y bazo. Sin embargo, de acuerdo a análisis realizados por PCR en tiempo real, los niveles de expresión de los ATC en estos tejidos son menores al 1% de lo expresado en tejido testicular<sup>82</sup>.

#### 1.4.2 EXPRESIÓN EN CÉLULAS TUMORALES

En lo que respecta a la expresión en tejido tumoral, los ATC son encontrados en tumores provenientes de distintos tipos histológicos, aunque la expresión varía enormemente dependiendo del tipo de tumor. Se ha reportado que la mayor expresión de varios miembros de distintas familias y superfamilias se encuentra en melanoma, cáncer de próstata y cáncer de pulmón de células no pequeñas; una expresión moderada en cáncer de próstata y de mama, y una baja expresión en cáncer de colon y cáncer de riñón<sup>83</sup>.

Los trabajos iniciales sobre los ATC en neoplasias se enfocaron en tumores sólidos, aunque en los últimos 15 años, una amplia variedad de ATC ha sido identificada en cánceres hematológicos. Se ha encontrado expresión de varios antígenos en leucemias, linfomas y mieloma múltiple, siendo esta última neoplasia la mayormente caracterizada<sup>84</sup>. Se ha reportado principalmente la presencia de genes pertenecientes a la familia MAGE-C, MAGE-A y SSX<sup>85, 86</sup>.

#### 1.4.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN

La expresión de los ATC, tanto en células normales como en células neoplásicas, se encuentra principalmente regulada por mecanismos epigenéticos tales como metilación/desmetilación del DNA y modificaciones postranscripcionales en proteínas histonas (Figura 8)<sup>87</sup>.

Todos los genes ATC estudiados hasta la fecha han sido encontrados en tejidos somáticos, sin embargo, sus regiones promotoras se encuentran metiladas, lo que impide su expresión en estas células. Durante la espermatogénesis, estas regiones son desmetiladas y por lo tanto se da la expresión. De igual modo, en células tumorales, estas desmetilaciones pueden ocurrir y dar paso a la expresión de los ATC<sup>88</sup>.

Las modificaciones postranscripcionales en proteína histonas también juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión de los ATC tanto en tejido sano como en tejido testicular<sup>89</sup>. Las histonas son proteínas básicas que contienen secuencias N-terminales flexibles que sobresalen de los nucleosomas, y las cuales son blancos de modificaciones postranscripcionales como acetilaciones o metilaciones. Mediante la acción de enzimas acetiltransferasas y desacetilasas, se da la adición o eliminación de grupos acetilo, lo cual resulta en descompactación de la cromatina y la consecuente transcripción de genes, y en la represión de la expresión, respectivamente<sup>90</sup>. A diferencia de la acetilación, la adición de grupos metilo en los residuos de arginina y lisina de las secuencias N-terminales de las histonas se asocia con activación y represión de genes, dependiendo del residuo que se modifica<sup>91</sup>.

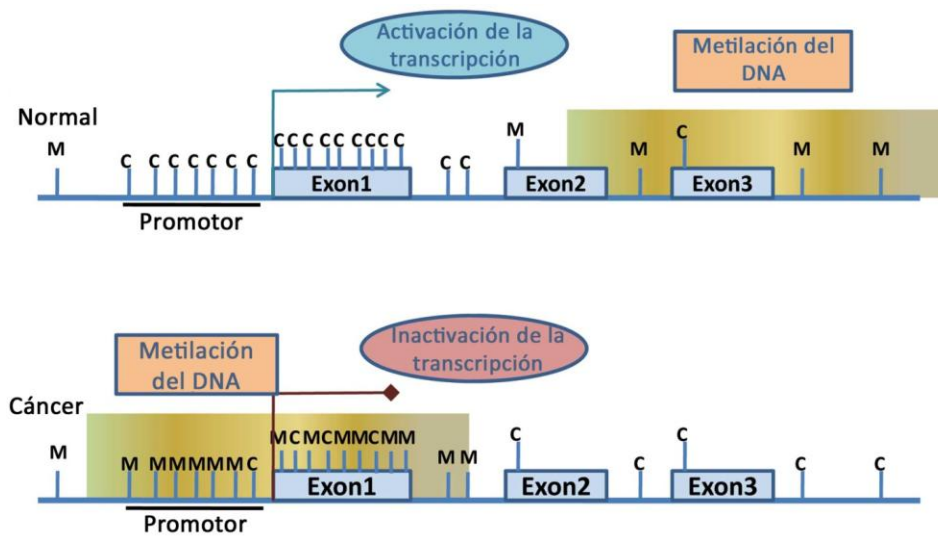


Figura 8.- Regulación epigenética de la expresión de genes ATC. Tomada y modificada de Chen; 2014.

#### 1.4.4 FUNCIÓN DE LOS ATC

A la fecha, las funciones de los ATC tanto en células germinales como en células tumorales no han sido totalmente esclarecidas, sin embargo, evidencia creciente indica que su expresión se encuentra estrechamente relacionada con vías de señalización involucradas en procesos de diferenciación, proliferación, ciclo celular e incluso con resistencia a fármacos<sup>81, 83, 92</sup>. La participación de estos genes en dichos eventos se da a través de varios mecanismos que incluyen su unión con factores transcripcionales, actuando así como represores o inductores; su unión a receptores que desencadenan la liberación o reclutamiento de segundos mensajeros, o su función estabilizadora/desestabilizadora de complejos enzimáticos críticos en procesos apoptóticos y de ciclo celular<sup>92-98</sup>. Debido a la enorme diversidad que presentan y la heterogeneidad en las funciones y los mecanismos de estos genes, en cuanto a neoplasias, han sido asociados a diversos comportamientos de la enfermedad, incluidos evolución favorable, progresión de la enfermedad, resistencia al tratamiento, supervivencia global, masa tumoral, etc.

### 1.4.5 FAMILIA MAGE

Una de las familias de ATC que ha generado un creciente interés en los últimos años debido a su utilidad como biomarcadores en cáncer y como blancos terapéuticos es la de los genes MAGE (*Melanoma Antigen Gene*), la cual consta de más de 40 proteínas humanas con expresión restringida a tejido testicular (algunos se han encontrado también en ovario y placenta), y aberrantemente en una gran variedad de cánceres que incluyen colon, melanoma, cerebro, pulmón, próstata y cáncer de mama<sup>99-103</sup>. Estos genes son divididos en dos categorías, dependiendo del tipo de tejido en el que se expresan: los genes MAGE de tipo I son los que se consideran estrictamente ATCs e incluyen a las subfamilias MAGE-A, -B y -C, las cuales se encuentran en el cromosoma X<sup>81</sup>. Los genes MAGE de tipo II no se encuentran restringidos al cromosoma 12 y comprenden a las subfamilias MAGE-D, -E, -F, -G, -H y -L<sup>104</sup>.

A la actualidad, las funciones de esta familia en tejido somático normal no ha quedado clara del todo, aunque mecanismos de migración, proliferación y diferenciación en células germinales han sido asociados a la expresión de estos genes<sup>105</sup>. Esta familia de proteínas tiene la capacidad de suprimir a p53 y potenciar la respuesta celular a rompimientos de fragmentos de DNA de doble cadena, además de regular la ubiquitinización de proteínas mediante su unión con ligasas ubiquitina E3 específicas. Así mismo, se ha observado que esta familia de proteínas confiere a la célula resistencia a TNF- $\alpha$  y Fas, aumentando su capacidad antiapoptótica. Es por esto que su expresión aberrante en células tumorales contribuye a la supervivencia tumoral y a un mal pronóstico general de la enfermedad<sup>106</sup>.

Dos de los miembros familia de genes que han sido ampliamente estudiados en las neoplasias hematológicas, son los miembros **MAGE-A3** y **MAGE-C1**, los cuales han sido implicados en el pronóstico y evolución clínica de enfermedades como leucemia mieloide crónica, leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda<sup>106,107</sup>, linfomas<sup>108</sup> y mieloma múltiple<sup>109</sup>.

### 1.4.6 NY-ESO1

Esta proteína fue descubierta en 1997 a partir de una librería de cDNA derivada de un paciente con cáncer esofágico<sup>110</sup>. Este gen tiene su ubicación génica en la región Xq28 del cromosoma X y codifica para varios productos, siendo el principal la proteína NY-ESO1, el cual es un polipéptido de 180 aminoácidos con un peso de 18kDa, con una región N-terminal rica en glicina, y una región C-terminal altamente hidrofóbica<sup>110</sup>. En tejido sano, esta proteína se expresa exclusivamente en tejido testicular. Se ha encontrado predominantemente en la región citoplasmática de células de espermatogonia temprana, perdiéndose gradualmente a lo largo de la diferenciación espermática<sup>111</sup>. Así mismo, se ha encontrado su presencia a nivel de proteína en células germinales fetales de testículo y de ovario<sup>112,113</sup>. Su expresión aberrante en varios cánceres se debe principalmente al alto nivel de desmetilación en todo el genoma, más específicamente a la desmetilación de las regiones promotoras de los genes *CT*<sup>114</sup>.

Al igual que la mayoría de los ATC, la función de NY-ESO1 a la fecha permanece sin ser clara, tanto en células sanas como en células malignas. Sin embargo, se ha descrito a este ATC como de los más inmunogénicos de todos los conocidos, además de generar fuertes respuestas inmunitarias espontáneas e inducidas por vacunación<sup>115-118</sup>. Es este hecho el que hace de NY-ESO1 un blanco molecular terapéutico excepcional.

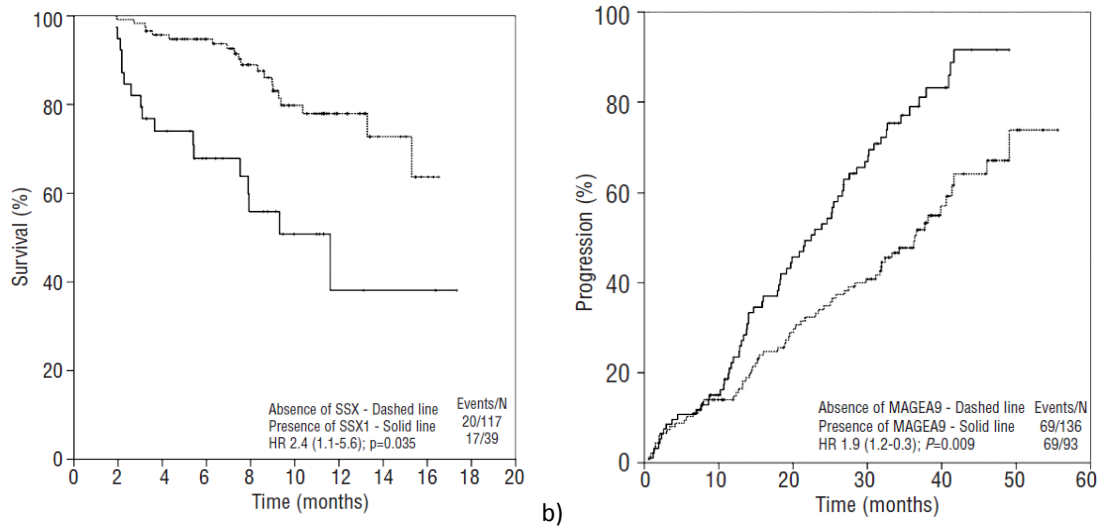
#### 1.4.7 SSX1

Otra familia de genes ATC que se encuentra ampliamente estudiada, es la de los genes SSX (*Synovial Sarcoma X chromosome*), la cual fue identificada a partir de estudios citogenéticos de sarcoma sinovial que demostraron que existía un evento cromosómico característico: la t(x;18)(p11.2;q11.2)<sup>119, 120</sup>. A partir de la identificación del miembro SSX1, a la fecha, nueve miembros han sido descritos (SSX1-9), encontrándose principalmente los miembros SSX1 y SSX2 en neoplasias hematológicas<sup>85, 107, 121</sup>. Particularmente en el mieloma múltiple, SSX1 es el que ha sido encontrado con mayor frecuencia<sup>122</sup>. Como la mayoría de los antígenos testiculares de cáncer, la función de este miembro no ha sido totalmente esclarecida, sin embargo, desde su identificación se determinó que esta proteína cuenta con dominios KRAB (*Krüppel-Associated Box*), los cuales son dominios represores transcripcionales encontrados sólo en proteínas de dedos de zinc tipo Krüppel; por lo tanto, SSX1 puede estar involucrado en la regulación transcripcional de algunos genes<sup>123, 124</sup>.

Esta proteína se ha encontrado a nivel citoplasmático en tejido sano de células mesenquimales troncales fetales y de adultos, en tejido testicular y en tejido fetal en diferenciación, en donde ha sido asociada con procesos de migración, invasión y metástasis<sup>125</sup>. En el caso de tejido tumoral, este gen ATC ha sido asociado a fenotipo de la enfermedad y un mal pronóstico.

Los genes ATC, debido a las funciones que ejercen en las células tumorales en las que se expresan, han sido implicados en la supervivencia general de los pacientes con mieloma múltiple. En la figura 9 se muestra un gráfico de supervivencia general y progresión de la enfermedad con base en la expresión de algunos de estos genes.

La importancia que han cobrado estos genes en los últimos años radica en el hecho de que representan una potencial vía terapéutica no sólo en mieloma múltiple, sino también en otras neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Lo anterior debido su alta restricción tisular de expresión y el gran potencial inmunogénico que presentan. Es por esto que desde hace varios años se han realizado diversos trabajos en el laboratorio de biología molecular del Servicio de Hematología del Hospital General de México sobre estos genes, entre los que se incluyen, principalmente, su expresión en leucemias y linfomas, así como el análisis de la regulación y su asociación clínico-patológica con dichas neoplasias<sup>84, 106, 121, 126</sup>.



**Figura 9.-** Gráficos de análisis de supervivencia en pacientes con Mieloma Múltiple con base en el patrón de expresión de genes ATC. **a)** Porcentaje de supervivencia en función a la expresión de SSX1. La línea punteada indica ausencia de SSX1. La línea continua indica presencia de SSX1 **b)** Progresión de la enfermedad en función a la expresión del gen MAGEA9. La línea punteada indica ausencia de MAGEA9, la línea continua indica presencia de MAGEA9. *Tomada de van Duin; 2011.*

La identificación de estos genes, junto con los genes que codifican para moléculas co-estimuladoras B7, arroja información valiosa acerca de la actividad proliferativa en células tumorales y la respuesta inmunológica ejercida sobre las células neoplásicas. Estos dos aspectos son cruciales en la progresión de la enfermedad y en la evolución del paciente. Sin embargo, existe otro factor que impacta de manera significativa en el avance de la enfermedad: la generación de resistencia a la quimioterapia, la cual está mediada por los **genes de multi-drogo resistencia (MDR)**.



## 1.5 GENES DE MULTI-DROGO RESISTENCIA (MDR)

### 1.5.1 FENÓMENO DE MULTI-DROGO RESISTENCIA

El término *multi-drogo resistencia* hace alusión a la cualidad de las células tumorales de mostrar resistencia cruzada a un amplio espectro de fármacos no relacionados estructuralmente. Esta resistencia puede ser intrínseca o adquirida: En el caso de una resistencia intrínseca, las células tumorales son insensibles al tratamiento desde el principio. Por otra parte, en la resistencia adquirida las células tumorales al comienzo son sensibles a un régimen terapéutico específico, sin embargo, progresivamente adquieren resistencia al mismo tratamiento e incluso a diferentes fármacos antineoplásicos<sup>129</sup>.

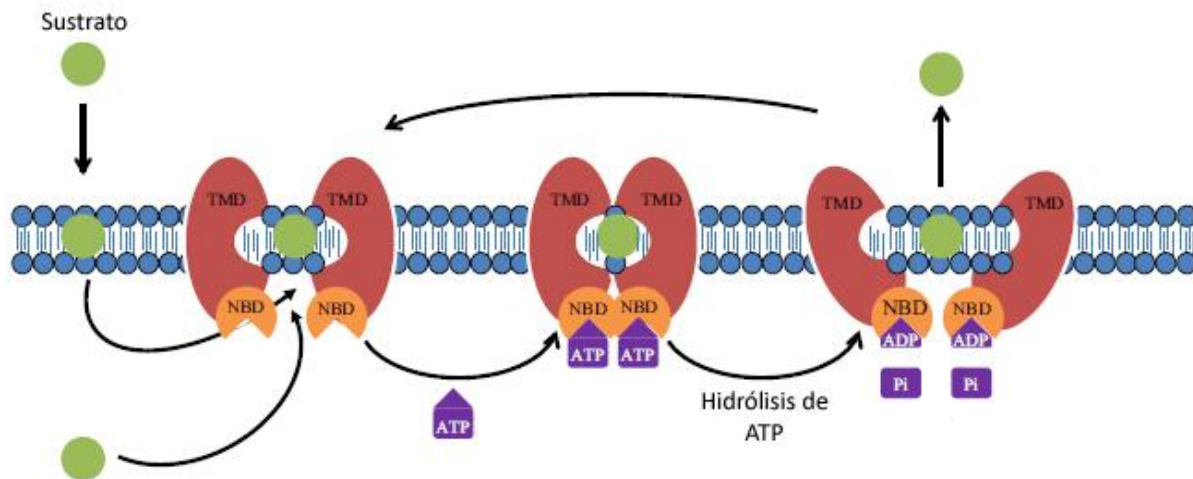
Existen varios mecanismos involucrados en la generación de resistencia a los fármacos quimioterapéuticos, siendo el principal la sobreexpresión de bombas de eflujo dependientes de ATP, llamadas transportadores ABC (ATP-binding cassette/bombas de unión a ATP). Estos transportadores transmembranales cumplen con la función de expulsar de la célula una amplia variedad de compuestos, como iones, fosfolípidos, esteroides, polisacáridos, aminoácidos y péptidos a través de membranas biológicas<sup>130</sup>. De igual manera, dentro de estos sustratos están incluidos agentes citotóxicos, entre los que se encuentran metabolitos tóxicos y fármacos antineoplásicos utilizados en el tratamiento contra el cáncer<sup>131</sup>.

Estos transportadores son un grupo de complejos proteicos cuya familia consta de 48 miembros clasificados en 7 subfamilias que van desde ABC-A hasta ABC-G45. Los miembros que están mayormente involucrados en el desarrollo de multi-drogo resistencia son la glicoproteína-P (P-gp/ABCB1) y la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP/ABCG2)<sup>132</sup>.

### 1.5.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Todos los transportadores ABC cuentan con dos dominios transmembranales y dos dominios de unión a nucleótidos<sup>133</sup>. El plegamiento estructural que presentan está caracterizado por un núcleo de 6 hélices transmembranales por cada dominio transmembranal. Estos dominios atraviesan la membrana y forman canales a través de los cuales los sustratos son transportados al exterior de la célula. La alta diversidad estructural de estos dominios permite reconocer y translocar diversos sustratos a través de cambios conformacionales<sup>134</sup>. Los dominios de unión a nucleótidos son secuencias altamente conservadas que son responsables de la producción de energía para el eflujo de sustratos xenobióticos a través de la unión y la hidrólisis del ATP mediante su acción ATPasa<sup>135</sup>.

El mecanismo propuesto de expulsión de los sustratos implica una unión de alta afinidad del sustrato a los dominios transmembranales, la dimerización dependiente de los dominios de unión a nucleótidos, hidrólisis de ATP, apertura de los canales y el eflujo del sustrato<sup>136</sup>. En la figura 10 se ilustra tanto la estructura general de estas proteínas, como su mecanismo de acción propuesto.

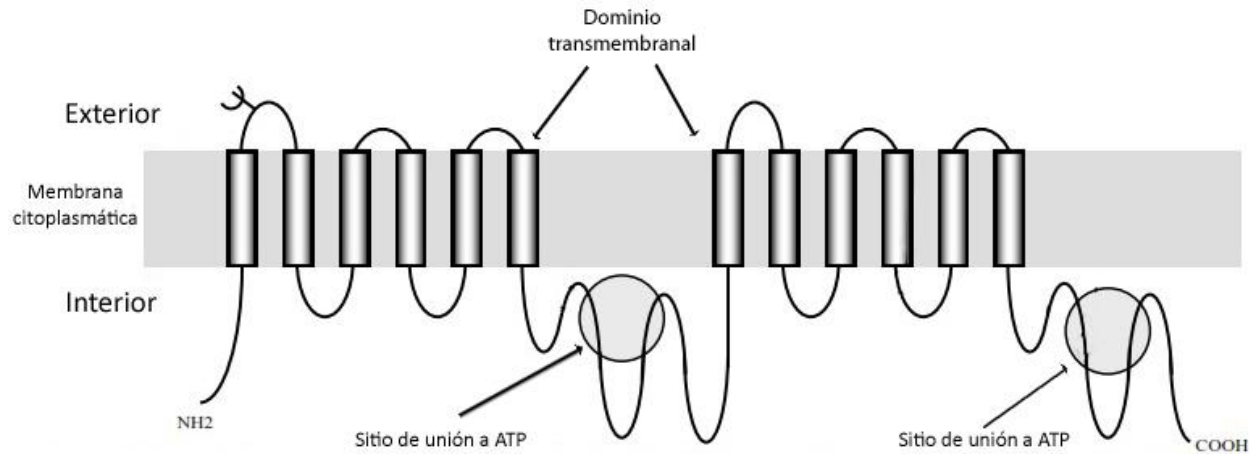


**Figura 10.-** Estructura y mecanismo general de los transportadores ABC. **TMD:** *Transmembrane Domain*. Dominio transmembranal. **NBD:** *Nucleotide-Binding Domain*. Dominio de unión a nucleótidos. Los transportadores ABC pueden ser clasificados con base en la estructura y la secuencia de sus dominios de unión a nucleótidos. Para que un transportador ABC sea funcional, generalmente requiere dos unidades *core*, formando un solo polipéptido de forma TMD<sub>1</sub>-NBD<sub>1</sub>-TMD<sub>2</sub>-NBD<sub>2</sub>; cambiando levemente la estructura molecular en cada una de las familias. *Tomada y modificada de Chen; 2016.*

### 1.5.3 P-gp/ABCB1 (MDR1)

Este miembro de los transportadores ABCs fue el primero en ser descrito y fue identificado en 1976 como una glicoproteína de membrana de 170kDa sobreexpresada en líneas celulares resistentes a la coichicina y se le atribuyó la función de reducción de la permeabilidad a la droga<sup>138</sup>.

La glicoproteína P (P-gp), producto del gen ABCB1 (cromosoma 7q21.1; 120 kb), es un transportador de membrana que se encuentra abundantemente expresado en la membrana apical de células epiteliales de colon, intestino delgado, ductos pancreáticos y biliares, túbulo proximal de riñón y la glándula adrenal. En general, las células epiteliales con roles excretorios generalmente expresan P-gp<sup>139</sup>. De igual modo, la P-gp se localiza en células endoteliales de la barrera hemato-encefálica, la barrera hemato-testicular, en tejido mamario y en placenta<sup>140</sup>. La localización tisular de esta proteína indica que juega un papel fisiológico importante en la protección de órganos susceptibles contra agentes xenobióticos, la secreción de metabolitos y el transporte de hormonas (Figura 11).



**Figura 11.-** Estructura de la glicoproteína-P (P-gp/ABCB1). **ATP:** Adenosin trifosfato. Consta de 12 segmentos transmembranales que forman estructuras tridimensionales en forma de “barril” en la membrana. Los sitios de fosforilación y glicosilación se encuentran en el primer loop extracelular. *Tomada y modificada de Tanabe; 2001.*

La P-gp tiene la habilidad de interactuar con cientos de compuestos diferentes, los cuales generalmente son compuestos no polares, relativamente hidrofóbicos y en algunas ocasiones, contienen anillos aromáticos y cuentan con un átomo de nitrógeno con carga neta positiva en su molécula<sup>142</sup>. Los sustratos principales de la P-gp así como sus inhibidores se ilustran en la tabla 10.

**Tabla 10.-** Principales sustratos de la glicoproteína-P

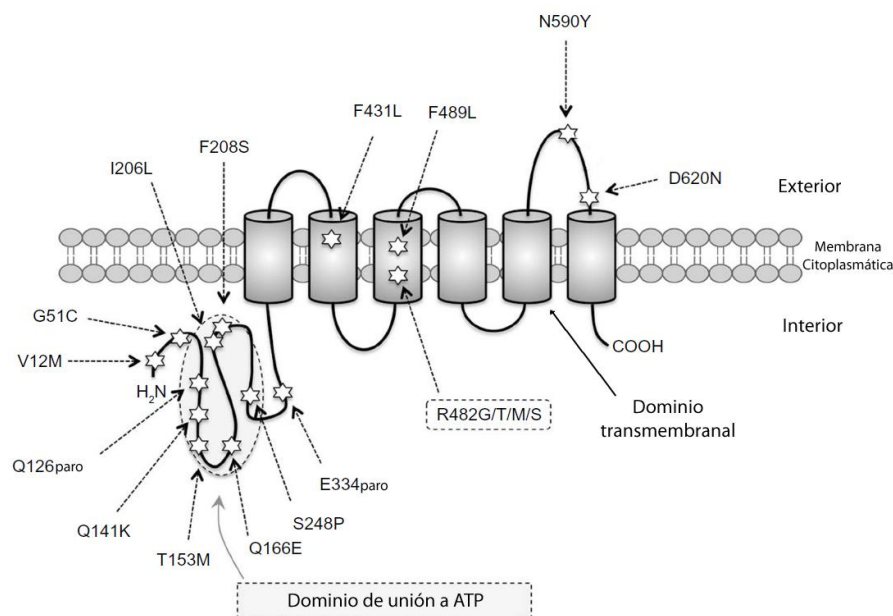
Miembro	Sustrato	Inhibidores
<b>P-gp/ABCB1</b>	<p><b>Analgésicos:</b> asimadolina, fentanilo, morfina, pentazocina</p> <p><b>Antiarrítmicos:</b> amiodarona, digoxina, lidocaína, propafenona, quinidina, verapamil</p> <p><b>Antibióticos:</b> cefoperazona, ceftriaxona, claritromicina, doxiciclina, eritromicina, gramicidina, grepafloxacin, itraconazol, ketoconazol, levofloxacino, rifampicina,</p> <p><b>Fármacos antineoplásicos:</b> 5-fluorouracilo, actinomicina, bisantreno, colchicina, citarabina, daunorrubicina, doxorubicina, eopósido, hidroxurea, metotrexato, mitomicina, tamoxifen, alcaloides de la vinca, imatinib, bortezomib</p> <p><b>Antihistamínicos:</b> cimetidina, ranitidina,</p> <p><b>Bloqueadores de canales de calcio:</b> azidopina, bepridil, verapamil</p> <p><b>Inmunosupresores:</b> ciclosporinas, FK506, valspodar</p> <p><b>Productos naturales:</b> curcumionoides, flavonoides</p> <p><b>Neurolépticos:</b> clorpromazina, fenotiazina</p>	<p>Amiodarona, amitriptilina, diltiazem, dipiridamol, fenoltiazinas, propafenona, propranolol, quinidina, espironolactona, tamoxifen</p>

### 1.5.3.1 POLIMORFISMO 3437C>T

Se ha demostrado que mutaciones y polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en la secuencia de genes MDR pueden modificar la expresión o la actividad de la proteína producida<sup>143</sup>. Uno de los polimorfismos más estudiados en este gen es el 3435C>T (exón 26, porción intracelular carboxilo-terminal), el cual ha sido asociado a mayor susceptibilidad a neoplasias, como leucemia linfoblástica aguda pediátrica y tumores del epitelio renal, así como a una menor expresión de esta proteína y altos niveles de digoxina (fármaco sustrato de la P-gp) plasmática como consecuencia de una baja actividad<sup>144, 145</sup>. De igual manera, se ha observado que el cambio de conformación de la proteína en el extremo carboxilo terminal de la P-gp, puede llegar a alterar la especificidad de algunos sustratos<sup>146</sup>.

### 1.5.4 BCRP/ABCG2

La proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP) es el producto de la transcripción del gen ABCG2 (cromosoma 4q22, 1kb). Es un tetrámero de homodímeros conformados por 655 aminoácidos (Figura 12). Este transportador consta de 6 segmentos transmembranales y un sitio de unión a ATP N-terminal<sup>147</sup>. Al igual que la P-gp, la BCRP participa en un sinfín de mecanismos fisiológicos, patofisiológicos, farmacocinéticos y toxicocinéticos; y de igual manera, se encuentra en la membrana apical de células del túbulo proximal, enterocitos, hepatocitos y células endoteliales de capilares cerebrales<sup>148</sup>.



**Figura 12.-** Estructura de la BCRP/ABCG2. A diferencia de la P-gp, la BCRP consta de sólo 6 dominios transmembranales y un dominio de unión a ATP. Al igual que la P-gp, esta proteína presenta varios polimorfismos que afectan la función o la afinidad por los sustratos. Las variaciones de los aminoácidos dadas por polimorfismos se encuentran señaladas con estrellas. *Tomada y modificada de Noguchi; 2014.*

Similar a la P-gp, la BCRP tiene como sustratos a una gran variedad de compuestos estructural y funcionalmente diversos (Tabla 11).

**Tabla 11.-** Sustratos quimioterapéuticos principales de la BCRP

Miembro	Sustrato	Inhibidores
BCRP/ABCG2	<p><b>Antibióticos:</b> ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina</p> <p><b>Fármacos antineoplásicos:</b> daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, gefitinib, imatinib, irinotecan, metotrexato, teniposido</p> <p><b>Antivirales:</b> delaviridina, lopinavir, lamivudina, nelfinavir, zidovudina</p> <p><b>Antihipertensivos:</b> reserpina</p> <p><b>Bloqueadores de canales de calcio:</b> nicardipina</p> <p><b>Otros fármacos:</b> azitodimidina, ciclosporina, lamivudina, quercetina</p>	<p>Ciclosporina A, gefitinib, imatinib, natrigenina, quercetina, genisteína, 17β-estradiol, estrona, tamoxifen, reserpina, curcumina, dipiridamol, nicarpidina, nitrendipina, nimodipen</p>

#### 1.5.4.1 POLIMORFISMO 421C>A

Diversos polimorfismos han sido identificados en el gen BCRP (Figura 12), siendo uno de los más ampliamente estudiados el 421C >A (Q141k/ exón 5, dominio de unión a ATP), cuya presencia ha sido asociada a una baja expresión de la proteína y alteraciones en su estabilidad en diversas membranas (por lo tanto, una degradación proteica aumentada vía ubiquitinación y proteólisis proteosómica). Sin embargo, también se ha encontrado una asociación al aumento de la biodisponibilidad de fármacos sustratos después de su administración oral<sup>148</sup>.

Se ha demostrado ampliamente que la sobreexpresión de los genes ABCB1 y ABCG2 en pacientes hematológicos está ligada a una evolución terapéutica desfavorable. Es por esto que en el laboratorio de biología molecular del Servicio de Hematología del Hospital General de México se han realizado varios estudios sobre estos genes, sus perfiles y frecuencias de expresión, lo que ha permitido la implementación de nuevos regímenes terapéuticos y el fortalecimiento del diagnóstico en estas neoplasias<sup>150 - 152</sup>.

Es debido a la enorme importancia que tienen estos tres grupos de genes en el desarrollo y la progresión del mieloma (y de las neoplasias en general), que su estudio resulta crucial para lograr un mejor entendimiento de la biología de esta enfermedad y la creación de nuevos tratamientos, pues en la actualidad, estas moléculas son consideradas como potenciales blancos moleculares específicos que permitirán ofrecer una mejor calidad de vida para los pacientes con mieloma múltiple.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El mieloma múltiple se ha considerado como una enfermedad asociada a los adultos mayores, sin embargo, en los últimos años la edad de aparición de esta enfermedad se ha visto disminuida y existen pacientes cada vez más jóvenes. Esta enfermedad representa el 2% de todos los cánceres y alrededor del 13% de las neoplasias hematológicas en el mundo, número que va en aumento debido a diversos factores, principalmente al aumento en la frecuencia poblacional de adultos mayores. A pesar de los avances que se han tenido en la última década en cuanto a tratamientos y entendimiento general de la enfermedad, ésta sigue siendo considerada como incurable. Aunado a esto, los actuales sistemas de clasificación y estratificación de los pacientes por grupos de riesgo y escalas predictivas permanecen un tanto controversiales, pues los parámetros utilizados no ofrecen una sensibilidad especialmente elevada y el valor predictivo encontrado no es muy alto. El presente trabajo pretende coadyuvar en el pronóstico y la instauración del tratamiento en pacientes diagnosticados con mieloma múltiple mediante la búsqueda de marcadores moleculares que puedan asociarse a la evolución clínica.

## 3. HIPÓTESIS

Si se realiza una caracterización molecular de los genes B7, MDR y ATC sobre células de mieloma múltiple, entonces será posible llevar a cabo una correlación de la presencia de estos genes con la evolución clínica y la respuesta al tratamiento de los pacientes que cursen con la enfermedad.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo una caracterización molecular de genes MDR, genes de la familia B7 y genes ATC mediante ensayos de RT-PCR y qRT-PCR en células de médula ósea provenientes de pacientes con mieloma múltiple con el fin de realizar una correlación de los datos clínicos de los pacientes con la expresión de estos genes que permita evaluar la eficacia del estudio como factor pronóstico.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la presencia/ausencia de transcritos de genes de moléculas coestimuladoras de la familia B7 (B7-1, B7-2, B7H1, B7H2, B7H3, B7H4, B7H6) y antígenos testiculares de cáncer (ATCs) pertenecientes a las familias MAGE (C1 y A3), SSX y NYESO-1 en células de mieloma de pacientes del Hospital General de México Eduardo Liceaga mediante ensayos de RT-PCR.
- Analizar la frecuencia de dichos genes en una población de pacientes mexicanos diagnosticados con mieloma múltiple.
- Analizar los niveles de expresión de los genes MDR (ABC-B1, ABC-G2, ABC-C1 y ABC-A3) mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real.
- Detectar los polimorfismo de nucleótido único (SNPs) C3435T en el gen ABCB1 y C421A en el gen ABCG2 mediante un ensayo de genotipificación.
- Correlacionar la presencia de los genes analizados con los parámetros clínicos de los pacientes.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo es un estudio de corte experimental, retrospectivo, transversal y analítico.

### 5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con ingreso al servicio de hematología del Hospital General de México diagnosticados con mieloma múltiple.
- Pacientes cuya muestra de médula ósea haya sido captada en el laboratorio de biología molecular entre enero y diciembre de 2012.
- Pacientes hombres y mujeres.
- Pacientes mayores de 40 años.
- Pacientes que cuenten con aspirado de médula ósea para estudio citomorfológico y de biología molecular.
- Pacientes *de novo* y en seguimiento.

### 5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes que presenten co-morbilidad con otro tipo de neoplasia.

### 5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes cuya muestra presente un material genético de mala calidad o insuficiente.

### 5.4 VARIABLES EXPERIMENTALES

#### 5.4.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

- Presencia/ausencia de los genes pertenecientes a la familia de proteínas B7 y genes ATC.
- Niveles de expresión relativos de los genes ABCB1 y ABCG2.

#### 5.4.2 VARIABLES DEPENDIENTES

- Parámetros clínicos de los pacientes.

### 5.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de muestra se determinó utilizando el programa de cómputo gPLINK (Broad Institute of Harvard), considerando el promedio de los ingresos anuales de casos de mieloma múltiple al servicio de Hematología del Hospital General, el cual es de 24, y el número de muestras que se recibieron en el laboratorio en el periodo comprendido de Enero a Diciembre de 2012. Se utilizó un nivel de confianza de 5% ( $\alpha= 0.05$ ) y un poder estadístico del 80%. El tamaño de la muestra calculada fue de 16 pacientes.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 6.1.1 ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA (AMO)

Como parte del diagnóstico o seguimiento de la enfermedad, a los pacientes con mieloma múltiple se les realizó un AMO en el servicio de Hematología del Hospital General de México.

#### 6.1.2 LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron como controles las líneas celulares MM.1R (linfoblasto B, mieloma múltiple extramedular; positiva para B7.1, B7.2, NY-ESO1), Raji (linfocito B, linfoma Burkitt; positiva para B7.1, B7.2, B7H1, B7H2), HL-60 (promieloblasto, LAM; positiva para B7H6) y K-562 (linfoblasto, LMC; positiva para MAGE-A3, MAGEC1, NY-ESO1, SSX1, ABC-B1, ABC-G2). Estas líneas se cultivaron en medio RPMI-1640 (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratories), penicilina/estreptomicina 1% (Gibco, Life Technologies). Las células fueron crecidas en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C; fueron cosechadas para preparar alícuotas de 1-2 x10<sup>6</sup> células para extracción de RNA. En la tabla 12 se muestran los tejidos de procedencia y los genes para los que fueron controles.

#### 6.1.3 TEJIDO TESTICULAR

De igual manera, se utilizó tejido testicular como control positivo para los genes B7H3 y B7H4. El tejido fue donado por el servicio de urología del HGM, de biopsias de pacientes con cáncer de próstata, la mayoría mayor de 70 años (Tabla12).

**Tabla 12-** Líneas celulares y tejidos utilizados como controles

Nombre de la línea/tejido	Origen	Genes presentes
MM1.R	Mieloma Múltiple	B7.1, B7.2, NY-ESO1
Raji	Linfoma Burkitt	B7.1, B7.2, B7H1, B7H2
HL-60	Leucemia Mieloblástica Aguda	B7H6
K562	Leucemia Mieloide Crónica	MAGE-A3, MAGEC1, NY-ESO1, SSX1, ABC-B1, ABC-G2
Tejido testicular	Testículo	B7H3, B7H4

## 6.2 AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS DE AMO

A las muestras de médula ósea se les realizó un tratamiento de lisis de eritrocitos mediante el uso de una solución hipertónica. Las muestras fueron mezcladas con esta solución lítica en una proporción 1:3 y se incubaron durante 10' a 4°C. Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron a 2500rpm durante 5'. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* leucocitario fue resuspendido en PBS 1X. La solución fue centrifugada una vez más a 2500RPM durante 5'. Los leucocitos fueron alicuotados en paquetes de aproximadamente  $1 - 2 \times 10^6$  células y almacenados a -80°C hasta ser utilizados.

## 6.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL

El RNA total fue aislado mediante la técnica de “paso único” descrita por Chomczynski y Sacchi<sup>153</sup>. Los paquetes celulares alicuotados fueron homogenizados con 550µL de solución D (Anexo). La solución se incubó durante 10' a 4°C. Posteriormente se añadieron 150µL de solución de ácido acético/acetato de sodio 2M pH=3 y 500µL de solución fenol/H<sub>2</sub>O. Esta solución se homogenizó por inversión hasta que fue evidente la precipitación de las proteínas. Se incubó a 4°C durante 5' y posteriormente se agregaron 200µL de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1). La solución fue homogenizada vigorosamente en vortex durante 10'' y se dejó reposar a 4°C durante 15'. Se centrifugó a 12,000rpm durante 15' a 4°C. Una vez centrifugada, en la solución fue evidente la separación de tres fases: una fase fenólica (orgánica) al fondo, una interfase sólida constituida por DNA y proteínas precipitadas, y una fase acuosa superior en la cual está el RNA soluble. La fase acuosa fue separada y se mezcló con isopropanol, incubando a -20°C durante 24h para precipitar el RNA. Una vez cumplido el tiempo de incubación, la solución se centrifugó a 12,000rpm durante 15' a 4°C. El *pellet* obtenido fue lavado con etanol al 75% y centrifugado a 8,000rpm durante 8' a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el botón fue secado a temperatura ambiente durante 5'. Una vez seco y sin presencia aparente de etanol, el RNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas (NFW – *Nuclease Free Water*) en un volumen proporcional al botón de RNA. Con el fin de eliminar formas secundarias en la estructura del RNA y restos de etanol, la solución fue incubada a 70°C durante 10'.

## 6.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO

El DNA genómico fue obtenido mediante el uso del reactivo comercial DNAzol® (Invitrogen) y mediante una variación al método de paso único de Chomczynski<sup>153</sup> utilizando Solución D.

Los paquetes celulares de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células fueron homogenizados en 700µL de DNAzol® y se agregaron 200µL de etanol absoluto. La solución se homogenizó por inversión hasta la aparición del paquete de DNA. Se dejó reposar durante 10' y posteriormente el DNA fue transferido a un tubo nuevo, en el cual se realizó un lavado con etanol al 75%. De nueva cuenta, se dejó reposar durante 10' y el DNA fue transferido a un tubo nuevo. El paquete de DNA se dejó secar a temperatura ambiente durante 5'. Una vez seco, se resuspendió en una solución TE 1X en un volumen proporcional al paquete de DNA.

## 6.5 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y LA INTEGRIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO

Se determinó la concentración y pureza del RNA y el DNA totales mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis). Las diluciones que se realizaron para cuantificar el RNA y el DNA fueron de 1:1000 y 2:500, respectivamente. Para ambos casos, se corroboró la integridad del material genético mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5%, cargando 2µL de RNA/DNA mezclado con 2µL de buffer de carga y 2µL de TAE 1X; corriendo en cámara de electroforesis durante 40' a 70 volts. El RNA fue almacenado a -80°C hasta ser requerido.

## 6.6 SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)

Para realizar los ensayos de RT-PCR, se sintetizó cDNA a partir del RNA de líneas celulares, tejido testicular y pacientes. Se utilizaron 2500ng de RNA en un volumen total de 25µL (concentración de 1µg/µL). El RNA se mezcló

con el correspondiente volumen de H<sub>2</sub>O inyectable y 1µL de Oligo dT (PROMEGA®, Madison WI, USA). La solución se incubó durante 10' a 70°C. Después se añadieron 6µL de buffer 5X (250mM Tris-HCl, pH=8.4, 500mM KCl, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT) (PROMEGA, Madison WI, USA) junto con 3µL de dNTPs 10µM (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) y 1µL de enzima transcriptasa reversa MMLV (200 U/µL) (PROMEGA, Madison WI, USA). Todos los componentes se homogenizaron suavemente con pipeta y se incubó a 37°C durante 50'. Posteriormente se realizó otra incubación a 70°C durante 10' para inactivar la enzima.

Para los casos de los genes B7H2 y B7H3, se cambió el oligo dT por los oligos específicos 3' de cada gen. El resto de la metodología fue igual a la antes mencionada. El cDNA se almacenó a -80°C hasta su utilización.

## 6.7 RT-PCR DE LOS GENES ESTUDIADOS

Para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR en las muestras, se prepararon mezclas (Mix) con los reactivos necesarios para la reacción. Cada uno de los genes estudiados cuenta con condiciones específicas que se engloban en la tabla 13.

**Tabla 13.-** Reactivos utilizados para los ensayos de PCR

Gen(es)	Buffer (5x)	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	dNTP (10mM)	Oligo F (10µM)	Oligo R (10µM)	Taq Pol (5u/µL)	Volumen final
<b>B7H2, B7H6, B7.2, SSX-1</b>	1x	1.5 mM	0.2 mM	0.2 µM	0.2 µM	0.03u/µL	10µL
<b>B7H3, B7H4, NY- ESO1</b>	1x	3.6mM	0.57mM	0.67 µM	0.67 µM	0.04u/µL	
<b>B7.1</b>	1x	3.4mM	0.3mM	0.4 µM	0.4 µM	0.05u/µL	
<b>MAGE</b>	1x	2mM	0.7mM	0.7 µM	0.7 µM	0.05u/µL	

De igual manera, las reacciones para cada uno de los genes estudiados se llevaron a cabo con diferentes perfiles térmicos, los cuales se muestran en la tabla 14. Los procesos de desnaturalización, elongación y templado se llevaron a cabo a 94°C/5', 72°C/10' y 4°C/10', respectivamente.

Tabla 14.- Perfiles térmicos de las reacciones

Gen	Longitud	Perfil térmico de amplificación	Tm	Controles
<b>B7.1</b>	566 pb	96°C – 1'	55°C	Raji
<b>B7.2</b>	464 pb	Tm – 45'' 72°C – 1' 30 ciclos	55°C	Raji
<b>B7H1</b>	301 pb		57°C	Raji
<b>B7H2</b>	102 pb		60°C	Raji
<b>B7H3</b>	172 pb	96°C – 1'	53°C	Testículo
<b>B7H4</b>	143 pb	Tm – 45''	62°C	Testículo
<b>B7H6</b>	143 pb	72°C – 1'	55°C	HL-60
<b>MAGEA3</b>	725 pb	35 ciclos	67°C	K562
<b>MAGEC1</b>	631 pb		67°C	K562
<b>NY-ESO1</b>	302 pb		67°C	K562
<b>SSX-1</b>	114 pb	96°C - 45 '' Tm - 30 '' 72°C - 30 '' 30 ciclos	60°C	K562
<b>ABC B1</b>	200 pb	96°C – 45''	60°C	K562
<b>ABC G2</b>	199 pb	Tm – 45''	60°C	K562
<b>ABC C1</b>	162 pb	72°C - 45''	60°C	K562
<b>ABC A3</b>	129 pb	35 ciclos	60°C	K562

## 6.8 QRT-PCR DE LA FAMILIA DE GENES ABC

Para el caso de los genes ABC B1 y ABC G2 se realizó una cuantificación mediante la metodología de sondas Taqman® Gene Expression (Applied BioSystems, Life Technologies) específicas para estos genes. Los sitios de unión de estas sondas se indican en la tabla 15. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo StepOne™ de Applied BioSystems a un volumen final de 20µL, utilizándose para cada una: 1.5µL de cDNA, 0.7µL de la sonda, 10µL de mix Taqman Gene Expression Master Mix® (Applied BioSystems, Life Technologies), y agua libre de nucleasas (NFW) c.b.p. 20µL.

Tabla 15.- Sondas Taqman® empleadas para cuantificación de niveles de expresión

Sonda	Gen	Sitios de unión	Longitud del producto
<b>Hs00184500_M1</b>	ABCB1	Exones 6-7	67pb
<b>Hs01053790_M1</b>	ABCG2	Exones 3-4	83pb
<b>Hs00985689_M1</b>	β2-microglobulina	Exones 1-2	95pb

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes ABC C1 Y ABC A3, se llevó a cabo mediante ensayos de PCR en tiempo real con la metodología de SYBR Green® (Applied BioSystems, Life Technologies). Las reacciones se realizaron a un volumen final de 20µL, utilizándose 1.5µL de cDNA, 10µL de SYBR Green, 0.3µL de oligo Forward (10µM), 0.3µL de oligo Reverse (10µM) y agua libre de nucleasas (NFW) c.b.p. 20µL.

En ambos casos se utilizó la línea celular K562 como control de referencia y β2-microglobulina como gen endógeno. Los niveles de expresión relativos fueron determinados mediante el método  $\Delta\Delta Ct$ .

## 6.9 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS C3435T (ABCB1) Y C421A (ABCG2)

Además de la cuantificación de los niveles de expresión, se realizó un análisis genotípico de los genes ABC-B1 y ABC-G2 con el fin de identificar los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, en inglés) 3435C>T y 421C>A, respectivamente. Los ensayos se realizaron en un equipo StepOne™ (Applied BioSystems, Life Technologies) con el kit de genotipificación TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied BioSystems, Life Technologies). Las sondas utilizadas fueron C\_11711720D\_40 para el polimorfismo 3435C>T (ABC-B1), y C\_15854163\_70 para el polimorfismo 421C>T (ABC-G2). Como control negativo, se utilizó agua libre de nucleasas.

## 6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CORRELACIÓN CLÍNICA

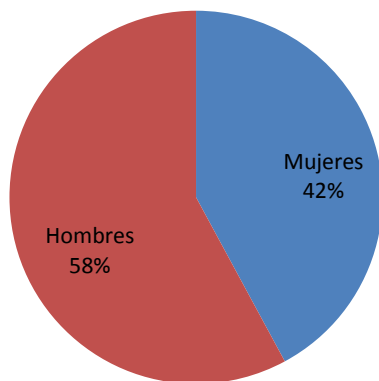
A partir de la revisión de la historia clínica de cada uno de los pacientes analizados y con base en la literatura previa, se seleccionaron los parámetros clínicos pertenecientes a la edad, las concentraciones séricas de β2-microglobulina, albúmina, creatinina, calcio sérico, estadio ISS y estadio Durie-Salmon para llevar a cabo el análisis estadístico de la correlación clínica con la expresión de los genes B7, MDR y ATC. Los parámetros fueron categorizados en 3 grupos con base en sus valores normales y se realizó una prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) con el software de análisis *IBM SPSS Statistics 15* (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc. Chicago, USA).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

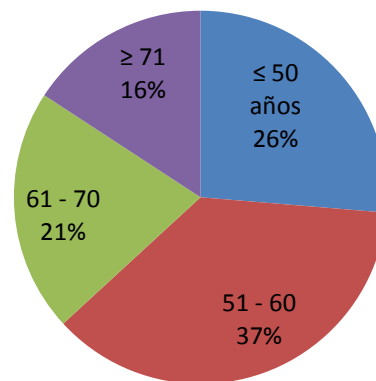
La población analizada incluyó a 23 pacientes diagnosticados con mieloma múltiple en el Servicio de Hematología del Hospital General de México en de enero a diciembre de 2012. De esta población, 19 pacientes contaron con expediente clínico completo, teniéndose 11 hombres y 8 mujeres (Gráfico 1). En los expedientes se buscaron datos clínicos que incluyeron: valores de hemoglobina, plaquetas, leucocitos totales, número de células plasmáticas en médula ósea, proteínas totales, albúmina, calcio, urea, creatinina, DHL, concentración de  $\beta$ 2-microglobulina sérica y tipo de secreción clonal. Resulta importante mencionar que todos estos datos corresponden a fechas cercanas a la de la toma de la muestra (Tabla 16).

#### Género



a)

#### Edades



b)

**Gráfico 1.**-Características generales de la población **a)** Frecuencia de género en la población **b)** Frecuencia de edades por grupos de edad

El rango de edad de la población estudiada fue de 43 a 81 años al momento de la recolección de la muestra. De los 19 pacientes, 5 eran menores de 51 años, 11 tenían entre 51 y 70 años, y 3 eran mayores de 71 años (Gráfico 1)

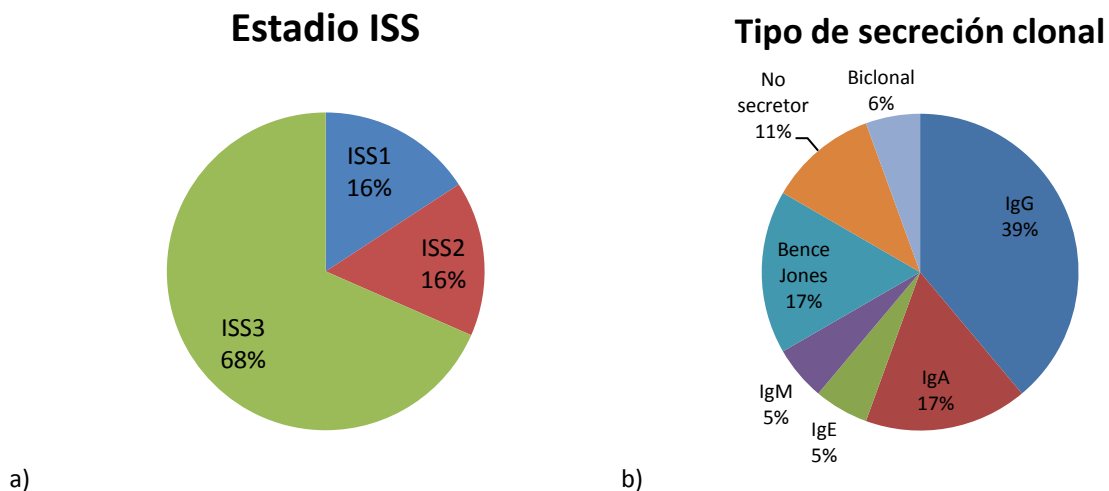
Tabla 16.- Medias y rangos de los valores clínicos de la población de estudio

Datos clínicos (valores normales)		N=19
Género	Masculino	11
	Femenino	8
Edad	Media	54.26 ± 10.35
	Mediana	55
	Rango	43 - 81
Plaquetas (156 – 373x10 <sup>3</sup> /μL)	Media	179 x10 <sup>3</sup> /μL
	Mediana	168 <sup>3</sup> /μL
	Rango	4 – 398 x10 <sup>3</sup> /μL
Leucocitos totales (4.3 – 10.3 x10 <sup>3</sup> /μL)	Media	5.5 x10 <sup>3</sup> /μL
	Mediana	4.32 <sup>3</sup> /μL
	Rango	2.5 – 16.6 x10 <sup>3</sup> /μL
Proteínas totales (6 – 8.3 g/dL)	Media	8.2g/dL
	Mediana	7.5 g/dL
	Rango	5.3 – 14.2g/dL
Albúmina (3.4 – 5.4 g/dL)	Media	2.88 ±0.69
	Mediana	2.9 g/dL
	Rango	1.89 – 4.3
Calcio sérico (8.5 – 10.2 mg/dL)	Media	9.4 mg/dL
	Mediana	8.83 mg/dL
	Rango	5.8 – 13.1 mg/dL
Urea sérica (6 – 20 mg/dL)	Media	49.6 mg/dL
	Mediana	36.6 mg/dL
	Rango	10.7 – 166.9 mg/dL
Creatinina (0.7 – 1.3 mg/dL)	Media	1.6 mg/dL
	Mediana	0.7 mg/dL
	Rango	0.3 – 11.5 mg/dL
DHL (105 – 330 u/L)	Media	187 ± 152.13u/L
	Mediana	130 u/L
	Rango	96-658 u/L
β2 Microglobulina (1.2 – 2.8 mg/L)	Media	9.18 ± 6.79 mg/L
	Mediana	7.2 mg/L
	Rango	2.01 – 28.9 mg/L
% células plasmáticas ( >10% )	Media	31.63 ± 30.28 %
	Mediana	18 %
	Rango	1-91 %
Estadio Clínico (ISS)	ISSI	3
	ISSII	3
	ISSIII	13
Estadio Clínico (DS)	DS1	11
	DS2	2
	DS3	6

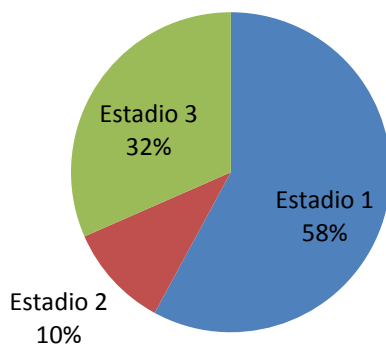
μL: microlitro. DHL: deshidrogenasa láctica. mg/dL: miligramos por decilitro. u/L: unidades por litro

De los 19 pacientes, 3 se encontraban en estadio 1 de ISS, 3 en estadio II y 13 en estadio III. Así mismo, dentro de la población de estudio se encontraron 7 tipos de secreción clonal, teniéndose 7 mielomas tipo IgG, 3 tipos IgA, 1 tipo IgE, 1 tipo IgM, 3 tipo Bence-Jones, 1 tipo biclonal (IgG/IgA) y 2 no secretores (Gráfico 2).





### Estratificación Durie-Salmon



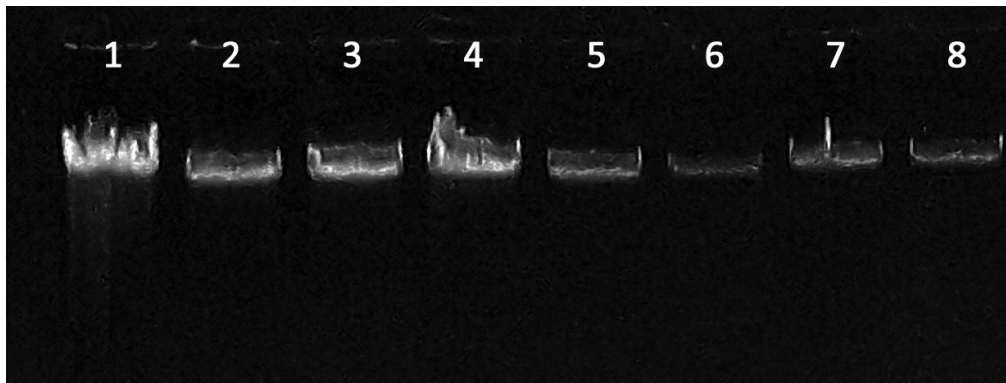
**Gráfico 2.-** Características clínicas de la población

**a)** Distribución de la población con base en el sistema de clasificación ISS. **b)** Distribución de la población con base en el tipo de secreción clonal. **c)** Distribución de la población con base en el sistema de clasificación Durie-Salmon

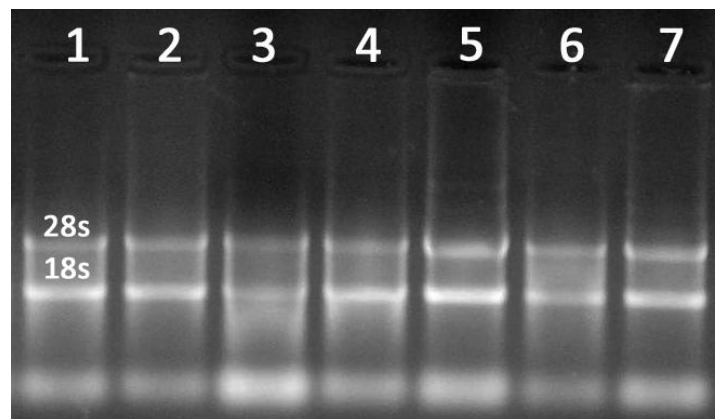
Los pacientes pudieron ser estratificados con base en el sistema de clasificación de Durie-Salmon. Once pacientes, lo que corresponde al 58% de la población, se encontraban en estadio 1; en estadio 2 se encontraron 2 pacientes, correspondientes al 11% de la población; los 6 pacientes restantes se encontraron en estadio Durie-Salmon 3, lo cual corresponde al 32% de los 19 pacientes (Gráfico 2).

## 7.2 EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO Y ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DE LA MUESTRA

El material genético aislado de cada uno de los pacientes fue verificado mediante un corrimiento electroforético, observándose en el gel de agarosa una banda característica para el caso del DNA, y las bandas 28S y 18S características del RNA ribosomal, incluido en el RNA total. (Figuras 13 y 14)



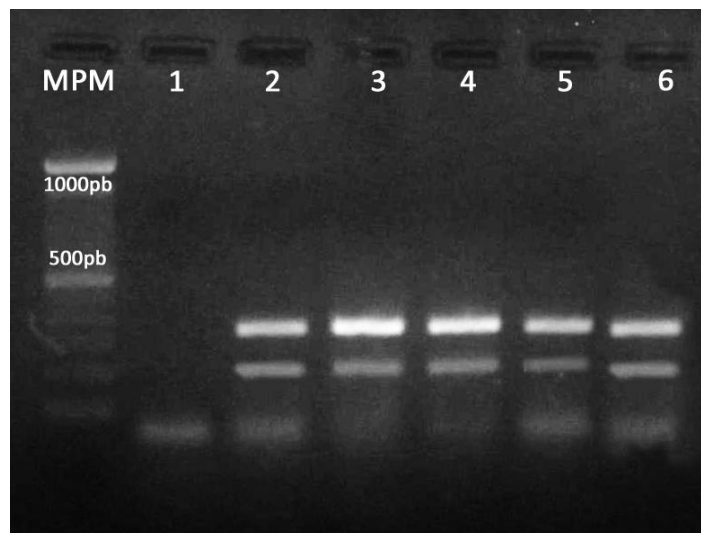
**Figura 13.-** Verificación de la integridad de DNA en 8 pacientes. Se observa la banda característica del corrimiento del DNA a través del gel. Gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con Midori Green®.



**Figura 14.-** Verificación de la integridad de RNA en 7 pacientes con Mieloma Múltiple.

**28S:** Banda perteneciente a RNA ribosomal de subunidad 28S. **18S:** Banda perteneciente a RNA ribosomal de subunidad 18S. Gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con Midori Green®.

De igual modo, el cDNA sintetizado a partir del RNA aislado fue verificado mediante la amplificación de genes constitutivos, observándose las bandas a 394pb y 221pb de los genes constitutivos  $\beta$ 2-microglobulina y GAPDH, respectivamente (Figura 15).

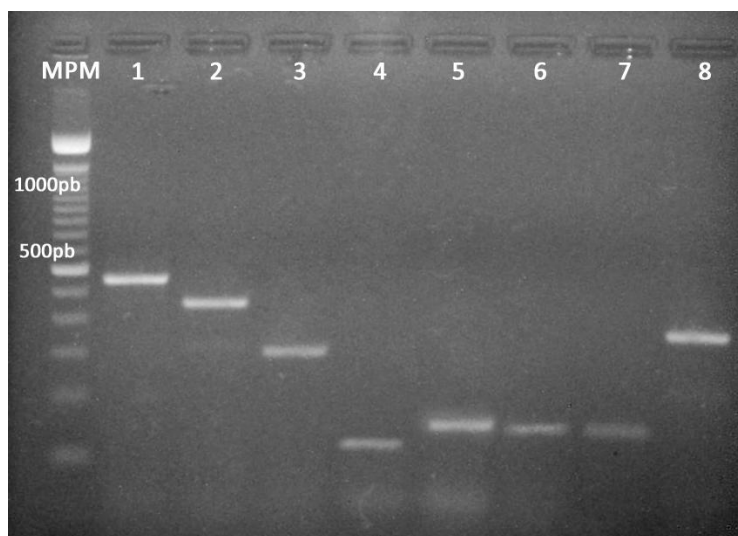


**Figura 15.-** Genes constitutivos  $\beta$ 2-microglobulina (394pb) y GAPDH (221pb) en 5 pacientes. **Carril 1:** control negativo de reacción (solución salina). **Carriles 2-6:** pacientes con Mieloma Múltiple. Gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con Midori Green®.

## 7.3 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS B7 EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

### 7.3.1 CONTROLES POSITIVOS DE REACCIÓN

El gel de agarosa en el cual se llevó la verificación de las condiciones de reacción para los genes B7 se ilustra en la figura 16. Se muestran los productos de reacción de las reacciones de amplificación de los controles positivos mencionados previamente.



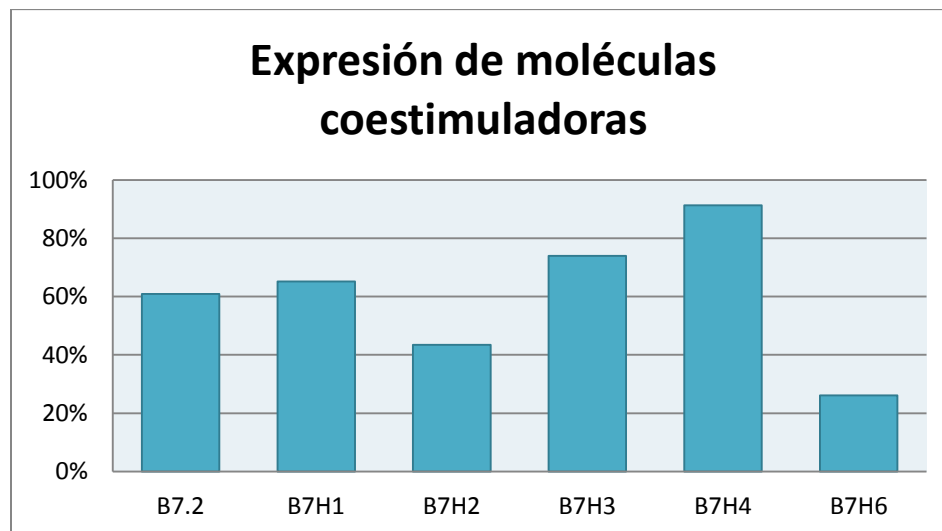
**Figura 16.-** Controles de reacción para genes B7. **Carril MPM:** marcador de peso molecular, **Carril 1:** B7.1 (566pb)-Raji. **Carril 2:** B7.2 (464pb)-Raji. **Carril 3:** B7H1 (301pb)-Raji. **Carril 4:** B7H2 (102pb)-Raji. **Carril 5:** B7H3 (172pb)-testículo. **Carril 6:** B7H4 (143pb)-testículo. **Carril 7:** B7H6 (143pb)-HL-60. **Carril 8:** Gen constitutivo  $\beta$ 2-microglobulina (394pb). Gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE, teñido con Midori Green®.

### 7.3.2 FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE LOS GENES B7

Se analizó un total de 23 pacientes. El gen con mayor frecuencia de expresión fue B7H4, encontrándose en el 91% (21/23) de todos los pacientes. El gen con la menor frecuencia de expresión fue B7H6, que se encontró en el 26% (6/23) de los pacientes. En el gráfico 3 se muestran las frecuencias de expresión de todos los genes en la población total. Cabe destacar que el gen B7.1 no se encontró en ninguno de los pacientes analizados (Gráfico 3).

Se encontró que al menos uno de los genes estuvo presente en cada uno de los 23 pacientes analizados, y como puede apreciarse en la tabla 17, cada uno de los genes fue encontrado en al menos uno de los pacientes.

Los pacientes fueron categorizados por grupos de edades y por estadios Durie-Salmon e ISS con base en sus expedientes clínicos. Las frecuencias de expresión de los genes B7 con respecto a estos grupos se ilustran en los gráficos 4 y 5. Cabe destacar el hecho de que, al igual que en la población total, el gen B7H4 fue el que se expresó con mayor frecuencia en todos los grupos de cada una de las categorías, exceptuando a los de pacientes pertenecientes a los grupos de 51 a 60 años y de 61 a 70 años.

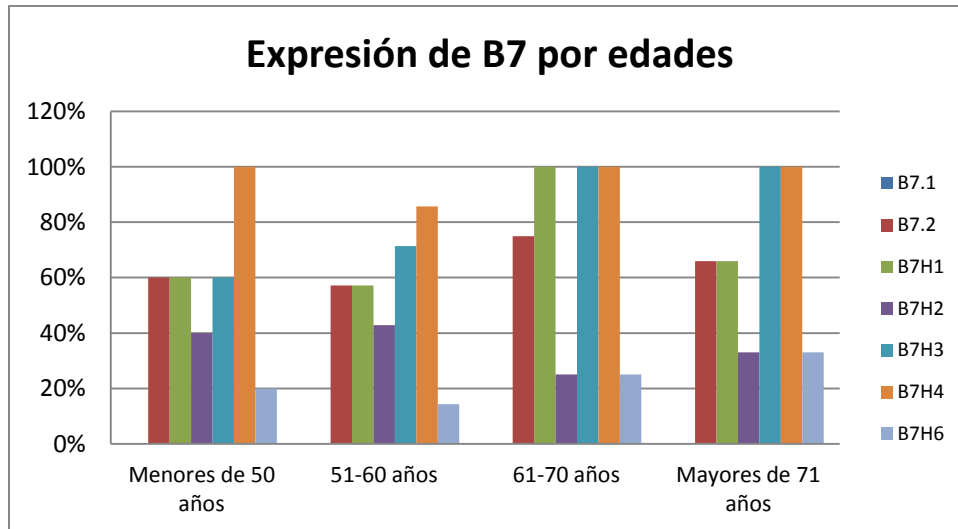


**Gráfico 3.-** Frecuencia de expresión de los genes B7 en la población de estudio

Tabla 17.- Presencia/ausencia de genes B7 en la población de estudio

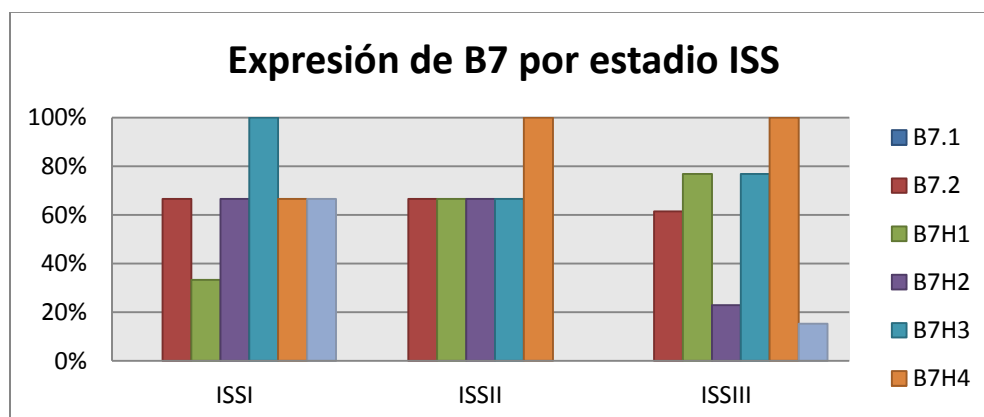
Muestra (estadio ISS)	B7.1	B7.2	B7H1	B7H2	B7H3	B7H4	B7H6
M01 (ISS3)	-	+	-	+	+	+	-
M02 (ISS2)	-	-	+	-	+	+	-
M03 (ISS2)	-	+	+	+	+	+	-
M04 (ISS3)	-	+	+	-	+	+	-
M05 (ISS3)	-	+	+	-	+	+	-
M06 (ISS2)	-	+	-	+	-	+	-
M07 (ISS3)	-	-	+	-	-	+	-
M08 (ISS1)	-	+	-	+	+	-	+
M09 (ISS1)	-	+	+	-	+	+	+
M10 (ISS3)	-	+	-	+	+	+	-
M11 (ISS3)	-	+	+	-	+	+	-
M12 (ISS3)	-	-	+	-	+	+	+
M13 (ISS3)	-	-	+	-	-	+	-
M14 (ISS3)	-	+	+	-	+	+	-
M15 (ISS3)	-	+	+	-	+	+	-
M16 (ISS3)	-	+	+	-	+	+	-
M17 (ISS3)	-	-	+	-	+	+	+
M18 (ISS1)	-	-	-	+	+	+	-
M19 (ISS3)	-	-	-	+	-	+	-
M20 (*)	-	+	+	+	-	+	+
M21 (*)	-	+	+	+	-	-	-
M22 (*)	-	-	-	-	+	+	+
M23 (*)	-	-	-	+	+	+	-

\*Indica sin historial clínico

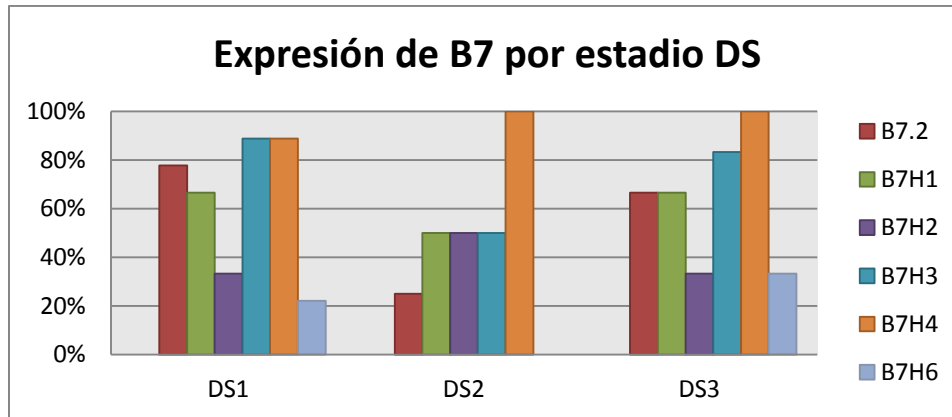


**Gráfico 4.-** Frecuencia de expresión de genes B7 por grupos de edad. El gen que se expresó con mayor frecuencia en todos los grupos de edad fue el gen B7H4

Los grupos en los que se dividieron los pacientes fueron: menores de 50 años, de 51 a 60 años, de 61 a 70 años, y mayores de 71 años. En el grupo de los pacientes menores de 50 años, el gen con mayor frecuencia de expresión fue B7H4, encontrándose en el 100% de los pacientes. Seguido de este gen, los genes B7.2, B7H1 y B7H3 se encontraron en un 60% de los pacientes. Finalmente, los genes B7H4 y B7H6 se encontraron en un 40% y un 20%, respectivamente. Los pacientes del grupo de 51 a 60 años contaron con una frecuencia de expresión similar a los del grupo anterior, teniendo al gen B7H4 en el 86% de los pacientes, al gen B7H3 en el 71%, B7.2 y B7H1 en el 57%, B7H2 en el 43%, y B7H6 en el 14%. Para el caso de los pacientes de entre 61 y 70 años, las frecuencias de expresión de los genes fueron muy parecidas a las presentes en el grupo de pacientes mayores de 71 años, siendo excepción el gen B7H1, cuya expresión se vio aumentada en los pacientes con 60-70 años de edad. Las frecuencias se muestran en el gráfico 4.



**Gráfico 5.-** Frecuencia de expresión de los genes B7 por estadio clínico ISS. El gen que se expresó con mayor frecuencia en los pacientes con estadio I fue B7H3, a diferencia de los grupos en estadios II y III, en los cuales B7H4 fue el gen más frecuente



**Gráfico 6.-** Frecuencia de expresión de los genes B7 por estadio clínico Durie-Salmon. El gen que con mayor frecuencia se expresó en todos los grupos fue B7H4.

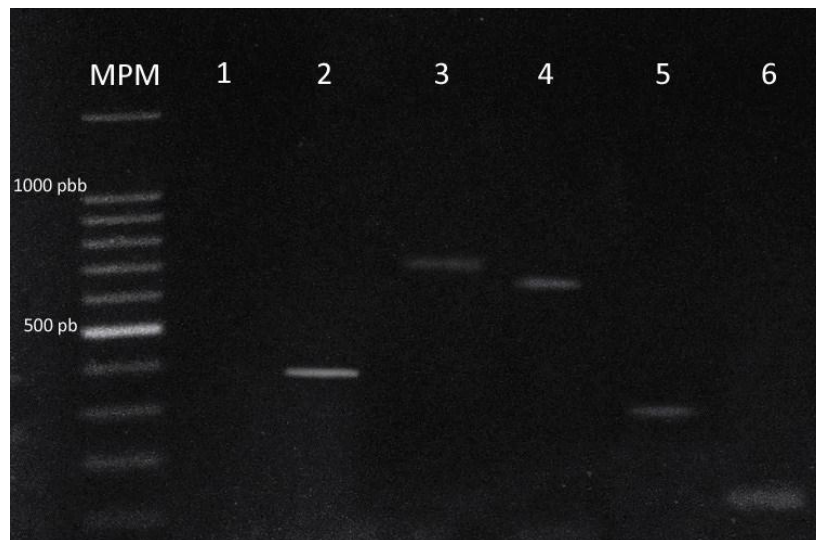
En los pacientes en los que fue posible realizar una estratificación por estadios, el gen que se presentó con más frecuencia entre los pacientes en estadio ISSI fue B7H3, encontrándose en el 100% de los individuos. En el caso de los pacientes en estadio II, el gen más común fue B7H4, al igual que en los pacientes con ISSIII. El gen que se encontró en menor frecuencia en el caso de los pacientes en estadio I, fue B7H1 con 33.3%. En los pacientes con estadio II, no se encontró presencia de B7.1 ni de B7H6. El gen con menor frecuencia entre los pacientes estadio III fue B7H6, encontrándose en el 15% de ellos (gráfico 5).

Para el caso de la estratificación Durie-Salmon, los genes B7H3 y B7H4 fueron los que más se presentaron entre los pacientes en estadio 1, pues cada uno de ellos se presentó en el 89% de los pacientes pertenecientes a este grupo. El gen que se expresó en menor frecuencia en este grupo fue B7H6, con un 22%. En el grupo de los pacientes con estadio 2, B7H4 se logró identificar en el 100% de los pacientes, a diferencia de B7.2, cuya frecuencia fue del 25%. Al igual que los pacientes en estadio 3, el gen que se expresó con mayor frecuencia fue B7H4, encontrándose en el 100% de los pacientes de este grupo. El gen con menor frecuencia de expresión en este grupo fue B7H6, con un 33% (gráfico 6).

## 7.4 EXPRESIÓN DE GENES ATC EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

### 7.4.1 CONTROLES DE REACCIÓN

Se llevó a cabo una estandarización y una verificación de las condiciones de reacción para los genes ATC en la línea celular K562 y en tejido testicular, en los cuales se ha demostrado con anterioridad la expresión de estos genes. Esta verificación se ilustra en la figura 17



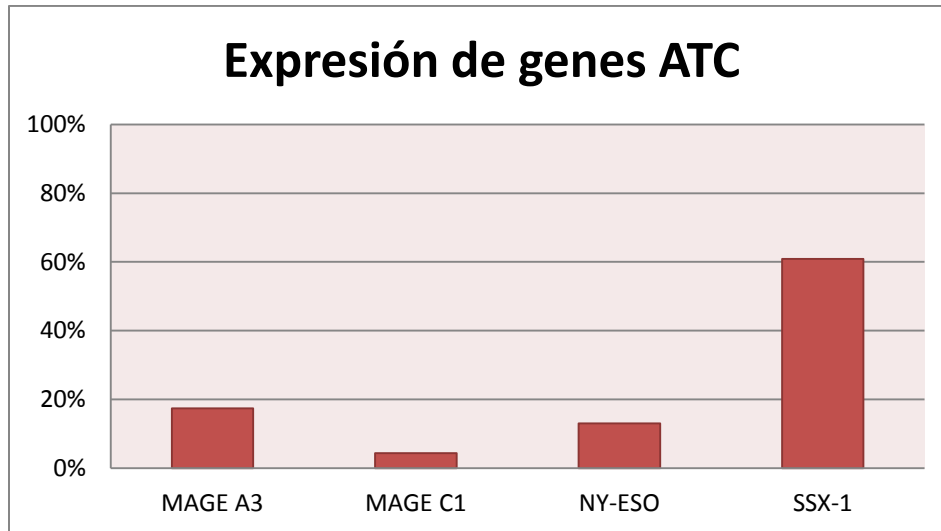
**Figura 17.-** Controles de reacción para genes ATC.

**Carril MPM:** marcador de peso molecular, **Carril 1:** Control de reacción ( $H_2O$ ). **Carril 2:** Gen constitutivo  $\beta$ 2-microglobulina (394pb). **Carril 3:** MAGE-A3 (725pb). **Carril 4:** MAGE-C1 (631pb). **Carril 5:** NY-ESO1 (302p). **Carril 6:** SSX-1 (114pb). Gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE, teñido con Midori Green®.

### 7.4.2 FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ATC

De igual manera, se llevó a cabo la detección de los genes MAGE-C1, MAGE-A3, NY-ESO1 y SSX-1 en los 23 individuos estudiados. El gen que se encontró en mayor proporción fue SSX-1, hallándose en 14 pacientes de los 23 (61%); caso contrario a MAGE-C1, que sólo se encontró en sólo 1 paciente (4%) (Gráfico 8). A diferencia de las moléculas coestimuladoras B7, hubo pacientes en los que ningún gen de los analizados fue encontrado. Este grupo de pacientes correspondió al 26% del total de los pacientes (6/23). Las frecuencias totales se muestran en el gráfico 7. Así mismo, en la tabla 18 se detalla la expresión de cada uno de los genes en cada uno de los pacientes analizados.





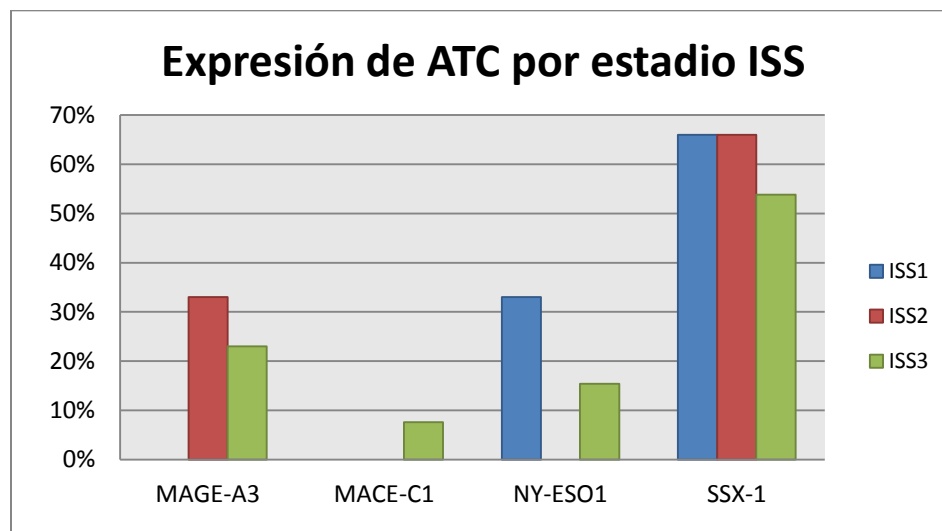
**Gráfico 7.-**Frecuencia de expresión de los genes ATC en la población de estudio

**Tabla 18.-** Presencia/ausencia de genes ATC en la población de estudio

Muestra	MAGE-A3	MAGE-C1	NY-ESO1	SSX-1
M01	-	-	-	+
M02	-	-	-	+
M03	+	-	-	+
M04	-	-	-	+
M05	-	-	-	-
M06	-	-	-	-
M07	+	-	+	+
M08	-	-	-	+
M09	-	-	+	-
M10	-	-	+	-
M11	+	-	-	+
M12	+	-	-	+
M13	-	-	-	-
M14	-	+	-	-
M15	-	-	-	-
M16	-	-	-	-
M17	-	-	-	+
M18	-	-	-	+
M19	-	-	-	+
M20	-	-	-	+
M21	-	-	-	+
M22	-	-	-	+
M23	-	-	-	-

En los gráficos 8 y 9 se ilustran las frecuencias de expresión por estadio ISS y por estadio Durie-Salmon. En cuanto a la expresión de los genes ATC en grupos de pacientes por estadio ISS, de los pacientes que se encontraban en estadio I se encontró expresión de los genes NY-ESO1 y SSX-1, con un 33% y un 66%, respectivamente. Ningún paciente co-expresó estos genes, es decir, sólo expresaron uno de los dos. En el grupo de pacientes que se encontraban en estadio ISS2, se encontró la expresión de los genes MAGE-A3 y SSX-1, teniéndose una expresión del 33% y el 66%, respectivamente. En este caso, un paciente presentó la co-expresión de estos dos genes. Uno de los 3 pacientes pertenecientes a este grupo no expresó ningún ATC. En cuanto al grupo de los pacientes con estadio ISS3, se encontró expresión de cada uno de los genes, sin embargo, no todos los pacientes co-expresaron estos genes. El 31% de los pacientes de este grupo no expresaron ningún ATC. El gen encontrado en mayor proporción fue SSX-1, encontrándose en el 54% de los pacientes pertenecientes a este grupo. Los genes MAGE-A3, NY-ESO1 y MAGE-C1 se encontraron en una proporción de 23%, 15% y 8%, respectivamente (gráfico 8).

De los pacientes que se encontraron en estadio Durie-Salmon 1, se encontró que MAGE-A3 y NY-ESO1 se expresaron en el 18%, MAGE-C1 en el 9% y SSX-1 en el 73% de los pacientes pertenecientes a este grupo. Los pacientes que se encontraban en estadio 2 de la escala de Durie-Salmon no expresaron ningún gen ATC, caso contrario a los que se encontraban en estadio 3, pues MAGE-A3 fue encontrado en el 33% de estos pacientes, MAGE-C1 no se encontró en ninguno, NY-ESO1 se encontró en el 17% de ellos, y SSX-1 se encontró en el 50% de los pacientes con estadio DS3 (gráfico 9).



**Gráfico 8.-** Frecuencia de expresión de los genes ATC por estadio clínico ISS

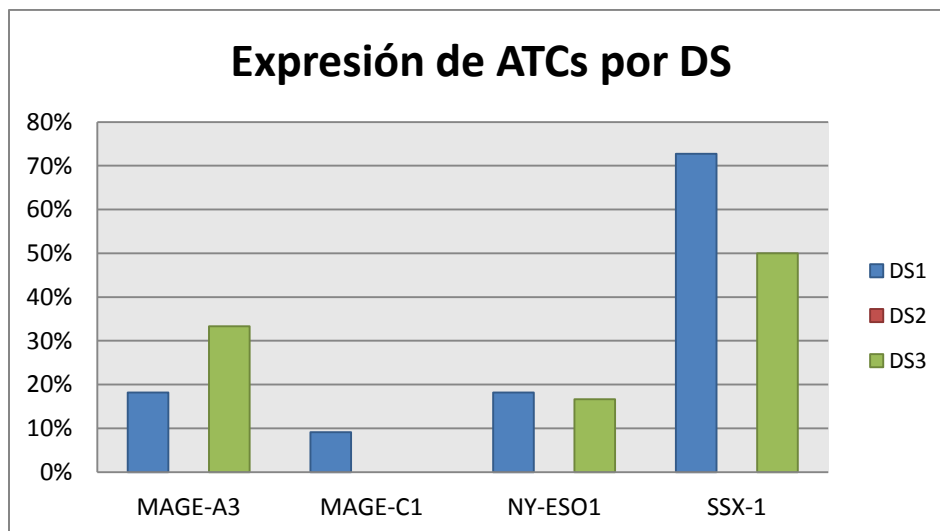


Gráfico 9.- Frecuencia de expresión de los genes ATC por estadio clínico Durie-Salmon

## 7.5 EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES ABC

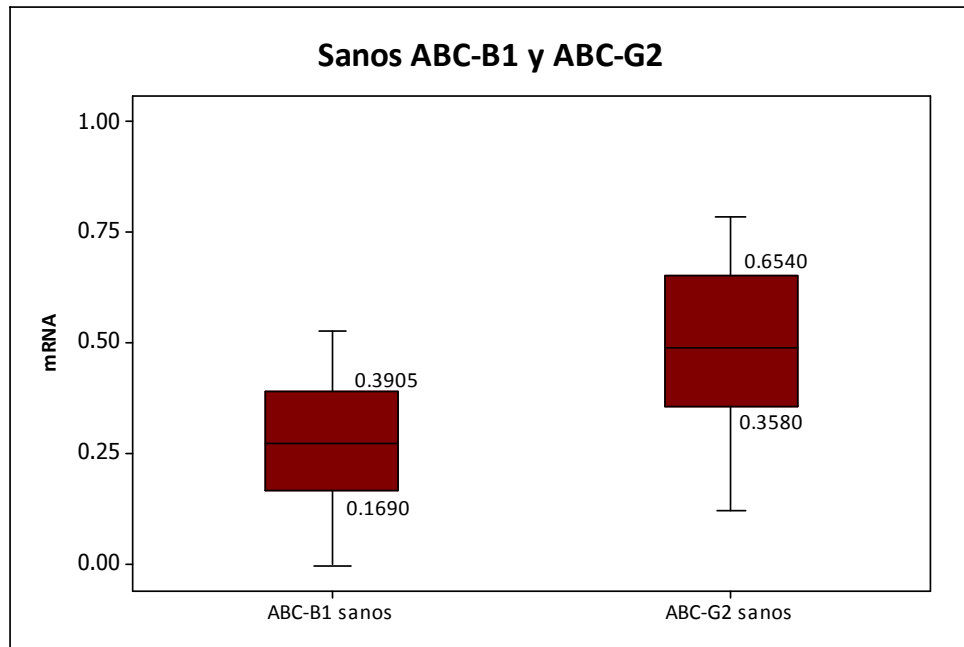
### 7.5.1 NORMALIZACIÓN DEL ESTUDIO

Para la medición de los niveles relativos de expresión de los genes ABC se llevó a cabo un ensayo de qRT-PCR, el cual se realizó mediante dos metodologías: *TaqMan® gene expression assay* (para genes ABC-B1 y ABC-G2), y *SYBR Green®* (para los genes ABC-C1 y ABC-A3). Para ambos casos, se llevó a cabo una normalización con la línea celular K562 y el gen endógeno  $\beta$ 2-microglobulina y una cuantificación con la metodología  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

El ensayo de cuantificación se realizó sólo en 17 pacientes. Con el fin de estratificar a los pacientes analizados con base en los niveles de expresión que presentaron, se determinó un rango de expresión normal tanto para ABC-B1 como para ABC-G2 a partir de 68 muestras de donadores sanos. El 37% (25/68) de los individuos presentaron niveles indetectables de ABC-B1, siendo el 63% restante positivos para la presencia de este gen. El valor de los percentiles fue p25= 0.169, p50= 0.279 y p75= 0.3905

En el caso del gen ABC-G2 se encontró que el 29% (20/68) de los donadores sanos contaban con niveles indetectables de este gen, siendo detectado en el 71% (48/68) restante. El valor de los percentiles en este caso fue de p25= 0.358, p50= 0.506 y p75= 0.654.

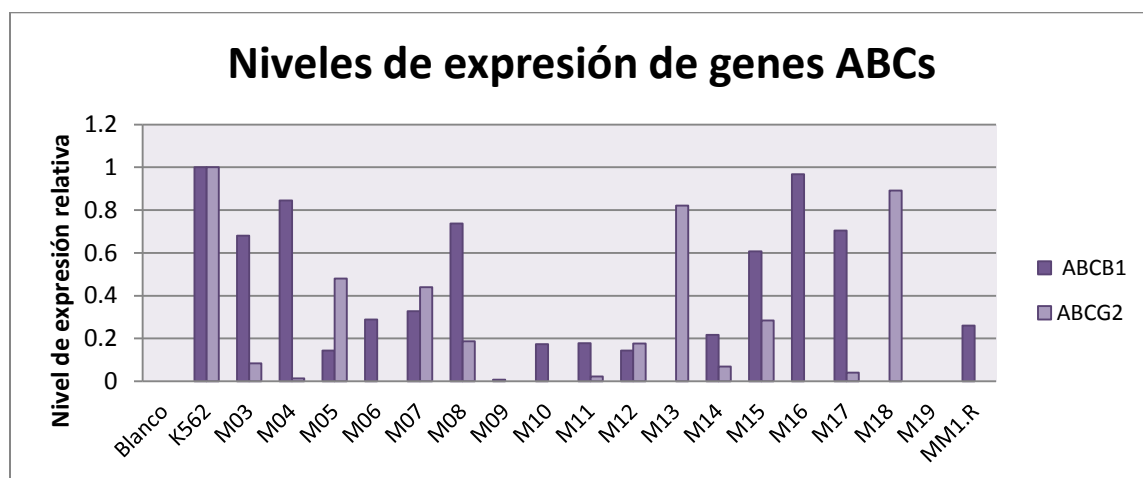
De esta manera, el rango de expresión normal considerado para cada uno de los genes fue de 0.169 - 0.3905 para el caso de ABC-B1 y 0.358 – 0.654 para ABC-G2 (Gráfico 10).



**Gráfico 10.-** Niveles de los expresión relativos de ABC-B1 y ABC-G2 en donadores sanos. Para ABC-B1, el rango de expresión normal fue de 0.1690 a 0.3905. En el caso de ABC-G2, el rango de expresión normal fue de 0.3580 a 0.6540.

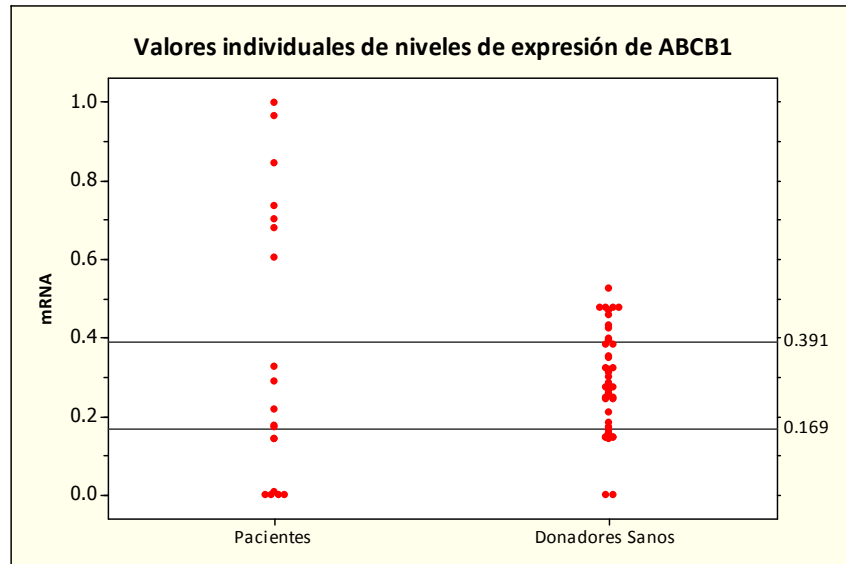
### 7.5.2 EXPRESIÓN DE LOS GENES ABCB1 Y ABCG2

A diferencia de los genes ABCA3 y ABCC1, los cuales no se lograron identificar en ningún paciente, los genes ABCB1 y ABCG2 fueron encontrados tanto por encima como por debajo de los niveles normales de expresión. En el gráfico 11 se muestran los niveles de expresión de estos genes en los 17 pacientes analizados.

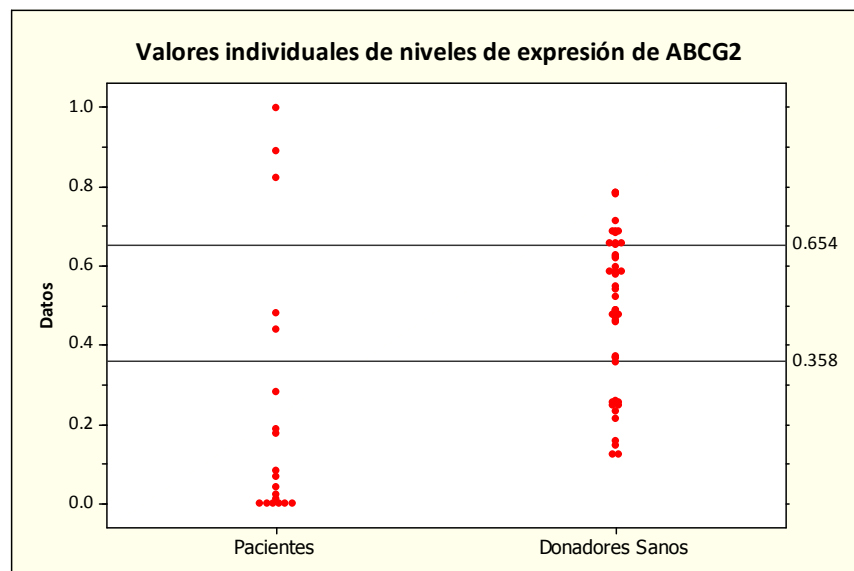


**Gráfico 11.-** Expresión relativa de los genes ABC-B1 y ABC-G2 en pacientes con MM y en línea celular MM1.R

En los gráficos 12 y 13 se muestra una comparativa entre los niveles de expresión de los genes ABCB-1 y ABC-G2 encontrados en los pacientes contra los niveles de expresión encontrados en los donadores sanos.



**Gráfico 12.-** Niveles de expresión de ABCB1 en pacientes con MM y en donadores sanos. Cada punto indica un valor individual de expresión. Los niveles normales, calculados a partir de los niveles de los individuos sanos, van de 0.169 a 0.3905. La media de expresión de los pacientes fue de 0.35413, valor que se encuentra en el rango de expresión normal.



**Gráfico 13.-** Niveles de expresión de ABC-G2 pacientes con MM y en donadores sanos. Cada punto indica un valor individual de expresión. Los niveles normales, calculados a partir de los niveles de los individuos sanos, van de 0.358 a 0.654. La media de expresión de los pacientes fue de 0.2193, valor que se encuentra en el rango de expresión baja

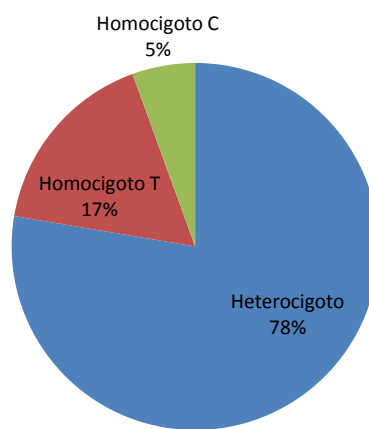
Además de la cuantificación de los niveles de expresión de los genes ABCB1, ABCG2, ABCC1 y ABCA3 en los pacientes, a modo de comparación, también se midieron los niveles de expresión relativa de estos genes en la línea celular de mieloma MM1.R. Esta comparativa se muestra en el gráfico 11.

## 7.6 IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS 3435C >T Y 421C >A

Además de la cuantificación de los niveles de expresión, también se llevó a cabo un ensayo de genotipificación para identificar los polimorfismos 3435C >T y 421C >A para los genes ABCB1 y ABCG2, respectivamente.

En total, se genotipificaron 18 muestras de pacientes con mieloma múltiple, además de la línea celular MM1.R. En el caso del polimorfismo 3435C >T, se encontró que el 78% de los pacientes muestreados presentaron un genotipo heterocigoto, es decir, con un alelo mutado y un alelo *Wild type*. El 17% presentó un genotipo TT, es decir, con ambos alelos mutados, y el 5% restante presentó un genotipo *wild type* (Gráfico 14).

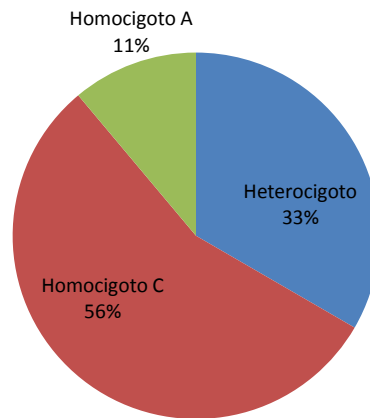
### Frecuencia genotípica ABCB1



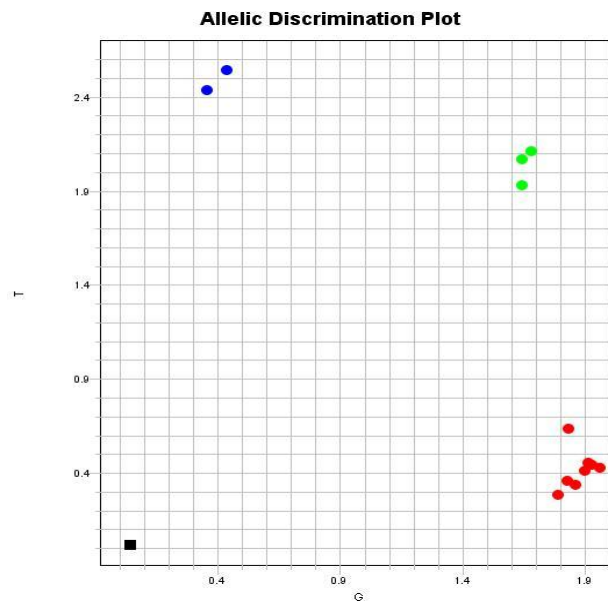
**Gráfico 14.-** Distribución de la frecuencia genotípica de la población de estudio para el polimorfismo 3435C >T del gen ABCB1

La identificación del polimorfismo 421C >A del gen ABCG2 se llevó a cabo en los mismos pacientes que en los que se analizó el polimorfismo 3435C >T. De los 18 pacientes totales, el 33% resultó ser heterocigoto, un 56% presentó un genotipo *wild type* homocigoto C, y el 11% restante presentó un genotipo mutado homocigoto A. La distribución genotípica de la población de estudio se ilustra en el gráfico 15. Así mismo, en la figura 18 se muestra un *plot* de discriminación alélica en donde se indica el genotipo con base en el análisis generado por el software de trabajo.

## Frecuencia genotípica ABCG2



**Gráfico 15.-** Distribución de la frecuencia genotípica de la población de estudio para el polimorfismo 421C >A del gen ABCG2



**Figura 18.-** Plot de discriminación alélica para el polimorfismo 421C >A. El eje X representa el nivel de amplificación del alelo C, el eje Y representa el nivel de amplificación del alelo A. Los puntos azules representan las muestras con genotipo homocigoto A (mutado). Los puntos rojos representan las muestras con genotipo homocigoto C (wild type). Los puntos verdes representan las muestras con genotipo heterocigoto. El cuadro negro representa el control negativo (H<sub>2</sub>O).

## 7.7 CORRELACIÓN CLÍNICA: EXPRESIÓN VS DATOS CLÍNICOS

Una vez obtenidas las frecuencias y los patrones de expresión, se realizó un análisis estadístico para correlacionar los datos clínicos obtenidos de los historiales clínicos de 19 pacientes con dichos patrones. El análisis estadístico se llevó a cabo en el software *IBM SPSS Statistics 15 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc. Chicago, USA)*. El software arrojó los resultados plasmados en las tablas 19 y 20. Los parámetros clínicos evaluados fueron la edad, las concentraciones séricas de  $\beta$ 2-microglobulina, albúmina y creatinina, así como los estadios ISS y Durie Salmon, parámetros que se encuentran íntimamente relacionados con la progresión de la enfermedad.

**Tabla 19.-** Prueba de Chi-cuadrado de Pearson para la correlación entre a presencia de los genes B7 vs los parámetros clínicos analizados

Parámetro		B7.2	B7H1	B7H2	B7H3	B7H4	B7H6
<b>Edad</b> (p)	≥ 55	7	7	4	9	9	3
	≤ 54	5	6	3	6	9	1
		(0.515)	(0.876)	(0.764)	(0.213)	(0.330)	(0.313)
<b>B2M</b> (p)	≥ 5.5	7	8	2	9	10	2
	3.6-5.4	3	3	3	2	5	0
	≤ 3.5	2	2	2	4	3	2
	(0.771)	(0.493)	(0.263)	<b>*(0.041)</b>	(0.138)	(0.187)	
<b>Albúmina</b> (p)	≥ 4.9	0	0	0	0	0	0
	3.5-4.8	3	3	1	3	3	1
	≤ 3.4	9	10	6	12	15	3
	(0.581)	(0.750)	(0.581)	(0.827)	<b>*(0.047)</b>	(0.827)	
<b>Creatinina</b> (p)	≥ 1.3	3	4	2	5	6	2
	0.7-1.2	7	5	3	6	6	2
	≤ 0.6	2	4	2	4	6	0
	<b>*(0.033)</b>	(0.977)	(0.917)	(0.668)	(0.405)	(0.304)	
<b>Calcio</b> (p)	≥ 10.2	5	3	4	4	6	0
	8.6-10.1	5	7	2	7	8	2
	≤ 8.5	2	3	1	4	4	2
	(0.456)	(0.500)	(0.186)	(0.445)	(0.556)	(0.163)	
<b>Estadio ISS</b> (p)	ISSI	2	1	2	3	12	2
	ISSII	2	2	3	2	4	0
	ISSIII	8	10	2	10	2	2
	(0.828)	(0.168)	(0.056)	(0.228)	(0.060)	(0.084)	
<b>Estadio Durie-Salmon</b> (p)	DS1	7	7	5	9	10	2
	DS2	1	2	0	1	2	0
	DS3	4	4	2	5	6	2
	(0.913)	(0.592)	(0.416)	(0.568)	(0.681)	(0.568)	

\* Indica correlación estadísticamente significativa.  $p < 0.05$

**B2M:**  $\beta$ 2-microglobulina. **ISS:** International Staging System.



**Tabla 20.-** Prueba de Chi-cuadrado de Pearson para la correlación entre la presencia de los genes ATC y los parámetros clínicos analizados

	Parámetro	MAGE-A3	MAGE-C1	NY-ESO1	SSX-1
<b>Edad</b>	≥ 55	3	0	1	8
	≤ 54	1	1	2	3
(p)		(0.313)	(0.279)	(0.466)	<b>*(0.040)</b>
<b>B2MT</b>	≥ 5.5	2	1	1	5
	3.6-5.4	2	0	1	3
	≤ 3.5	0	0	1	3
(p)		(0.341)	(0.622)	(0.751)	(0.689)
<b>Albúmina</b>	≥ 4.9	0	0	0	0
	3.5-4.8	1	1	1	3
	≤ 3.4	3	0	2	8
(p)		(0.827)	<b>*(0.047)</b>	(0.570)	(0.435)
<b>Creatinina</b>	≥ 1.3	1	0	1	3
	0.7-1.2	2	1	1	4
	≤ 0.6	1	0	1	4
(p)		(0.828)	(0.405)	(0.991)	(0.842)
<b>Calcio</b>	≥ 10.2	2	0	1	3
	8.6-10.1	1	1	1	5
	≤ 8.5	1	0	1	3
(p)		(0.572)	(0.556)	(0.816)	(0.721)
<b>Estadio ISS</b>	ISSI	0	0	1	2
	ISSII	1	0	0	3
	ISSIII	3	1	2	6
(p)		(0.622)	(0.735)	(0.484)	(0.644)
<b>Estadio Durie-Salmon</b>	DS1	2	1	2	8
	DS2	0	0	0	0
	DS3	2	0	1	3
(p)		(0.568)	(0.681)	(0.808)	(0.143)

\* Indica correlación estadísticamente significativa  $p < 0.05$

**B2M:** β2-microglobulina. **ISS:** International Staging System.

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Con base en los resultados descritos anteriormente, la población estudiada presentó características generales importantes. Primeramente, la media de edad encontrada fue menor a la usualmente reportada en la literatura, siendo de 58.2 años, comparada con la edad reportada de 66 años. Por otra parte, la mayoría de los rangos de los parámetros clínicos encontrados resultaron ampliados hasta 10 veces más con respecto al rango normal de cada uno. En la tabla 16 se ilustran estos rangos encontrados y se comparan con los rangos normales para la población mexicana.

A partir de estos parámetros clínicos observados, se realizó una estratificación y una comparativa entre los estadios ISS y Durie-Salmon entre cada uno de los pacientes. Sólo el 42% de ellos tuvieron estadios similares o equivalentes tanto en el sistema ISS como en el Durie-Salmon. Comparaciones previas entre estos 2 sistemas han arrojado datos similares, por ejemplo, el grupo de Hari<sup>154</sup> realizó una comparación de ambos sistemas en 729 pacientes a lo largo de 7 años, encontrando que sólo el 36% de los pacientes presentaron concordancia entre ambos sistemas. La estratificación de cada uno de estos sistemas se fundamenta en distintos parámetros clínicos y se correlacionan con diferentes aspectos de la enfermedad: el sistema ISS es mayormente correlacionado con la supervivencia general y el riesgo de muerte en determinado intervalo de tiempo, mientras que el sistema Durie-Salmon se correlaciona con la carga tumoral y el daño orgánico general.

### 8.2 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS B7

Uno de los aspectos que dictan la evolución de la enfermedad y, en parte, el comportamiento clínico observado a través de las características generales descritas en la sección anterior, es la evasión inmunológica. Las moléculas co-estimuladoras de la familia B7 juegan un papel sumamente importante en este mecanismo de supervivencia que presentan las células tumorales. La expresión de los genes que codifican para estas moléculas resulta importante debido a las distintas funciones e interacciones que presentan cada uno de estos miembros.

En la población estudiada, el gen que se encontró en mayor proporción fue B7H4, estando presente en 21 de los 23 pacientes (91%). B7H4 es una molécula de regulación negativa cuya función es inhibir la proliferación y producción de citocinas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Se ha encontrado sobreexpresión de esta proteína en distintos tipos de

tumores sólidos y ha sido asociada a la progresión de la enfermedad<sup>155</sup>. La frecuencia de expresión de esta molécula en mieloma múltiple no ha sido reportada, sin embargo, al ser un mecanismo de inhibición inmunitaria, es concordante el hecho de que exista una elevada frecuencia de expresión en estos pacientes.

B7H6 fue el gen que se encontró en menor proporción, hallándose en sólo 6 pacientes (26%). B7H6 es una proteína cuya expresión se limita a células tumorales y tiene funciones estimuladoras, a través de su unión con el receptor NKp30 en células NK induciendo su activación<sup>76</sup>. La frecuencia de expresión de esta molécula en pacientes mieloma múltiple no ha sido descrita del todo, aunque existen estudios donde se ha encontrado expresión en ciertas líneas celulares de mieloma múltiple<sup>156</sup>. La regulación de la expresión del gen B7H6 está dada por histonas desacetilasas 2 y 3, mecanismo meramente epigenético. En el caso particular del mieloma múltiple, los perfiles de expresión de los genes que codifican para estas proteínas desacetilasas permanecen desconocidos, sin embargo, la desregulación (específicamente sobreexpresión) de estos genes ha sido observada en neoplasias hematológicas y en tumores sólidos<sup>157</sup>, hecho que puede explicar la presencia de este gen en los pacientes.

En lo que respecta a B7.2, la frecuencia de expresión resultó ser del 61% (14/23). Anteriormente ha sido reportada la expresión frecuente de B7.2 en células de mieloma múltiple y una muy rara expresión de B7.1<sup>158, 159</sup>, datos similares a los presentados en los pacientes de este ensayo. A pesar de ser parte del sistema principal de coestimulación y activación inmunitaria, la expresión de B7.2 junto con la de CD28 en mieloma múltiple ha sido asociada a un mal pronóstico: CD28 se encuentra en células T y en células plasmáticas mielomatosas<sup>158, 160</sup>. La unión B7.1/B7.2 – CD28 en estas últimas desencadena una serie de señalizaciones que involucra PI3K, PDK1, Akt y Vav, Rac1/Cdc42, MEKK (los cuales regulan la activación de NFκB) que dan como resultado, entre algunos otros efectos, la secreción de IL-6 y de IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), cuya acción implica resistencia a apoptosis por parte de las células plasmáticas de mieloma<sup>161</sup>. Este proceso implica un mecanismo de sobrevivencia en las células plasmáticas mielomatosas, hecho que le confiere la asociación a un mal pronóstico al caso particular del mieloma múltiple<sup>162</sup>.

Por su parte, B7H1 se presentó en el 65% de los pacientes analizados. Previamente ha sido reportada una frecuencia de expresión en más de 50% de los pacientes analizados en cada uno de los estudios<sup>163, 164</sup>, dato similar al encontrado en este estudio. Esta molécula, cuya función es limitar la actividad y sobrevivencia de células T efectoras a través de la unión con su ligando PD-1, está constitutivamente expresada en distintos tejidos no hematopoyéticos, como corazón, pulmones, placenta e hígado. La presencia de esta molécula en dichos tejidos y su función inhibitoria implica la generación de tolerancia periférica contra antígenos propios<sup>49</sup>. La expresión de esta molécula en cáncer ha sido asociada a un mal pronóstico, pues permite la sobrevivencia y evasión de la respuesta inmunológica al facilitar la generación de tolerancia a antígenos y componentes tumorales.

El transcrito que codifica para B7H2 fue encontrado en el 43% de los pacientes analizados, contrario a lo reportado anteriormente por el equipo de Yamashita et al<sup>165</sup> en 2009, quienes reportaron una frecuencia de expresión de alrededor del 8%. Estas diferencias pueden ser explicadas por el hecho de que la *n* del estudio citado es mayor que en este estudio. De igual manera, en el estudio del equipo de Yamashita, alrededor del 90% de los pacientes cursaban un estadio 3 de la clasificación Durie-Salmon, a diferencia de este estudio, donde la mayoría de los pacientes se encontraron en un estadio 1. Debido a sus efectos estimulatorios, la presencia de B7H2 en células neoplásicas ha sido asociada con pronósticos favorables en tumores malignos; sin embargo, en el estudio citado, la presencia de esta molécula fue relacionada con un mal pronóstico en el caso particular del mieloma debido a la inducción de la producción de, entre muchas otras citocinas estimuladoras, IL-10, la cual estimula particularmente la proliferación de células plasmáticas. En el presente estudio, la mayoría de los pacientes que expresaron este gen se encontraban en estadios iniciales tanto de ISS como Durie-Salmon.

Finalmente, en el caso de B7H3 se encontró una frecuencia de expresión del 74%. La medición de esta molécula en pacientes con mieloma múltiple fue realizada en 2013 por el grupo de Zhao et al<sup>166</sup>, en cuyo estudio se encontró una frecuencia de expresión de aproximadamente 48% en pacientes *de novo*. La expresión de esta molécula fue asociada a la destrucción ósea en el estudio citado, sin embargo, la presencia de este gen en distintos tumores sólidos ha sido asociada tanto a respuestas inmunitarias favorables y mayor sobrevida, como a la progresión y mal pronóstico de la enfermedad. En el presente estudio, se encontró una expresión de B7H3 en todos los pacientes con estadio ISSI, evidenciando una posible asociación a estadios iniciales o menos agresivos de la enfermedad. Ha sido identificada una discrepancia entre la presencia del transcrito y los niveles de expresión de la proteína, lo que indica la existencia de mecanismos complejos de regulación postranscripcional<sup>167</sup>. El desconocimiento de sus ligandos, así como la incertidumbre en las funciones y biología de esta molécula, impiden que la presencia de este gen sea concluyentemente un factor pronóstico.

Además de las frecuencias generales, se realizó un análisis de las frecuencias con respecto a los grupos de edad. El gen con mayor frecuencia de expresión en todos los grupos fue B7H4, a diferencia de B7H6, cuya frecuencia de expresión fue la más baja en cada uno de los grupos.

Los patrones de expresión de las moléculas co-estimuladoras con base en la edad no fueron muy diferentes al patrón de expresión en la población total, sin embargo, es destacable el incremento de la frecuencia del gen B7H6 conforme la edad aumenta y el hecho de que en el grupo de los pacientes de 61 a 70 años se incrementó la frecuencia de B7H1 y B7H3 (Gráfico 4). La asociación entre la expresión de estas moléculas y la edad no ha sido descrita con anterioridad, aunque es de esperarse una disminución de moléculas con acción estimuladora debido al estado de inmunosupresión que implica un incremento en la edad. La heterogeneidad del tamaño de los grupos en este caso no permite realizar una comparación objetiva ni una inferencia sobre la asociación entre la presencia de estos genes y la edad.

A diferencia de los patrones de expresión por edad, los que se presentaron al estratificar a los pacientes con base en la clasificación ISS no fueron similares a los de la población en general. Resulta importante resaltar el hecho de que las moléculas B7H1, B7H2 y B7H6, cuya función es determinante (es decir, sólo de inhibición o de estimulación), se observan mayoritariamente en ciertos estadios: por ejemplo, B7H1 se encontró en menor medida en pacientes en ISSI con respecto al grupo de pacientes en estadio ISSIII, en los cuales la frecuencia de expresión aumentó al más del doble (Gráfico 5). En contraste con los estadios ISS, los grupos por estadio Durie-Salmon no presentaron un patrón aparente o una tendencia en cuanto a moléculas de inhibición o de estimulación en cada uno de los estadios (Gráfico 6).

### 8.3 EXPRESIÓN DE LOS GENES ATC

Los genes ATC han sido involucrados en la progresión tumoral tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos, además en la actualidad representan blancos terapéuticos potenciales debido a la restricción de expresión tisular que presentan.

Anteriormente ha sido reportada la expresión de estos genes en ciertas neoplasias hematológicas, específicamente en el caso del mieloma múltiple<sup>85, 86, 127, 168-170</sup>. Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren en cuanto a frecuencias de expresión de algunos genes, por ejemplo, en el estudio realizado en 2007 por el equipo de Condomines et al<sup>85</sup>, se analizó la expresión de varios ATC, entre ellos los genes MAGE-A3, MAGE-C1, NY-ESO1 y SSX-1, encontrándose que el gen con mayor expresión en general fue MAGE-C1, estando presente en el 66% de los pacientes, caso contrario a los genes MAGE-A3, NY-ESO1 y SSX-1, los cuales se hallaron en menos del 20% de la población. De igual manera, el estudio realizado en 2011 por el equipo de van Duin<sup>127</sup>, arrojó datos similares, pues se encontró una frecuencia de expresión de MAGE-C1 del 71% en pacientes de novo y del 61% en pacientes con recaída. En el trabajo de Jungbluth et al<sup>168</sup>, se demostró una mayor expresión de MAGE-C1 y MAGE-A3 en pacientes con estadios clínicos más avanzados y una elevada proliferación de células plasmáticas. El equipo de Pabst, en 2010<sup>169</sup>, encontró una correlación significativa entre la presencia de la proteína MAGE-C1 y el número y gravedad de lesiones osteolíticas, así como a estadios avanzados de la enfermedad y la delección cromosómica 17p13 (p53).

Con respecto a los pacientes analizados en el presente estudio, de los cuatro pacientes que expresaron el gen MAGE-A3, sólo dos se encontraron en estadio 3 en la escala Durie-Salmon, y tres se encontraron en estadio III en la escala ISS. Es importante mencionar que dos de los cuatro pacientes con expresión de MAGE-A3 contaban con más de 50% de células plasmáticas en médula ósea al momento de la toma de la muestra. En cuanto al gen MAGE-C1,

el único paciente con expresión tenía un bajo conteo de células plasmáticas en médula ósea (1%) y se encontraba en estadio clínico 1 de la escala Durie-Salmon, pero en estadio III de la escala ISS. (Gráficos 8 y 9)

En lo que respecta al gen NY-ESO1, se ha reportado su expresión en pacientes con mieloma múltiple y ha sido asociado a un mal pronóstico<sup>170</sup>. En el estudio realizado en 2005 por el equipo de van Rhee *et al*<sup>170</sup>, se encontró una mayor expresión en pacientes con anormalidades citogenéticas y en recaída. Las frecuencias de expresión para los pacientes con diagnóstico *de novo* con anormalidades citogenéticas fue del 60%, mientras que para los pacientes sin anormalidades fue del 31%. En el caso de los pacientes en recaída, las frecuencias se duplicaron, encontrándose en un 100% y un 60% para los pacientes con anormalidades citogenéticas y sin ellas, respectivamente. Otro estudio en 2007, realizado por el equipo de Atanackovic *et al*<sup>171</sup>, reportó una frecuencia de expresión notablemente menor, pues encontraron que el gen se expresó en sólo el 7% de la población estudiada. En el presente estudio, la frecuencia de expresión global de este gen fue del 13%, sin embargo, sólo siete pacientes contaron con cariotipo y de ellos, cuatro eran anormales, aunque ninguno presentó alguna anormalidad que involucrara el locus IgH, características del mieloma múltiple. En cuanto a las expresiones por estadios clínicos, este gen no se expresó en ningún paciente con estadio 2, tanto DS como ISS.

En el caso del gen SSX-1, estudios previos reportan expresiones menores que los genes anteriores. En el estudio de Condomines *et al*<sup>85</sup>, se encontró una expresión de SSX-1 en el 20% de los pacientes, dato similar al reportado por van Duin *et al*<sup>127</sup>, cuya frecuencia encontrada fue del 30% tanto en pacientes con diagnóstico *de novo* como en pacientes con recaída. De igual manera, Atanackovic *et al*<sup>171</sup> en 2007 realizaron un estudio en el cual la expresión de SSX-1 fue positiva en el 35% de los pacientes. Sin embargo, Taylor *et al* en 2005<sup>122</sup>, observaron una expresión en el 42% de los pacientes estudiados, siendo ésta frecuencia más cercana a la encontrada en el presente estudio, la cual fue del 61%.

Las frecuencias de expresión de los genes ATC en pacientes con mieloma múltiple que han sido reportadas entre los distintos estudios son variables. Sin embargo, lo que resulta constante en estos reportes es la alta expresión del gen MAGE-C1 en esta enfermedad. La frecuencia encontrada en el presente estudio resultó ser un tanto diferente de la encontrada en los estudios previamente mencionados, pese a ello, resulta importante mencionar que no existen estudios de frecuencias de estos genes para esta enfermedad en población mexicana, lo que pudiera explicar la discrepancia entre las frecuencias halladas y las frecuencias previamente reportadas.

## 8.4 EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES ABC

A partir de la medición de los niveles de expresión relativa de los genes ABC (ABC-B1, ABC-G2, ABC-A3 y ABC-C1) en los pacientes y en los donadores sanos, se realizó una comparación entre los niveles de expresión y una estratificación de estos niveles, los cuales fueron divididos en: sobre-expresión, expresión normal, sub-expresión y expresión nula.

En el caso particular del gen ABCB1, de los 17 pacientes analizados, se encontró sobre-expresión en 6 (35%), baja expresión en 3 (18%) y nula expresión en 3 pacientes más (18%), teniéndose niveles normales en sólo 5 (29%) de ellos (Gráfico 12).

El gen MDR-1 (ABCB1) ha sido propuesto como el principal responsable de la generación de la multi-drogo resistencia en neoplasias hematológicas, incluido el mieloma múltiple<sup>172, 173</sup>. De igual manera, la sobreexpresión de esta proteína ha sido asociada a la administración de ciertos fármacos, por ejemplo, en 1993 el equipo de Grogan *et al*<sup>173</sup>, observaron que los pacientes tratados con melfalán no presentaban sobreexpresión de la P-gp, sin embargo, en 1997 una asociación entre la sobreexpresión de la proteína y la administración y posterior resistencia a la vincristina, doxorubicina, etopósido y glucocorticoides fue observada por el equipo de Dalton *et al*<sup>174</sup>. Uno de los fármacos que se utilizan ampliamente en el tratamiento para el mieloma múltiple en la actualidad es el inhibidor del proteosoma Bortezomib (Velcade®), el cual inhibe la degradación de proteínas inhibidoras de algunos factores de transcripción involucrados en la patogénesis de la enfermedad, principalmente NF-κB. Recientemente ha sido demostrado que el bortezomib es un sustrato de la P-gp y que afecta directamente la función y la expresión de esta proteína<sup>175</sup>. Así mismo, se ha observado que los inhibidores de proteosoma de segunda generación, como el carfilzomib, están involucrados con la sobreexpresión de ABCB1<sup>176</sup>. En general, los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple *de novo* no sobreexpresan ABCB1<sup>177, 178</sup>. La sobreexpresión de esta proteína ha sido más bien asociada a la recaída y fallo al tratamiento por parte de los pacientes.

De los 6 pacientes que sobreexpresaron este gen, sólo uno se encontraba en estadio ISSI, uno más en estadio ISSII y los cuatro restantes se encontraban en estadio ISSIII. Sin embargo, la mayoría de estos pacientes se encontraban en un estadio Durie-Salmon 1 (4 pacientes), mientras que sólo dos de ellos se encontraban en estadio DS3 (tabla 21). Es importante resaltar el hecho de que el paciente que tuvo el valor más alto de expresión de todo el estudio se encontraba en estadio 3 tanto de la escala Durie-Salmon como de la escala ISS.

La baja o nula expresión de ABCB1 también ha sido relacionada con un mal pronóstico para los pacientes. A diferencia de la sobreexpresión, en la sub-expresión se da un fenómeno de toxicidad celular por parte de células no tumorales debido a que la proteína ABCB1 no sólo es responsable de la expulsión de compuestos con acción

terapéutica, sino que también cumple con funciones de expulsión de productos del metabolismo dañinos para la célula normal. Así pues, la falta de P-gp en células normales conduce a la generación de citotoxicidad y fallo tisular.

**Tabla 21.-** Comparación de los estadios clínicos en pacientes con sobreexpresión de MDR1.

Paciente (Nivel de expresión relativa)	Estadio Durie-Salmon	Estadio ISS
<b>M03</b> <b>(0.6803)</b>	DS1	ISSII
<b>M04</b> <b>(0.8450)</b>	DS1	ISSIII
<b>M08</b> <b>(0.7372)</b>	DS1	ISSI
<b>M15</b> <b>(0.6606)</b>	DS1	ISSIII
<b>M16</b> <b>(0.9675)*</b>	DS3	ISSIII
<b>M17</b> <b>(0.7047)</b>	DS3	ISSIII

\* indica el paciente con el nivel más alto de expresión de todo el estudio  
**DS:** Durie-Salmon. **ISS:** International Staging System

Tres de los 17 pacientes presentaron una baja expresión. De estos tres pacientes, uno se encontraba en estadio ISSI y los otros dos en estadio ISSIII. El paciente que se encontraba en ISSI también se encontraba en DS1, mientras que los dos otros pacientes cursaban con estadios 2 y 3 de la escala Durie-Salmon. Así mismo, entre los pacientes que no expresaron el gen MDR1 en absoluto, uno también se encontraba en estadios ISS y DS 1 y los otros dos en ISSIII y DS1 y 2.

Los cinco pacientes restantes presentaron niveles normales de expresión. De éstos, uno se encontraba en estadio ISSII y en Durie-Salmon 3. Dos de ellos cursaban un estadio ISSIII y un estadio 1 de Durie-Salmon. Los otros dos restantes también se encontraban en estadio ISSIII.

Resulta interesante el hecho de que los pacientes con niveles normales de expresión cursaban en su mayor parte con estadios clínicos más avanzados. Sin embargo, aún no existe un estudio que correlacione los estadios clínicos tanto ISS como Durie-Salmon con los niveles de expresión de ABCB1.

Para el caso del gen ABC-G2, se encontró sobre-expresión en 2 pacientes (12%), sub-expresión en 8 (47%) y nula expresión en 5 de ellos (29%), teniendo niveles de expresión normales sólo en 2 (12%) (Gráfico 13).



La proteína ABCG2 también forma parte de los factores generadores de multi-drogo resistencia. Se encuentra presente en una amplia variedad de tejidos normales, entre los cuales están: células troncales hematopoyéticas, placenta, canalículos biliares, colon y vasos del endotelio cerebral<sup>148</sup>, siendo un componente principal en la homeostasis y mantenimiento de la protección contra toxinas potencialmente dañinas en estos órganos. Interesantemente, se ha observado que la expresión de la BCRP en células hematopoyéticas es inversamente proporcional al grado de maduración de las mismas<sup>179</sup> y, por lo tanto, ha sido utilizada en algunos casos como marcador de células troncales hematopoyéticas<sup>180</sup>. La expresión de ABCG2 tanto en tejido normal sano como en tejido tumoral, se encuentra regulada a diferentes niveles: amplificación génica, modificaciones epigenéticas y regulación transcripcional y post-transcripcional<sup>181</sup>. Sin embargo, su expresión aumentada en tejido tumoral ha sido asociada a la vía de señalización Akt<sup>179</sup>. En el caso del mieloma múltiple, ha sido observada la presencia y funcionalidad de la proteína, así como el aumento en su expresión como respuesta a la quimioterapia<sup>182</sup>.

De los 17 pacientes analizados, sólo dos (12%) presentaron niveles de expresión por encima de los normales. De estos dos pacientes, uno se encontraba en estadio Durie-Salmon 2 y en ISSIII, mientras que el otro se encontraba en estadio 1 de ambas escalas de clasificación.

La amplificación génica ha sido considerada como el principal mecanismo de la sobreexpresión del gen ABCB1<sup>182</sup>. En el caso de ABCG2, se ha observado que también existe un fenómeno de amplificación génica, provocado principalmente por la reintegración cromosómica del amplicón en múltiples cromosomas para generar un genotipo más estable<sup>183</sup>. Así mismo, otro mecanismo ampliamente asociado a la sobreexpresión de este gen, es el de la desmetilación del promotor del mismo. Específicamente en el caso del mieloma múltiple, se ha encontrado que la desmetilación de este gen es un factor vital para el aumento de la expresión de esta proteína<sup>182</sup>. El aumento de la expresión de ABCG2 en mieloma múltiple se ha observado después de la exposición a ciertos fármacos, como el topotecano o la doxorubicina<sup>182</sup>. Los dos pacientes que presentaron sobreexpresión se encontraban tratados con regímenes terapéuticos basados en talidomida, la cual no ha sido asociada con la sobreexpresión de este gen. Por otro lado, estos pacientes se encuentran en el grupo de los tres pacientes que no expresaron niveles detectables de ABCB1, de hecho, ningún paciente co-expresó ambos genes en niveles por encima de los normales.

Por otro lado, dentro del grupo de pacientes que presentaron una baja expresión de ABCG2, se encontraron seis en estadio ISSIII, uno en ISSII y uno más en ISSII. De los pacientes cuya expresión no fue detectada, los cuales fueron cinco, tres se encontraban en estadio ISSIII, uno en estadio ISSII, y el restante en ISSI.

Una vez más, resulta importante resaltar el hecho de que alrededor del 80% de los pacientes con baja o nula expresión de ABCG2, presentan a su vez niveles elevados o normales de ABCB1. Es probable que no exista la co-expresión aumentada de estos dos genes, aunque, por supuesto, factores como la *n* o el número de donadores sanos para calcular el intervalo de normalidad pueden cambiar los valores y rangos de estratificación de expresión normal para ambos genes (Gráfico 11).

Por último, ambos pacientes que expresaron niveles normales de ABCG2 se encontraban en estadio ISSIII, aunque uno se encontraba en estadio DS2 y el otro en DS1. Uno de estos dos pacientes también presentó niveles normales de ABCB1, mientras que el otro presentó baja expresión del mismo.

Sólo en uno de los 17 pacientes analizados no se encontraron niveles detectables de ABCB1 ni de ABCG2. Interesantemente el comportamiento clínico de la enfermedad en este paciente fue muy agresivo, siendo el paciente con menor tiempo de internamiento en el servicio.

A manera de comparación con un modelo celular más controlado, también se realizó este análisis en la línea celular de mieloma MM1.R, la cual presenta resistencia a glucocorticoides utilizados en regímenes quimioterapéuticos a los que varios pacientes pueden crear resistencia en algún momento<sup>184, 185</sup>. A pesar de contar con resistencia a ciertos fármacos, no se ha reportado la expresión aumentada de ningún transportador ABC en esta línea celular, pues el mecanismo mediante el cual se genera la resistencia no es el de el eflujo de fármacos a través de bombas, sino más bien se debe a la expresión reducida o alterada del receptor para glucocorticoides<sup>186</sup>. En el presente estudio se encontraron niveles normales de ABCB1 ( $\Delta\Delta\text{CT}= 0.2601$ ) y nula expresión de los otros miembros de la familia ABC que fueron analizados. En el gráfico 11 se muestra una comparación entre los niveles de expresión de los genes ABCB1 y ABCG2 entre todas las muestras y la línea celular.

La cuantificación de los niveles de expresión de los transportadores ABC ha cobrado una alta relevancia en los últimos años, no sólo por el hecho de ser factores cruciales en la generación de resistencia a fármacos quimioterapéuticos durante la enfermedad, sino también por el hecho de influir en el metabolismo y protección contra toxinas ambientales y agentes carcinogénicos que conllevan a una transformación tumoral en individuos sanos. Fármacos cuya acción implica una reducción en la actividad de estos transportadores han sido utilizados como terapia conjunta con la quimioterapia, obteniendo resultados favorables<sup>152</sup>.

## 8.5 GENOTIPIFICACIÓN

La expresión aumentada de los genes ABC no es el único motivo por el cual puedan llegar a influir en la respuesta al tratamiento y por lo tanto a la progresión de la enfermedad. En los genes ABCB1 y ABCG2 han sido identificados distintos polimorfismos que pueden llegar a alterar la estructura, la función, la actividad o la expresión misma de estas proteínas.

En el gen ABCB1 el polimorfismo 3435C >T (Rs1045462) ha sido ampliamente estudiado, pues se han encontrado cambios en la expresión, la especificidad de los sustratos, susceptibilidad a la generación de tolerancia a ciertas drogas, e incluso al aumento en el riesgo de la aparición de algunas neoplasias asociadas a su presencia<sup>187-190</sup>. En el presente estudio se llevó a cabo la identificación de este polimorfismo en pacientes con mieloma múltiple. Cabe aclarar que de los 19 pacientes a los que se les realizó la cuantificación de niveles de ABCB1, sólo 14 contaron con material genético de calidad para llevar a cabo el ensayo de genotipificación. Así mismo, se incluyeron algunos pacientes que no contaban con expediente clínico con el fin de establecer una frecuencia en la población general de estudio, por lo tanto, estos datos no se incluyeron en la asociación clínica general de los pacientes.

En población mexicana, el equipo de Ugarte *et al*<sup>191</sup>, describieron una frecuencia genotípica en individuos sanos del 14% para el genotipo CC (*wild type*), 53% para el heterocigoto CT, y un 33% para el genotipo homocigoto TT, el cual es la forma mutada del gen. En el mismo estudio, se hallaron frecuencias un tanto similares en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, encontrándose una frecuencia del 17% para el genotipo homocigoto CC, 61% para el heterocigoto y 22% para el genotipo mutado. En otro estudio, realizado por el equipo de Macías *et al*<sup>192</sup>, en individuos sanos se observó una frecuencia del 20% para el genotipo homocigoto CC, 56% el heterocigoto CT y un 24% para el homocigoto TT. Estas frecuencias fueron comparadas en el mismo estudio con las presentadas en pacientes con cáncer de mama, encontrándose que de estas pacientes el 26% presentaba un genotipo homocigoto CC, el 66% presentaba un genotipo heterocigoto CT y el 8% restante presentaba un genotipo mutado TT. Las diferencias entre estos estudios y los datos presentados en este trabajo pueden deberse al número de pacientes incluidos en el estudio o incluso al tipo de neoplasia analizada.

El polimorfismo de nucleótido único 3435C >T ocurre en el exón 26 del gen ABC-B1 y se le considera como un polimorfismo “silencioso”, es decir, a nivel proteico no altera la secuencia de aminoácidos del péptido en cuestión. A pesar de esto, su presencia se ha correlacionado con una función y expresión aberrantes<sup>146</sup>. Sin embargo, existen discrepancias entre todos los estudios de asociación del polimorfismo y la alteración de su expresión. En el caso particular del mieloma múltiple, se ha observado una asociación entre la supervivencia general y la presencia de este polimorfismo, esto debido a la función reducida que se observó en el estudio de Drain *et al* en 2011<sup>193</sup>, en donde se sugiere que el polimorfismo está involucrado a nivel post-transcripcional en el plegamiento de la proteína.

En el presente estudio, de los pacientes que contaron con la cuantificación de niveles de expresión relativa de ABCB1, cuatro tenían sobre-expresión, tres tenían baja expresión, cuatro tenían expresión normal, y tres presentaban niveles no detectables del transcrito. Los cuatro pacientes con sobre-expresión presentaron un genotipo heterocigoto. De los tres pacientes con baja expresión, dos presentaron un genotipo heterocigoto y el restante presentó genotipo mutado homocigoto T. En cuanto a los pacientes con expresión normal de ABCB1, dos presentaron genotipo heterocigoto, uno presentó un genotipo *wild type* homocigoto C, y el restante presentó un genotipo mutado homocigoto T. Los tres pacientes con expresión nula presentaron un genotipo heterocigoto. En la tabla 22 se muestra una comparación entre los niveles de expresión y el genotipo que presentaron los pacientes.

**Tabla 22.**-Comparativa de los niveles de expresión del gen ABCB1 contra el genotipo presentado

Muestra	Nivel de expresión relativa	Genotipo
M05	Bajo	Heterocigoto
M09	Bajo	Heterocigoto
M12	Bajo	<b>Mutado</b>
M07	Normal	Heterocigoto
M14	Normal	Heterocigoto
M10	Normal	Homocigoto C
M11	Normal	<b>Mutado</b>
M13	Nulo	Heterocigoto
M18	Nulo	Heterocigoto
M19	Nulo	Heterocigoto
M08	Sobre-expresado	Heterocigoto
M15	Sobre-expresado	Heterocigoto
M16	Sobre-expresado	Heterocigoto
M17	Sobre-expresado	Heterocigoto

La línea celular de mieloma MM1.R presentó un genotipo *wild type* homocigoto C y una expresión normal del gen. Para los alcances de la investigación bibliográfica realizada para el presente estudio, no existe dato alguno sobre el genotipo de esta línea celular para el gen ABCB1, siendo éste el primero.

Por otro lado, en el gen ABCG2 se ha identificado el polimorfismo 421C > A como uno de los principales en este gen. Este polimorfismo ocurre en el exón 5 del gen ABCG2 y ha sido asociado directamente con niveles bajos de expresión de la proteína. En la tabla 23 se muestra una comparativa entre los niveles de expresión y el genotipo que presentó cada paciente.

**Tabla 23.-** Comparativa de los niveles de expresión de ABCG2 contra el genotipo presentado

Muestra	Nivel de expresión relativa	Genotipo
M08	Bajo	Heterocigoto
M12	Bajo	Heterocigoto
M15	Bajo	Heterocigoto
M14	Bajo	<b>Mutado</b>
M11	Bajo	Homocigoto C
M17	Bajo	Homocigoto C
M05	Normal	Heterocigoto
M07	Normal	Homocigoto C
M09	Normal	Homocigoto C
M10	Normal	Homocigoto C
M16	Nulo	<b>Mutado</b>
M19	Nulo	Homocigoto C
M13	Sobre-expresado	Heterocigoto
M18	Sobre-expresado	Heterocigoto

La línea celular de mieloma MM1.R presentó un genotipo heterocigoto y una expresión nula del gen. Al igual que el caso de ABCB1, no fueron encontrados estudios previos sobre este gen en esta línea celular.

Ha sido reportado que este polimorfismo se presenta generalmente en conjunto con otros dos: el 34G >A y el 376C >T, los cuales alteran la estructura de la proteína<sup>194</sup>. A diferencia del 3435C >T en el gen ABCB1, esta alteración sí provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos a nivel proteico, pues se intercambia una glutamina en posición 141 por una lisina, lo cual altera la estructura del dominio de unión a ATP<sup>194</sup>. La razón por la cual los niveles de expresión disminuyen, es que la alteración estructural que sufre la proteína conlleva a una desestabilización a nivel de retículo endoplásmico, lo que induce un aumento de su degradación mediada por ubiquitinación y la correspondiente degradación proteosómica. Así pues, la presencia de este polimorfismo no afecta a la proteína a un nivel transcripcional o traduccional, la afección ocurre a un nivel postraduccional<sup>195, 196</sup>.

A pesar de no formar parte del análisis estadístico y la asociación clínica, estos resultados arrojan datos muy interesantes sobre el perfil genotípico y los niveles de expresión generales de estos genes en los pacientes mexicanos con mieloma múltiple.

## 8.6 CORRELACIÓN CLÍNICA: EXPRESIÓN DE LOS GENES VS DATOS CLÍNICOS

La identificación de todos estos genes resulta importante dadas las funciones e implicaciones que tienen en la biología, la fisiopatología y la respuesta al tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, la mera identificación de los genes difícilmente permite visualizar claramente el impacto que tienen sobre la enfermedad, por lo cual un análisis estadístico fue necesario.

Interesantemente, tres de los 6 genes B7 encontrados en la población tuvieron una correlación estadísticamente significativa (Tabla 19). Estos genes fueron B7.2, B7H3 y B7H4. Para el caso del gen B7.2, se encontró una correlación estadísticamente significativa con las concentraciones de creatinina sérica. Este parámetro bioquímico es indicativo del estado renal general. Con anterioridad, la expresión de B7.2 ha sido asociada al crecimiento y desarrollo de las células tumorales y a un pronóstico desfavorable en general<sup>152</sup>, sin embargo, la correlación directa con algún parámetro clínico cuantificable no había sido encontrada<sup>148</sup>. A pesar de haber encontrado correlación estadísticamente significativa con los niveles de creatinina, otros valores que se relacionan con el funcionamiento renal (como la urea), no presentaron asociación con la expresión de este gen.

A su vez, el gen B7H3 presentó correlación estadísticamente significativa con las concentraciones séricas de  $\beta$ 2-microglobulina. La elevación de este parámetro ha sido asociada con la progresión de la enfermedad y en la actualidad, es un indicador predictivo en mieloma múltiple. La asociación, sin embargo, no se observó en otros parámetros predictivos, como por ejemplo los niveles de albúmina sérica o el mismo estadio ISS. En estudios previos en mieloma múltiple, esta molécula ha sido asociada con destrucción ósea y un mal pronóstico<sup>153</sup>, sin embargo, en el presente estudio no se encontró una correlación con parámetros como calcio sérico o estadio Durie-Salmon que permitan confirmar lo anterior. La previa asociación con pronósticos tanto positivos como negativos en neoplasias hematológicas y en tumores sólidos hacen de esta molécula un blanco importante de estudio para corroborar su implicación en el comportamiento de la enfermedad.

La expresión del gen B7H4 presentó una asociación significativa con las concentraciones séricas de albúmina. Cabe resaltar que ninguno de los pacientes analizados presentó niveles de albúmina por encima de los normales. La albúmina se encuentra relacionada directamente con la concentración de globulinas en la sangre; la concentración de albúmina disminuye en presencia de altas concentraciones de globulinas con el fin de mantener el equilibrio osmótico<sup>11</sup>, por lo tanto, los niveles elevados de esta proteína son comunes en el mieloma múltiple. La presencia de este gen sólo ha sido asociada a inmunosupresión general y a la progresión de la enfermedad<sup>142</sup>, pero su asociación directa con parámetros clínicos propios de la enfermedad no ha sido encontrada.

Con respecto a los genes ATC, el único gen al que se le encontró una correlación estadísticamente significativa con alguno de los parámetros clínicos fue SSX-1. A pesar de que con anterioridad este gen no había sido correlacionado con ningún parámetro<sup>155</sup>, en el presente estudio se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de SSX-1 y la edad. Factores como el número de muestras analizadas o la estratificación de grupos de edad pueden explicar la diferencia entre ambos estudios.

La prueba estadística arrojó datos que indican que el gen MAGE-C1 se encuentra asociado a los niveles séricos de albúmina (Tabla 20), sin embargo, este dato no es válido ya que dicho gen se expresó sólo en un paciente de todo el estudio, por lo cual se descarta la afirmación de que se haya encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el gen MAGE-C1 y la concentración de albúmina sérica.

A pesar de no haber sido encontrada una correlación clínica en todos los genes estudiados, es importante resaltar el hecho de que el panel completo permite tener un panorama general sobre el estado inmunológico de las células tumorales del paciente (dado por los genes B7), sobre el comportamiento en el ciclo celular y la proliferación de las mismas (dado por los genes ATC) y sobre la respuesta al tratamiento por parte del paciente (dada por los niveles de ABC).

Un claro ejemplo de lo anterior es el hecho de que los pacientes M05 y M06, quienes presentaron una respuesta clínica favorable al momento de la toma de muestra, no presentaron expresión de ningún gen ATC, sin embargo, se encontró la presencia de moléculas de inhibición inmunológica, como B7H4 y B7H1, genes que, sin duda, fueron factores cruciales para el desarrollo de una posterior evolución desfavorable y un mal pronóstico. Así mismo, el paciente M08, a pesar de haber sido positivo para la presencia de varias moléculas de co-estimulación positiva como B7H2 y B7H6, presentó sobre-expresión del gen ABCB1, hecho que explica la alta refractariedad en este paciente.

Así pues, se puede observar la relevancia y el impacto que tienen estos genes en la fisiopatología y evolución clínica de la enfermedad.

## 9. CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de transcritos de los genes de moléculas coestimuladoras B7, genes ATC y genes MDR en pacientes con mieloma múltiple del Hospital General de México, lográndose determinar el nivel de correlación que existe entre la expresión de los genes analizados y los datos clínicos de los pacientes, encontrándose una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del gen B7.2 y creatinina, el gen B7H3 y  $\beta$ 2-microglobulina, el gen B7H4 y albúmina, y el gen SSX1 y la edad.
- Se obtuvieron las frecuencias de expresión de cada uno de estos genes en una población mexicana, hecho que, para los alcances bibliográficos del presente trabajo, no había sido descrito.
- Se determinaron las frecuencias de los polimorfismos 3435C>T y 421A>T de los genes de multi-drogo resistencia ABC-B1 y ABC-G2, respectivamente, que, para los alcances bibliográficos del presente trabajo, no habían sido descritas.
- Los resultados obtenidos permiten ver que sí arroja datos valiosos para el entendimiento del comportamiento de la enfermedad y puede ser extrapolado a distintas neoplasias tanto hematológicas como no hematológicas.



## 10. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos clínicos que involucren un ajuste en la dosis terapéutica con base en el análisis de los genes ABC en pacientes con mieloma múltiple.
- Monitorear el patrón de expresión de estos genes en pacientes con diagnóstico *de novo* y realizar un seguimiento que permita correlacionar dicho monitoreo con la evolución de la enfermedad.
- Llevar a cabo el análisis de niveles de expresión de los genes B7 a lo largo de la enfermedad con el fin de evaluar el comportamiento de la expresión con base en la evolución clínica.
- Llevar a cabo el análisis de las moléculas co-estimuladoras en otras neoplasias hematológicas, cuyos datos arrojados serán de gran importancia para el entendimiento de la evolución clínica y el estado inmunológico del paciente.

El estudio de estas moléculas permitirá en un futuro tener mejores terapias y tener un mejor entendimiento sobre los mecanismos de sobrevivencia y desarrollo no sólo en el mieloma múltiple, sino también en otros tipos de neoplasias que continúan siendo uno de los principales problemas de salud en todo el mundo.

## 11. REFERENCIAS

- 1.- Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 2.- Hanahan D, Weinberg R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144: 646–74.
- 3.- Alberts B, et al. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 5ª ed. 1205–1223.
- 4.- Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. (2004) Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol*. 25: 645-649.
- 5.- LeBien TW, Tedder TF. (2009). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 5: 1570-1580.
- 6.- Brack C, Hiram M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*. 15: 1-14.
- 7.- García-Mariscal A, del-Banco B, Hernández-Munain C. (2012). Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del <<modelo de accesibilidad>> en el control de recombinación V(D)J. *Inmunología*. 32: 57-69.
- 8.- Mayani H., Flores E., Pelayo R., et al. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*. 2: 95-107.
- 9.- Alt FW. (2015). *Molecular Biology of B cells*. Academic Press. 2ª ed. 232-243.
- 10.- Fagraeus A. (1948). The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J Immunol*. 58: 1–13.
- 11.- Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, et al. (2004). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in Blimp-1 expression. *J Exp Med*. 200: 967–77.
- 12.- Abbas A. (2012). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier. 7ª ed. 16-34.
- 13.- Schimmer AD. (2008). Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies. *Best Pract Res Clin Haematol*. 21: 5-11.
- 14.- Sabrafen J. (2006). *Hematología clínica*. Elsevier. 5a ed. 635, 636.
- 15.- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. (2009). International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spot light review. *Leukemia*. 23: 2210–2221.
- 16.- Demers P, Vaughan T, et al. (1993). A case-control study for multiple myeloma and occupation. *Am J Ind Med*. 23: 629-39.
- 17.- Dalia S, Dunker K, Sokol L, Mhaskar R, et al. (2015). Hepatitis B seropositivity and risk of developing multiple myeloma or Hodgkin lymphoma: A meta-analysis of observational studies. *Leuk Res*. 39(12): 1325-1333.
- 18.- Mahindra A, Hideshima T, Anderson K. (2010). Multiple myeloma: Biology of the disease. *Blood Reviews*. 24: S5-S11.
- 19.- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 International Agency for Research on Cancer; <http://globocan.iarc.fr>. Consultado el .10 de enero de 2016.
- 20.- Gómez-Almaguer D, Cano-Castellanos R, Cedillo-de la Cerda JL, et al. (2010). Guías Mexicanas de diagnóstico y recomendaciones terapéuticas para mieloma múltiple. *Hematología*. 11(1):40 62.

- 21.- Berrios R. (2006). Frecuencia de enfermedades onco-hematológicas en el servicio de hematología del Hospital General de México. Revisión de 6 años. Tesis de especialista en medicina (hematología). Universidad Nacional Autónoma de México. 32-55.
- 22.- Landgren O, Gridley G, Turesson I, et al. (2006). Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African-American and white veterans in the United States. *Blood* 107: 904–906.
- 23.- García-Sanz R, Mateos M, Miguel J. (2007). Mieloma múltiple. *Medicina Clínica*. 129(3): 104-115.
- 24.- Fritschi L, Siemiatycki J. (1996). Lymphoma, myeloma and occupation: results of a case-control study. *Int J Cancer*. 67: 498–503.
- 25.- Brown LM, Linet MS, Greenberg RS, et al. (1999). Multiple myeloma and family history of cancer among blacks and whites in the U.S. *Cancer*. 85: 2385–90.
- 26.- Rollig C, Knop S, Bornhauser M. (2015). Multiple myeloma. *Lancet*. 385: 2197–2208.
- 27.- Bladé J, Lust JA, Kyle RA. (1994). IgD multiple myeloma: presenting features, response to therapy and survival in a series of 53 patients. *J Clin Oncol*. 12: 2398-2404.
- 28.- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 23(15): 3412-20.
- 29.- Durie BG, Salmon SE. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 36: 842- 854.
- 30.- Drayson M, Begum G, Basu S, et al. (2006). Effects of paraprotein heavy and light chain types and free light chain load on survival in myeloma: an analysis of patients receiving conventional dose chemotherapy in Medical Research Council UK multiple myeloma trials. *Blood*. 108: 2013-9.
- 31.- Rosinol L, Blade J, Esteve J, et al. (2003) Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol*. 123: 631-6.
- 32.- Dimopoulos MA, Hamilos G. (2002). Solitary bone plasmacytoma and extramedullary plasmacytoma. *Curr Treat Options Oncol*. 3: 255-9.
- 33.- Dispenzieri A, Kyle RA. (2005). Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 18: 553-68.
- 34.- García-Sanz R, Orfao A, González M, et al. (1999). Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood*. 93: 1032-7.
- 35.- Kyle RA, Rajkumar SV.(2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 23: 3-9.
- 36.- Durie BG, Kyle RA, Belch A, et al, and the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. (2003). Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J*. 4: 379-98.
- 37.- Seifert M, Scholtysik R, Küppers R. (2013). Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. *Methods Mol Biol*. 971: 1-25.
- 38.- Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 12(5): 335-348.
- 39.- Bianchi G, Munchi NC. (2015). Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 125(20): 3049–3058.

- 40.- Fonseca R, Blood EA, Oken MM, et al. (2002). Myeloma and the t(11;14)(q13;q32): evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood*. 99: 3735–3741.
- 41.- Santra M, Zhan F, Tian E, et al. (2003). A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood*. 101: 2374–2376.
- 42.- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. (2007). Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 109: 3489–3495.
- 43.- Tian E, Zhan F, Walker R, et al. (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 349: 2483-94.
- 44.- Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, et al. (2007). The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell*. 11(4): 349-360.
- 45.- He Y, Wheatley K, Clark O, et al. (2003). Early versus deferred treatment for early stage multiple myeloma. *Cochrane Database Syst Rev*. 1: CD004023.
- 46.- Korde N, Kristinsson Y, Landgren O. (2011). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): a novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood*. 117 (21): 5573-5571.
- 47.- Prehn RT, Main JM. (1957). Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst*. 18(6): 769-778.
- 48.- Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunol*. 34(11): 556–563.
- 49.- Keir ME, et al. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol*. 26: 677–704.
- 50.- Pardoll DM. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 12(4): 252-264.
- 51.- Greaves P, Gribben JG. (2012). The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood*. 121(5): 734-44.
- 52.- Flajnik MF, Tlapakova T, Criscitiello MF, Krylov V, Ohta Y. (2012). Evolution of the B7 family: co-evolution of B7H6 and Nkp30, identification of a new B7 family member, B7H7, and of B7's historical relationship with the MHC. *Immunogenetics*. 64: 571–90.
- 53.- Viola A, Lanzavecchia A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*. 273: 104–106.
- 54.- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. (1995). CD28 co-stimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 3: 87–98.
- 55.- Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA, et al. (1997). CD28 co-stimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J. Immunol*. 158: 658–665.
- 56.- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1: 405–413.
- 57.- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. (2005). The B7 Family Revisited. *Rev. Immunol*. 23: 515-48.
- 58.- Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. (1999) B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF alpha. *Immunity*. 11: 423–432.
- 59.- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 397(6716): 263–266.
- 60.- Choi YS, Kageyama R, Eto D, et al. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34(6): 932–946.

- 61.- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, et al. (2001). B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* 2(3): 269–274.
- 62.- Zhang G, Wang J, Kelly J, et al. (2010). B7-H3 augments the inflammatory response and is associated with human sepsis. *J. Immunol.* 185(6): 3677–3684.
- 63.- Hashiguchi M, Kobori H, Ritprajak P, et al. (2008). Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(30): 10495–10500.
- 64.- Leitner J, Klauser C, Pickl WF, et al. (2009). B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: no evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *Eur. J. Immunol.* 39: 1754–1764.
- 65.- Zang X, Loke P, Kim J, et al. (2003). B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(18): 10388–10392.
- 66.- Wang X, Hao J, Metzger DL, et al. (2012). B7-H4 Treatment of T cells inhibits ERK, JNK, p38, and AKT activation. *PLoS ONE.* 7(1): e28232.
- 67.- Wang X, Hao J, Metzger DL, et al. (2009). Local expression of B7-H4 by recombinant adenovirus transduction in mouse islets prolongs allograft survival. *Transplantation.* 87: 482–490.
- 68.- Chen C, Zhu YB, Shen Y, et al. (2012). Increase of circulating B7-H4-expressing CD68+ macrophage correlated with clinical stage of lung carcinomas. *J. Immunother.* 35(4): 354–358.
- 69.- Chen LJ, Sun J, Wu HY, et al. (2011). B7-H4 expression associates with cancer progression and predicts patient's survival in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 60(7): 1047–1055.
- 70.- Quandt D, Fiedler E, Boettcher D, Marsch WC, Seliger B. (2011). B7-h4 expression in human melanoma: its association with patients' survival and antitumor immune response. *Clin. Cancer Res.* 17(10): 3100–3111.
- 71.- Wang L, Rubinstein R, Lines JL, et al. (2011). VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J. Exp. Med.* 208(3): 577-592.
- 72.- Sakr MA, Takino T, Domoto T, et al. (2010) GI24 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Sci.* 101(11): 2368–2374.
- 73.- Aloia L, Parisi S, Fusco L, Pastore L, Russo T. (2010) Differentiation of embryonic stem cells 1 (Dies1) is a component of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling pathway required for proper differentiation of mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 285(10): 7776–7783.
- 74.- Jung, K., & Choi, I. (2013). Emerging Co-signaling Networks in T Cell Immune Regulation. *Immune Network.* 13(5): 184–193.
- 75.- Brandt CS, Baratin M, Yi EC, et al. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* 206(7): 1495-1503.
- 76.- Zhang T, Wu MR, Sentman CL. (2012). An NKp30-based chimeric antigen receptor promotes T-cell effector functions and anti-tumor efficacy in vivo. *J. Immunol.* 189(5): 2290–2299.
- 77.- Zhu Y, Yao S, Iliopoulou BP, et al. (2013). B7-H5 costimulates human T cells via CD28H. *Nat. Commun.* 4(3043): 1-12.
- 78.- Wilcox RA, Ansell SM, Lim M, Zou W, Chen L. (2012). The B7 Homologues and their Receptors in Hematologic Malignancies. *Eur J Haematol.* 88: 456-475.
- 79.- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T-cell activation. *Nat Immunol.* 2(3): 261-268.

- 80.- Fratta E, Coral S, Covre A, et al. (2011). The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Molec. Onc.* 5(6): 164–82.
- 81.- Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 5(8): 615-625.
- 82.- Caballero OL, Chen YT. (2009). Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 100(11): 2014-2021.
- 83.- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. (2004). The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4: 1.
- 84.- Olarte I. (2012). Detección de antígenos testiculares de cáncer *MAGE-A3/A6*, *MAGEA4*, *MAGE-B2*, *MAGE-C1/CT7*, *NY-ESO1*, *LAGE-1* y *GAGE* en linfoma y su correlación clínico-pronóstico en la evolución de la enfermedad. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 85.- Condomines M, Hose D, Raynaud P, et al. (2007). Cancer/Testis Genes in Multiple Myeloma: Expression Patterns and Prognosis Value Determined by Microarray Analysis. *J Immunol.* 178(5): 3307-15.
- 86.- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, et al. (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8: 2.
- 87.- Karpf AR, Jones DA (2002). Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* 21(35): 5496-503.
- 88.- De-Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. (1999). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell Biol.* 19(11): 7327-35.
- 89.- Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. (2006). Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of *MAGE-A1*, *-A2*, *-A3*, and *-A12* in human cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 4(5): 339-49.
- 90.- Iizuka M, Smith MM. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13(2): 154-160.
- 91.- Santos-Rosa H, Caldas C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur. J. Cancer.* 41(16): 2381-402.
- 92.- Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, et al. (2003). Overexpression of *MAGE/ GAGE* genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 9(7): 2778-85.
- 93.- Laduron S, Deplus R, Zhou S, et al. (2004). *MAGE-A1* interacts with adaptor *SKIP* and the deacetylase *HDAC1* to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 32(14): 4340–4350.
- 94.- Bai S, He B, Wilson EM. (2005). Melanoma antigen gene protein *MAGE-11* regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Mol. Cell Biol.* 25(4): 1238-57.
- 95.- Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* 10(1): 33-39.
- 96.- Karpf AR, Bai S, James SR, Mohler JL, Wilson EM. (2009). Increased expression of androgen receptor coregulator *MAGE- 11* in prostate cancer by DNA hypomethylation and cyclic AMP. *Mol. Cancer Res.* 7(4): 523-35.
- 97.- Monte M, Simomatto M, Peche LY, et al. (2006). *MAGE-A* tumor antigens target *p53* transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(30): 11160-5.

- 98.- Kular RK, Yehiely F, Kotlo Ku, et al. 2009. GAGE, an antiapoptotic protein binds and modulates the expression of nucleophosmin/B23 and interferon regulatory factor 1. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 29(10): 645–55.
- 99.- Mori M, Inoue H, Mimori K, et al. (1996). Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. *Ann Surg.* 224(2): 183-188.
- 100.- Brasseur F, Rimoldi D, Lienard D, et al. (1995). Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 63(3): 375-380.
- 101.- Scarcella DL, Chow CW, Gonzales MF, et al. (1999). Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res.* 5(2): 335-341.
- 102.- Tajima K, Obata Y, Tamaki H, et al. (2003). Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Canc.* 42(1): 23-33.
- 103.- Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, et al. (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res.* 61(18): 6682-6687.
- 104.- Barker PA, Salehi A. (2002). The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res.* 67(6): 705-712.
- 105.- Weon JL, Potts PR. (2015). The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 37: 1–8.
- 106.- Martínez A, Olarte I, Mergold MA, et al. (2007). mRNA expression of MAGE-A3 gene in leukemia cells. *Leukemia Research.* 31(1): 33-37.
- 107.- Luetkens T, Schafhausen P, Uhlich F. (2010). Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research.* 34(12): 1647–1655.
- 108.- Inaoka RJ, Jungbluth AA, Baiocchi O, et al. (2011). An overview of cancer/testis antigens expression in classical Hodgkin's lymphoma (cHL) identifies MAGE-A family and MAGE-C1 as the most frequently expressed antigens in a set of Brazilian cHL patients. *BMC Cancer.* 11(1): 416.
- 109.- de Carvalho F, Vetore AL, Colleoni G. (2012). Cancer/Testis Antigen MAGE-C1/CT7: New Target for Multiple Myeloma Therapy. *Clin Dev Immunol.* 1–7.
- 110.- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, et al. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(5): 1914–1918.
- 111.- Jungbluth AA, Chen YT, Stockert E, et al. (2001). Immunohistochemical analysis of NYESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int. J. Cancer.* 92(6): 856–860.
- 112.- Satie AP, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, et al. (2002). The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. *Lab. Invest.* 82(6): 775–780.
- 113.- Jungbluth AA, Busam KJ, Iversen K, et al. (2001). Meeting abstract. *Mod. Pathol.* 14, 211A.
- 114.- De Smet C, De Backer O, Faraoni I, et al. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(14): 7149–7153.
- 115.- Albert ML, Sauter B, and Bhardwaj N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 392(6671): 86–89.
- 116.- Atanackovic D, Matsuo M, Ritter E, et al. (2003). Monitoring CD4 $\beta$  T cell responses against viral and tumor antigens using T cells as novel target APC. *J. Immunol. Methods.* 278(1-2): 57–66.
- 117.- Fossa A, Berner A, Fossa SD, et al. (2004). NYESO-1 protein expression and humoral immune responses in prostate cancer. *Prostate* 59(4): 440–447.

- 118.- Zeng G, Wang X, Robbins PF, et al. (2001). CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: Association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(7): 3964–3969.
- 119.- Limon J, Mrozek K, Mandahl N, et al. (1991). Cytogenetics of synovial sarcoma: presentation of ten new cases and review of the literature. *Genes Chromosomes and Cancer.* 3(5): 338–345.
- 120.- Clark J, Rocques PQ, Crew AJ, et al. (1994). Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nature Genetics.* 7(4): 502–8.
- 121.- Mendoza I. (2011). Análisis de la expresión de los antígenos testiculares de cáncer en leucemia mieloide crónica. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- 122.- Taylor BJ, Reiman T, Pittman JA, et al. (2005). SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *J Immunother.* 28(6):564–575.
- 123.- Margolin JF, Friedman JR, Meyer W. (1994). Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 91(10): 4509-13.
- 124.- Witzgall R, O'Leary E, Leaf A, Onaldi D, Bonventre JV. (1994). The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proceedings Proc. Natl Acad Sci U S A.* 91(10): 4514–4518.
- 125.- Cronwright G, Le Blanc K, Gotherstr C, et al. (2005). Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Can. Res.* 65(6): 2207–15.
- 126.- Mendoza-Salas I, Olarte-Carrillo I, Miranda-Peralta E, et al. (2015). Frequency of cancer testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Rev Med Hosp Gen Méx.* 79(2): 46-54.
- 127.- van-Duin M, Broyl A, de Knecht Y, et al. (2011). Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy. *Haematologica.* 96(12): 1662-69.
- 128.- Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. (2014). Epigenetic regulation and cancer (Review). *Oncol Rep.* 31(2): 523-532.
- 129.- Klappe K, Hinrichs JW, Kroesen BJ, Sietsma H, Kok JW. (2004). MRP1 and glucosylceramide are coordinately overexpressed and enriched in rafts during multidrug resistance acquisition in colon cancer cells. *Int J Cancer.* 110: 511-522.
- 130.- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, et al. (1999). Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 9: 361–398.
- 131.- Tiwari AK, Sodani K, Dai CL, Ashby CR, Chen ZS. (2011). Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12: 570–594.
- 132.- Ween MP, Armstrong MA, Oehler MK, Ricciardelli C. (2015). The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 96(2): 220-56.
- 133.- Rice AJ, Park A, Pinkett HW. (2014). Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49: 426–437.
- 134.- Kunjachan S, Rychlik B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. (2013). Multidrug resistance: physiological principles and nanomedical solutions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65: 1852–1865.
- 135.- Deeley RG, Westlake C, Cole SP. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* 86: 849–899.



- 136.- Higgins CF, Linton KJ. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 11(10): 918–26.
- 137.- Chen Z, Shi T, Zhang L, et al. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade.
- 138.- Juliano RL, Ling V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 152–162.
- 139.- Melaine N, Liénard MO, Dorval I, et al. (2002). Multidrug resistance genes and P-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, guinea pig, and human. *Biol. Reprod.* 67: 1699-1707.
- 140.- Edwards JE, Alcorn J, Savolainen J, Anderson BD, McNamara PJ (2005). Role of Pglycoprotein in distribution of nelfinavir across the blood-mammary tissue barrier and blood-brain barrier. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49: 1626-1628.
- 141.- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, et al. (2001). Expression of P-glycoprotein in Human Placenta: Relation to Genetic Polymorphism of the Multidrug Resistance (MDR)-1 Gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 297(3): 1137-1147.
- 142.- Sharom FJ.(2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 50: 161–178.
- 143.- Porcelli L, Lemos C, Peters GJ, Paradiso A, Azzariti A. (2009). Intracellular trafficking of MDR transporters and relevance of SNPs. *Curr Top Med Chem.* 9(2): 197–208.
- 144.- Jamroziak K, Mlynarski W, Balcerczak E, et al. (2004). Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol.* 72: 314 – 21.
- 145.- Siegsmond M, Brinkmann U, Schäffeler E, et al. (2002). Association of the P-glycoprotein transporter MDR1 (C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol.* 13: 1847–54.
- 146.- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al. (2007). A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 315: 525–8.
- 147.- Xu J, Liu Y, Yang Y, Bates S, Zhang JT. (2004). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem.* 279: 19781-19789.
- 148.- Mao Q, Unadkat JD. (2015). Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport – an update. *AAPS J.* 17: 65–82.
- 149.- Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y. (2014). Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmgenomics Pers Med.* 7: 53-64.
- 150.- Olarte-Carrillo I, Miranda Peralta E, López-López A, et al. (2010). Expresión del gen de resistencia a multidroga (MDR-1) en pacientes con leucemia aguda mieloblástica. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 73(4): 219-224.
- 151.- Cerón R, Martínez A, Ramos CO, et al. (2015). Detection and analysis of tumour biomarkers to strengthen the diagnosis of acute and chronic leukaemias. *Rev Med Hosp Gen Méx.* 78 (2):78-84.
- 152.- Ramos-Peñafiel CO, Martínez-Murillo C, Santoyo-Sánchez A, et al. (2014). Metformina adicionada a la quimioterapia contra la leucemia linfoblástica aguda. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 52(3): 270-275
- 153.- Chomczynski P, Wilfinger W, Mackey K. (1987). Single-Step Method of Total RNA Isolation by Guanidine-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry.* 162(1): 156-159.
- 154.- Hari PN, Zhang MJ, Roy V, et al (2009). Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia.* 23(8): 1528–34.

- 155.- Zhang L, Wu H, Ku D, et al. (2013). The costimulatory molecule B7H4 promote tumor progression and cell proliferation through translocating into nucleus. *Oncogene*. 32(46): 5347-58.
- 156.- Wu MR, Zhang T, DeMars LR, Sentman CL. (2015). B7H6-specific chimeric antigen receptors lead to tumor elimination and host anti-tumor immunity. *Gene Therapy*. 22(8): 675–684.
- 157.- Weichert W. (2009). HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Letters*. 280(2): 168–176.
- 158.- Robillard N, Jego G, Pellat-Deceunynck C, et al. (1998). CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 4(6): 1521-1526.
- 159.- Brown RD, Pope B, Yuen E, Gibson J, Joshua DE. (1998). The expression of T cell related costimulatory molecules in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 31(3-4): 379-384.
- 160.- Shapiro VS, Mollenauer MN, Weiss A. (2001). Endogenous CD28 expressed on myeloma cells upregulates interleukin-8 production: implications for multiple myeloma progression. *Blood*. 98(1): 187-193.
- 161.- Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. (2000). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res*. 60(23):6763-70.
- 162.- Pope B, Brown RD, Gibson J, Yuen E, Joshua D. (2000). B7-2 – positive myeloma: incidence, clinical characteristics, prognostic significance, and implications for tumor immunotherapy. *Blood*. 96(4), 1274 – 1279.
- 163.- Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, Saudemont A, Quesnel B. (2007). Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*; 110: 296–304.
- 164.- Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, et al. (2010). The PD-1 / PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*; 116:2286–94.
- 165.- Yamashita T, Tamura H, Satoh C, et al. (2009). Functional B7.2 and B7-H2 Molecules on Myeloma Cells Are Associated with a Growth Advantage. *Clin Cancer Res*. 15(3): 770-7.
- 166.- Zhao DD, Lin L, Ge Q, et al. (2013). Relation of B7-H3 molecule expression in multiple myeloma with poor prognosis and bone destruction. *Zhonguo Shi Yan Xue Za Zhi*. 21(3): 637–42.
- 167.- Wang L, Kang FB, Shan BE. (2014). B7-H3-mediated tumor immunology: friend or foe? *Int. J. Cancer*: 134(12): 2764–2771.
- 168.- Jungbluth AA, Ely S, DiLiberto M, et al. (2005). The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood*. 106(1): 167–74.
- 169.- Pabst C, Zustin J, Jacobsen F. (2010). Expression and prognostic relevance of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 in osteolytic lesions of patients with multiple myeloma. *Exp. Mol. Pathol*. 89(2): 175-181.
- 170.- Van-Rhee F, Szmania SM, Zhan F, et al (2005). NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*. 105(10): 3939–44.
- 171.- Atanackovic D, Arfsten J, Cao Y, et al. (2007). Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 109(3): 1103–12.
- 172.- Raaijmakers MH. (2007). ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutic targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 21(10): 2094–102.

- 173.- Grogan TM, Spier CM, Salmon SE et al. (1993). P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: correlations with prior chemotherapy. *Blood* 81(9): 490–5.
- 174.- Dalton WS. (1997). Detection of multidrug resistance gene expression in multiple myeloma. *Leukemia*. 11.:1166–9.
- 175.- O'Connor R, Ooi MG, Meiller J, et al. (2013). The interaction of bortezomib with multidrug transporters: implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71(5): 1357–68.
- 176.- Hawley TS, Riz I, Yang W, et al. (2013). Identification of an ABCB1 (P-glycoprotein)-positive carfilzomib-resistant myeloma subpopulation by the pluripotent stem cell fluorescent dye CDy1. *Am. J. Hematol.* 88(4): 265–72.
- 177.- Lynsenmeyer ME, Jefferson S, Wof M, et al. (1992). Levels of expression of the mdr 1 gene and glutathione-S-transferase genes 1 and 2 and response to chemotherapy in multiple myeloma. *Br. J. Cancer.* 65(3): 471–75.
- 178.- Marie JP. (2001). Drug resistance in hematological malignancies. *Curr. Opin. Oncol.* 13(6): 464–9.
- 179.- Scheffer GL, Maliepaard M, Pijnenborg AC, et al. (2000). Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res.* 60(10): 2589–93.
- 180.- Mogi M, Yang J, Lambert JF, et al. (2003). Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. *J Biol Chem.* 278(40): 39068-75.
- 181.- Mo W, Zhang JT. (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol.* 3(1): 1-27
- 182.- Turner JG, Gump JL, Zhang C, et al. (2006). ABCG: expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood.* 108(12): 3881-9
- 183.- Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, et al. (1985). Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature.* 316(6031): 817-23.
- 184.- Rao VK, Wangsa D, Robey RW, et al. (2005). Characterization of ABCG2 gene amplification manifesting as extrachromosomal DNA in mitoxantrone-selected SF295 human glioblastoma cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 160(2): 126-33.
- 185.- Goldman-Leikin RE, Salwen HR, Herst CV, et al. (1989). Characterization of a novel myeloma cell line. *J Lab Clin Invest.* 113(3): 335–45.
- 186.- Greenstein S, Krett NL, Kurosawa Y. (2003). Characterization of the MM1. Human multiple myeloma (MM) cell lines: A model system to elucidate the characteristics, behavior and signaling of steroid-sensitive and –resistant MM cells. *Exp Hematology.* 31(4): 271-82.
- 187.- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 97(7): 3473-8.
- 188.- Jamrozik K, Balcerzak E, Calka K, et al. (2008). Polymorphisms and haplotypes in the multidrug resistance 1 gene (MDR1/ABCB1) and risk of multiple myeloma. *Leukemia Research.* 33(2): 332-5.
- 189.- Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA. (2007). MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(6): 1172-7.
- 190.- Kato M, Fukuda T, Serretti A. (2007). ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32(2): 398–404.

- 191.- Leal-Ugarte E, Gutiérrez-Angulo M, Macías-Gómez NM, et al. (2008). MDR1 C3435T polymorphism in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia and in healthy individuals. *Hum Biol.* 80(4): 449–55.
- 192.- Drain S, Flannely L, Drake MB, et al. (2011). Multidrug resistance gene expression and ABCB1 SNPs in plasma cell multiple myeloma. *Leukemia Research.* 35(11): 1457–63.
- 193.- Ieiri I. (2012). Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). *Japanese Society for the study of Xenobiotics.* 27(1): 85–105.
- 194.- Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, et al. (2005). Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metab. Dispos.* 33(1): 94–101.
- 195.- Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa, et al. (2009). Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm. Res.* 26(2): 469-79.
- 196.- Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. (2008). Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood.* 111(5): 2516-2520.

## 12. ANEXOS

### 12.1 ABREVIATURAS

<b>ABC:</b>	<i>ATP-Binding Cassette</i> – Cassette de union a ATP
<b>AMO:</b>	Aspirado de Médula Ósea
<b>APC:</b>	<i>Antigen Presenting Cell</i> – Célula presentadora de antígeno
<b>ATP:</b>	Adenosin Trifosfato
<b>B2M:</b>	Beta-2 microglobulina
<b>BCR:</b>	<i>B cell receptor</i> - Receptor de célula B
<b>BCRP:</b>	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i> – Proteína de Resistencia de cáncer de mama
<b>CD:</b>	<i>Cluster Differentiation</i> – Cluster de diferenciación
<b>CRAB:</b>	<i>Calcium increase, Renal failure, Anemia, Bone lesion</i> – Aumento de calcio sérico, falla renal, anemia, lesiones óseas
<b>CTA/ATC:</b>	<i>Cancer Testis Antigen</i> – Antígenos Testiculares de Cáncer
<b>CTLA-4:</b>	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i> – Antígeno 4 de linfocito T citotóxico
<b>DHL:</b>	Lactato Deshidrogenasa
<b>DNA:</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTP:</b>	desoxi-Nucleótido Tri-Fosfato
<b>DS:</b>	Durie- Salmon
<b>Escaneo CT:</b>	Tomografía Computarizada
<b>GAPDH:</b>	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i> - Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GPI:</b>	Glicofosfatidil Inositol
<b>HGM:</b>	Hospital General de México
<b>ICOS:</b>	<i>Inducible Co-stimulation molecule</i> – molécula de co-estimulación inducida
<b>ICOS-L:</b>	Ligando de ICOS
<b>IFN:</b>	Interferón
<b>Ig:</b>	Inmunoglobulina
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>IMiDS:</b>	<i>Immunomodulatory Drugs</i> - Fármacos Inmunomoduladores
<b>IMWG:</b>	<i>International Myeloma Working Group</i> – Grupo Internacional de trabajo en Mieloma
<b>ISS:</b>	<i>International Staging System</i> – Sistema de Estratificación internacional
<b>ITAM:</b>	<i>Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif</i> – Motivo de activación en inmunoreceptor de tirosina
<b>ITIM:</b>	<i>Immunoreceptor Tyrosine Inhibiting Motif</i> – Motivo de inhibición en inmunoreceptor de tirosina
<b>ITSM:</b>	<i>Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif</i> – Motivo de <i>switch</i> en inmunoreceptor de tirosina
<b>LLA:</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>LMA:</b>	Leucemia Mieloblástica Aguda
<b>LMC:</b>	Leucemia Mielocítica Crónica
<b>LNH:</b>	Linfoma No Hodgkin
<b>MAGE:</b>	<i>Melanoma Antigen</i> – Antígeno de melanoma
<b>MDR:</b>	Multi-Drogo Resistencia
<b>MGUS:</b>	<i>Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance</i> – Gamapatía Monoclonal de Significado Incierto
<b>MHC:</b>	<i>Major Hystocompatibility Complex</i> – Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>miRNA:</b>	micro RNA
<b>MM:</b>	Mieloma Múltiple
<b>MMLV:</b>	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> – Virus de la leucemia murina Moloney
<b>MRI:</b>	<i>Magnetic Resonance Image</i> - Imagen por Resonancia Magnética
<b>NCR:</b>	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i> – Receptores de citotoxicidad natural
<b>NFW:</b>	<i>Nuclease-Free Water</i> – Agua libre de nucleasas
<b>PBS:</b>	<i>Phosphate Buffer Solution</i> – Solución buffer de fosfatos
<b>PD-1:</b>	<i>Programmed Death 1</i> – Molécula de Muerte programada 1
<b>PD-L1:</b>	<i>Programmed Death 1 Ligand</i> – ligando de PD-1
<b>PET-CT:</b>	<i>Positron Emission Tomography/Computed Tomography</i> - Tomografía Computarizada por emisión de Positrones
<b>P-gp:</b>	Glucoproteína P
<b>qRT-PCR:</b>	<i>quantitative RT-PCR</i> – RT-PCR cuantitativa /en tiempo real
<b>RNA:</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> / Ácido Ribonucleico
<b>RT-PCR:</b>	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> – Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa

<b>V, D, J,:</b>	<i>Variable, Diversity, Joining</i> - segmentos Variables, de Diversidad y de unión
<b>SNP:</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de nucleótido único
<b>TAE:</b>	Buffer Tris/Ácido acético/EDTA
<b>TCR:</b>	<i>T-Cell Receptor</i> – Receptor de célula T
<b>TE:</b>	Buffer Tris/EDTA
<b>TNF:</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> – Factor de necrosis tumoral

## 12.2 SECUENCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS

Gen	Oligo	Secuencia	Tm	Tamaño productos	
<b>GAPDH</b>	GAPDH Forward	CGGGAAGCTTGTCATCAATGG	55°C	221 pb	
	GAPDH Reverse	CATGGTTCACACCCATGACG			
<b>B2M</b>	B2M Forward	CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC		394 pb	
	B2M Reverse	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT			
<b>B7-1</b>	B7.1 Forward	CCTCTCCATTGTGATCCTGG		566 pb	
	B7.1 Reverse	GGCGTACACTTTCCTTCTC			
<b>B7-2</b>	B7.2 Forward	GACCTGCTCATCTATACAC		464 pb	
	B7.2 Reverse	CTTCATCAGATCTTTCAGG			
<b>B7-H1</b>	B7-H1 Forward	ACTGGCATTGCTGAACGCA		57°C	301 pb
	B7-H1 Reverse	TACACCCCTGCATCCTGCAAT			
<b>B7-H2</b>	B7-H2 Forward	GCAAACAGTGAGTCGAAAACC	60°C	102 pb	
	B7-H2 Reverse	GGTGACATCAGGGCTCGGT			
<b>B7-H3</b>	B7-H3 Forward	AGCACTGTGGTTCTGCCTCACA	53°C	172 pb	
	B7-H3 Reverse	CACCAGCTGTTTGGTATCTGTCTCAG			
<b>B7-H4</b>	B7-H4 Forward	TTAGGCTTGGTCCATGAGTTCA	62°C	143 pb	
	B7-H4 Reverse	TCTGTGAGTTGCACGTTTTTCAG			
<b>B7-H6</b>	B7-H6 Forward	GACCCTGGGACTGTCTACCA	55°C	143 pb	
	B7-H6 Reverse	ATAGGCCACCAATGAATGGA			
<b>SSX-1</b>	SSX Forward	AAGCCAGCAGAGGAGGAAAA	60°C	114 pb	
	SSx Reverse	TATTTGCTTTTCTGGGGGG			
<b>MAGE-A3</b>	A3 Forward	TGGAGGACCAGAGGCCCC		725 pb	
	A3 Reverse	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC			
<b>MAGE-C1</b>	C1 Forward	GACGAGGATCGTCTCAGGTCA		631 pb	
	C1 Reverse	ACATCCTCACCTCAGGAGGG			
<b>NY-ESO1</b>	NY Forward	AAAAACACGGGCAGAAAGC		302 pb	
	NY Reverse	GCTTCAGGGCTGAATGGAT			
<b>ABC-A3</b>	ABC A3 Forward	TGGACCCCTCCGACGGCATT		129 pb	
	ABC A3 Reverse	CGCCAGCTGTATGCGGCC			
<b>ABC-G2</b>	ABC G2 Forward	CACCTATTGGCCTCAGGAA		199 pb	
	ABC G2 Reverse	CCTGCTTGGAAAGGCTCTATG			
<b>ABC-B1</b>	ABC B1 Forward	GCTCTGACTATGCCAAAGC		200 pb	
	ABC B1 Reverse	CTTCAGCTCCAGGCTCAGT			
<b>ABC-C1</b>	ABC C1 Forward	CTGGGCTTATTXCGGATCAA		162 pb	
	ABC C1 Reverse	TGAATGGGTCCAGGTTTCATT			



AGRUPACIÓN MEXICANA  
**PARA EL ESTUDIO  
DE LA HEMATOLOGÍA**

## Mesa Directiva 2015-2017

† Dr. Luis Sánchez Medal Fundador	Dr. J. Ramón Rivas Llamas Presidente	Dra. Adolfin Bergés García Vicepresidente
	Dra. Nidia P. Zapata Canto Secretaria	Dr. Ignacio J. Aguirre Aguirre Tesorero
	Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado Vocal de Act. Académicas	Dr. Jorge Duque Rodríguez Vocal de Membresía

Tiene el honor de entregar la presente

### CONSTANCIA

a:

De la Cruz-Rosas A, Martínez-Tovar A, Mendoza-Salas I, García-Laguna AI, Cerón-Maldonado R, Miranda-Peralta EI, Rozen-Fuller E, Collazo-Jaloma J, Kassack-Ipiña JJ, Ramos-Peñañiel CO, Olarte-Carrillo I. Hospital General de México, México DF.

Por su participación con el trabajo en presentación Oral:

### **FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS DE LA FAMILIA B7 EN MIELOMA MÚLTIPLE.**

Presentado en el "LVII" Congreso Anual de la **Agrupación**, evento realizado del 27 de abril al 1 de mayo de 2016, en la Ciudad de Mérida, Yucatán.

**Ramón Rivas Llamas**  
Presidente

**Dra. Nidia P.- Zapata Canto**  
Secretaria

**Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado**  
Vocal de Act. Científicas





AGRUPACIÓN MEXICANA  
**PARA EL ESTUDIO  
DE LA HEMATOLOGÍA**

## Mesa Directiva 2015-2017

† Dr. Luis Sánchez Medal Fundador	Dr. J. Ramón Rivas Llamas Presidente	Dra. Adolfin Bergés García Vicepresidente
	Dra. Nidia P. Zapata Canto Secretaria	Dr. Ignacio J. Aguirre Aguirre Tesorero
	Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado Vocal de Act. Académicas	Dr. Jorge Duque Rodríguez Vocal de Membresía

Tiene el honor de entregar la presente

### CONSTANCIA

a:

De la Cruz-Rosas A, Martínez-Tovar A, Mendoza-Salas I, García-Laguna AI, Cerón-Maldonado R, Miranda-Peralta EI, Rozen-Fuller E, Collazo-Jaloma J, Kassack-Ipiña JJ, Ramos-Peñañiel CO, Olarte-Carrillo I. 1 Hospital General de México, México DF.

Por su participación con el trabajo en presentación en Cartel:

### **"FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS C3435T Y 421T DE LOS GENES ABC-B1 Y ABC-G2 EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE"**

Presentado en el "LVII" Congreso Anual de la **Agrupación**, evento realizado del 27 de abril al 1 de mayo de 2016, en la Ciudad de Mérida, Yucatán.

**Ramón Rivas Llamas**  
Presidente

**Dra. Nidia P.- Zapata Canto**  
Secretaria

**Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado**  
Vocal de Act. Científicas





REVISTA MÉDICA DEL  
**HOSPITAL GENERAL**  
DE MÉXICO

[www.elsevier.es/hgmx](http://www.elsevier.es/hgmx)



## ORIGINAL ARTICLE

## Expression of genes MAGE-A3 MAGE-C1, NY-ESO-1 and SSX1 in patients with multiple myeloma at the General Hospital of Mexico

A. De la Cruz-Rosas<sup>a</sup>, A. Martínez-Tovar<sup>b</sup>, C. Ramos-Peñafiel<sup>c</sup>, R. Cerón-Maldonado<sup>a</sup>,  
A. García-Laguna<sup>c</sup>, I. Mendoza-Salas<sup>c</sup>, E. Miranda-Peralta<sup>b</sup>, J. Collazo-Jaloma<sup>c</sup>,  
I. Olarte-Carrillo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Hospital General de México, U-204, Haematology Research Laboratory, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Hospital General de México, Onco-Haematology Department U 111-D, Mexico City, Mexico

Received 27 April 2016; accepted 9 June 2016

**KEYWORDS**

Cancer/testis  
antigens;  
Multiple myeloma;  
RT-PCR

**Abstract** Multiple myeloma is the most common form of plasma cell cancer. It is a disease of elderly people, with a mean age at diagnosis of 65–70, and represents 10–15% of all blood cancers. It is a heterogeneous disease associated with intrinsic factors and disease characteristics such as genetics, which dictate the clinical course of the disease. Multiple myeloma involves several abnormalities in the IgH variable region. The first oncogenic events in this cancer occur in the germinal centre, apparently during isotype switching and somatic hypermutation of B cells. While these primary mutations have been found in myeloma cells, these events alone are not enough to cause pathogenesis. However, few genes have been identified in this type of disease. The expression of cancer/testis antigens (CTAs) is limited to testis tissue and various types of cancer, in which they are considered as a tumour marker as they are associated with the prognosis and monitoring of the disease, and are involved with overall survival and event-free disease. In view of the above, the objective of this study was to analyse the expression of CTAs (MAGE-A3 and -C1, NY-ESO and SSX1) by RT-PCR in patients diagnosed with *de novo* multiple myeloma admitted to the Haematology Department of Hospital General de México. Our results proved that there is presence of these genes and that they may be involved in resistance, progression and survival.

© 2016 Sociedad Médica del Hospital General de México. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author at: U-204 Laboratorio de Investigación de Hematología U-204, Mexico. Tel.: +52 5527892000x1609.  
E-mail address: [irmaolartec@yahoo.com](mailto:irmaolartec@yahoo.com) (I. Olarte-Carrillo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.06.008>

0185-1063/© 2016 Sociedad Médica del Hospital General de México. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: De la Cruz-Rosas A, et al. Expression of genes MAGE-A3 MAGE-C1, NY-ESO-1 and SSX1 in patients with multiple myeloma at the General Hospital of Mexico. Rev Med Hosp Gen Méx. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.06.008>



REVISTA MÉDICA DEL  
**HOSPITAL GENERAL**  
DE MÉXICO

[www.elsevier.es/hgmx](http://www.elsevier.es/hgmx)



## ORIGINAL ARTICLE

## Pattern of differential expression of costimulatory molecules in myeloma cell line MM1.R

A. De la Cruz-Rosas<sup>a</sup>, A. Martínez-Tovar<sup>a</sup>, C. Ramos-Peñafiel<sup>b</sup>,  
J. Collazo-Jaloma<sup>c</sup>, I. Olarte-Carrillo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Biology Laboratory U-204, Department of Haematology, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Cancer Unit U-111, Department of Haematology, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Haematology Laboratory U-204, Department of Haematology, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Mexico City, Mexico

Received 20 July 2016; accepted 11 August 2016

**KEYWORDS**

Multiple myeloma;  
MM1.R;  
Costimulatory  
molecules;  
B7;  
PCR

**Abstract** T cells constantly recognise and eliminate circulating tumour cells. They require two signals in order to be activated: antigen presentation via TCR, and costimulatory interaction with different surface molecules of the B7 family, which may either enhance or attenuate immune response. In several cancers these molecules are deregulated, thereby promoting immune escape and the settlement or migration of cancer cells. In multiple myeloma, the expression of B7 co-inhibitory molecules and their relationship to disease progression have been identified. The MM1.R cell line is a useful cellular model for studying the progression of this disease, and therefore an analysis of the pattern of expression in this cell line helps to cast light on the immune status of this disease. Using a real-time PCR (quantitative RT-PCR) assay, we found that the main molecules expressed were those with an inhibitory function (B7-H1, B7-H3 and B7-H4), which suggests a high level of immune inhibition by these cells.

© 2016 Sociedad Médica del Hospital General de México. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**PALABRAS CLAVE**

Mieloma múltiple;  
MM1.R;  
Coestimuladoras;  
B7;  
PCR

**Patrón diferencial de expresión de moléculas coestimuladoras en la línea celular de mieloma MM1.R**

**Resumen** El reconocimiento y eliminación constante de células tumorales circulantes se logra principalmente mediante la acción de los linfocitos T, células cuya activación requiere de dos señales para poder llevarse a cabo: la presentación del antígeno a través del TCR y una interacción co-estimuladora liderada por distintas moléculas de superficie de la familia B7 que pueden

\* Corresponding author at: Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Dr. Balmis 148, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06726 Mexico City, Mexico.

E-mail address: [irmaolartec@yahoo.com](mailto:irmaolartec@yahoo.com) (I. Olarte-Carrillo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.08.005>

0185-1063/© 2016 Sociedad Médica del Hospital General de México. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: De la Cruz-Rosas A, et al. Pattern of differential expression of costimulatory molecules in myeloma cell line MM1.R. Rev Med Hosp Gen Méx. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.08.005>