



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Efecto de la expresión del gen de resistencia a drogas ABC B1 sobre la
respuesta al tratamiento en pacientes con Mieloma Múltiple”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

PRESENTA:

CRISTINA ELIZABETH MADERA MALDONADO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:
DR. CHRISTIAN OMAR RAMOS
DRA. IRMA OLARTE CARRILLO

COTUTOR(A) DE TESIS:
DR. ADOLFO MARTINEZ TOVAR

JEFE DE SERVICIO:
DR. JUAN COLLAZO JALOMA

MÉXICO, CD. MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Efecto de la expresión del gen de resistencia a drogas ABC B1 sobre la
respuesta al tratamiento en pacientes con Mieloma Múltiple”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

PRESENTA:

CRISTINA ELIZABETH MADERA MALDONADO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:
DR. CHRISTIAN OMAR RAMOS
DRA. IRMA OLARTE CARRILLO

COTUTOR(A) DE TESIS:
DR. ADOLFO MARTINEZ TOVAR

DR. JUAN COLLAZO JALOMA
JEFE DE SERVICIO

**ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL GENERAL DE
MÉXICO "DR.EDUARDO LICEAGA" *DI/08/204/04/017 Y DI/09/204/03/11***

Dedicatoria:

A Dios, a mi Padre, Madre, Hermanos, Tutor, Amigos y a todas aquellas personas que durante este camino por la Cd de México, demostraron lealtad, amor.

El hombre se autorealiza en la misma medida
en que se compromete al cumplimiento del sentido de su vida.
Viktor Frankl

Agradecimientos:

A Dios, quien siempre ha demostrado estar conmigo, cuando mis miedos se levantan.

A ti Padre, porque eras recto y sensato, porque me enseñabas lo que aún no sabía, porque me esperabas con una mano fuerte y dulce aun en mis fracasos, porque mis logros eran tus logros, porque decidiste irte para quedarte para siempre.

A mi Madre, por ser signo de fortaleza, resiliencia, lealtad, perseverancia y amor. Por ser siempre la brújula que guía mis pasos, por creer en mí, incluso más allá de lo que yo misma lo hago.

A mis hermanos, por regalarme la mejor infancia, adolescencia y juventud. Porque a diario tienen una palabra de ánimo y valor.

A mis amigos, por enseñarme que las risas, el dolor y las horas de trabajo compartidas, siempre se sienten mejor. Por demostrarme que a pesar del tiempo, la distancia, siempre siguieron soñando y creyendo.

A mis maestros, por demostrarme que el hombre se autorealiza y trasciende en la misma medida en la que se compromete al cumplimiento de metas desinteresadas.

A todas esas personas que tuve la oportunidad de conocer en este camino, e imprimieron de manera directa o indirecta las ganas de crear, crecer. Por cada una de esas tardes de pláticas interminables, café, sabores, olores, cine, caminatas sin rumbo, por las risas y lágrimas. GRACIAS

TABLA DE CONTENIDO

Portada	
Dedicatoria.....	5
Resumen	8.
Antecedentes.....	9
Planteamiento del problema.....	16
Justificación.....	17
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Método.....	22
Resultados.....	24
Conclusión.....	28
literatura citada.....	29

RESUMEN ESTRUCTURADO

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia caracterizada por la proliferación de células plasmáticas de tipo clonal (mayor a 10%) que compromete la funcionalidad de la médula ósea y presenta datos directos de afección a órgano blanco como evento definitorio de mieloma. Representa el 1% de los tumores maligno, un 10 al 15% de las neoplasias hematológicas, por detrás del Linfoma y las Leucemias. Incidencia entre 4 -5 por cada 100,000 habitantes/año. Desafortunadamente la resistencia y el patrón de sensibilidad a la quimioterapia son factores independientes que contribuyen a la refractariedad o a la resistencia a diversos fármacos, condicionando falla terapéutica temprana y muerte del paciente. Dentro de estos se encuentran los genes de la familia ABC, que codifican a una bomba de flujo conocida como glicoproteína-P cuyo sustrato son la mayoría de las quimioterapias y blancos moleculares. Son diversos los mecanismos que se encuentran implicados en la resistencia a las diferentes quimioterapias; pero tal vez la más conocida es la expresión de los genes de resistencia a drogas (ABCB1) cuya finalidad es la expresión de bombas de flujo en las membranas celulares detoxificando a las células e impidiendo la activación de los mecanismos de apoptosis. Se ha demostrado que confieren resistencia a través de la expulsión del fármaco. Tanto la sobreexpresión de los genes ABC B1 y ABCG2 se han asociado a una pobre respuesta terapéutica en diversos tipos de tumores. Los inhibidores de proteosoma y esteroides, son considerados actualmente la principal línea de tratamiento, y en algunos estudios se han demostrado ser sustrato de dichos mecanismos. Debido a esto la identificación de la expresión de estos genes puede contribuir con la individualización de los diferentes esquemas terapéuticos.

OBJETIVO: Detectar la expresión del gen de Resistencia a drogas (ABCB1) sobre la respuesta al tratamiento en los pacientes con Mieloma múltiple.

METODOLOGÍA: Estudio observacional, prospectivo, analítico. Se analizará la expresión del gen ABCB1 a través de la extracción de células mononucleares y posteriormente se aislará RNA y mediante la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa se identificará la cantidad de transcrito del gen. Se utilizará el software estadístico SPSS 20.0- Para el análisis de supervivencia se utilizarán curvas de Kaplan-Meier, considerándose significativa la diferencia entre los grupos de expresión un valor ≤ 0.05 . Se utilizará un análisis de regresión de Cox para evaluar la asociación de las diferentes variables sobre la supervivencia.

Palabras clave: Mieloma Múltiple, ABC B1, Esteroides, Inmunomoduladores

1. ANTECEDENTES

1.1 DEFINICIÓN:

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia hematológica, que pertenece al grupo de gamapatías monoclonales; caracterizada por proliferación clonal de células plasmáticas (mayor a 10%) en medula ósea o plasmocitoma extramedular. Esta clona genera un incremento de una inmunoglobulina clonal considerada como componente M presente tanto en suero como en orina (proteína M > 3 mg/dl). El diagnóstico de Mieloma Múltiple se basa en: ratio de cadenas ligeras libres en suero >100 mg/dl, lesión focal ósea en resonancia magnética, hipercalcemia (calcio >11mg/dl), insuficiencia renal (aclaramiento de creatinina <40ml/min o cr sérica >2mm/dl), anemia (<10g/dl), células plasmáticas en suero (>60%).(1)

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Representa 1% de los tumores malignos y 10 a 15% de las neoplasias hematológicas. (1). Incidencia a nivel mundial anual, 4 a 5 por cada 1

00,000 habitantes por año. Mayor incidencia en afroamericanos. (2). El 90% se presenta en mayores de 50 años, edad media de 65-75 años. Predominio en hombres, relación 1.4:1 (5) El tipo IgG representa el 50% de los casos, (2). En Latinoamérica edad promedio 60 años, relación para el sexo homogénea 1.1:1 H: M, ISS al diagnóstico avanzado.(3,4). En México; menos frecuente en mestizos mexicanos, entre 4.2% a 7.7% de todas las enfermedades hematológicas (5), predominio en mujeres. La Clínica Mayo estima que la supervivencia media es de 8 años, gracias a nuevos fármacos y trasplante autólogo. Sin embargo, más de una décima parte de los pacientes, sigue muriendo de manera temprana debido a múltiples factores de riesgo, dentro de los que se encuentran procesos infecciosos, lesión renal y falla terapéutica primaria temprana. (6-7).

El MM va precedido de una etapa premaligna asintomática denominada gamapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). MGUS está presente en aproximadamente el 3-4% de la población mayor de 50 años. El 80% del mieloma múltiple se origina de MGUS no IgM y 15 % de cadenas ligeras. La tasa de progresión de MGUS a MM es de 0, 5-1% por año. El mieloma múltiple latente (SMOLDERING) etapa clínica intermedia entre MGUS y MM, presenta progresión de 10% por año a enfermedad maligna en los primeros 5 años. Motivo por el cual, cada vez más las gamapatías serán consideradas enfermedades con alto grado de incidencia y prevalencia entre la población adulta.

1.3 CLASIFICACIÓN DE GAMAPATIAS MONOCLONALES.

Nombre	Características	% de transformación a MM
Gamapatía monoclonal no IgM de significado incierto.	Proteína monoclonal sérica (tipo no IgM) <30 g / L . Células plasmáticas de médula ósea clonal <10% * Ausencia de daño a órgano blanco	1% por año Mieloma múltiple
Plasmocitoma solitario	Lesión solitaria de hueso por Resonancia magnética (TAC) o tejido blando comprobada por biopsia con evidencia de células plasmáticas clonales. Médula ósea normal sin evidencia de células plasmáticas clonales. Ausencia de daño de órganos	Alrededor del 10% en 3 años
Amiloidosis Sistémica	Presencia de síndrome sistémico relacionado con amiloide y tinción positiva con rojo congo (Riñón, hígado, corazón, tracto gastrointestinal, nervio periférico, médula ósea) amiloide relacionado con la cadena ligera establecido por examen directo espectrometría de masas, o inmunoelectromicroscopía, y trastorno proliferativo monoclonal	
Mieloma Latente (Smoldering)	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína monoclonal sérica (IgG o IgA) ≥ 30 g / L o proteína monoclonal urinaria ≥ 500 mg por 24 h y / o células plasmáticas de médula ósea clónicas 10-60% • Ausencia de eventos definitorios de mieloma o amiloidosis 	10% por año, los primeros 5 años

1.3 FISIOPATOLOGÍA:

La transformación de un linfocito normal en una célula B mielomatosa requiere de dos tipos de eventos: primarios y secundarios: (9)

Primarias: yuxtaposición de oncogén y gen de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, que actúa como potenciador (“enhancer”). Estas translocaciones se originan durante el proceso de recombinación del DNA, en el cambio de isotipo de la IgH, incluyen tres grandes grupos:

1) Translocaciones en ciclinas: D1 (11q23), D3 (6q21) y D2 (12p13), en el 20-25% de los MM.

2) Involucran a dos genes codificados en 4p16: MMSET y FGFR3 presentes en el 15% de MM.

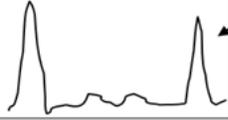
3) factores de transcripción: C-maf (en 16q23) y maf-B (en 20q11) en el 10% de MM.

Secundarios: existe inestabilidad cariotípica, deleciones Rb, mutaciones génicas (Ras), o traslocaciones que involucran c-mycm; siendo está responsable de la progresión tumoral.

El micro medioambiente de la MO juega un papel fundamental en la patogénesis y resistencia farmacológica. Formado por proteínas de la matriz extracelular y poblaciones celulares: estromales, endoteliales, osteoblastos, osteoclastos y linfocitos (10-11). La adhesión de las células de mieloma al estroma está mediada por la unión de varios tipos de receptores de membrana: CD44, CD54/ICAM-1 CD56/VCAM-1 y CD 138, con sus ligandos: LFA-1, MUC-, VLA-5 y VLA-4. La adhesión va acompañada de la expresión de metaloproteinasas de la matriz, como MMP-9 que contribuye a la resorción ósea y a la movilidad de la célula mielomatosa (13). Esta unión induce resistencia a fármacos llamado CAM-DR a través de distintos mecanismos: Parada de ciclo celular en G1(12) Inhibición de apoptosis (12,3) y protección contra el daño al ADN por fármacos, reduciendo la actividad topoisomerasa (12). La unión de VLA-4 a la fibronectina induce la sobreexpresión de 53 genes, 11 de los cuales son regulados por NF-κB (Nuclear Factor-Kappa B) (12). Traduciendo clínicamente con inmunocompetencia, desregulación ósea, aumento de la osteólisis, Inhibición de la apoptosis y tasa de proliferación acelerada en Medula ósea.(14).

1.4 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

QS:	hiperuricemia 50%, daño renal (TFG <40, cr > 2 mg/dl) 30% , hiperproteínemia con hipoalbuminemia 15%, Hipercalcemia (>11 mg/dl) 20%
CITOMETRIA HEMATICA	Anemia normocítica normocrómica 67%
ASPIRADO DE MEDULA OSEA	Presencia > de 10% de células plasmáticas clónales. La clonalidad de las células plasmáticas de la médula ósea debe establecerse mediante la demostración de la restricción de la cadena ligera κ / λ por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, o mediante la demostración de fenotipos de clonalidad por citometría de flujo, o por estudios de reordenamiento del gen de inmunoglobulina. Inmunohistoquímica CD19, CD138, CD38, CD56 aberrante. Asociada en 67%.
RESONANCIA MAGNETICA/ TAC DE BAJA INTENSIDAD	detección de lesiones líticas mayor a 5 mm, así como compresión medular

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS	Electroforesis de Proteínas Séricas	Inmunofenotipo
	 <p>Alb α1 α2 β1 β2 γ</p>	<p>Marcadores Positivos: CD79a, CD138, CD38 Sin expresión (ó raro) de CD19</p> <p>Marcadores aberrantes: CD10, CD20, CD52, CD56 y CD117 (asociados a mal pronóstico)</p>
<p>Se considera de vital importancia, para diagnóstico; identificándose pico monoclonal en región gamma. Además, ayuda a valorar respuesta al tratamiento, (1)</p>		

1.6 CLASIFICACIÓN DE RIESGO CITOGENETICO:

Riesgo desfavorable: aneuploidía, t(14:16),t(14:20) por FISH, delección 17p13 por FISH,

Pronóstico favorable: hiperdiploidia, t (11:14),t(6:14) por FISH

Riesgo intermedio: t (4:14), ganancia (1q), delección del 13, hipodiploidia (1)

1.7 TRATAMIENTO

El tratamiento del MM está determinado fundamentalmente por la edad y por el estado general del paciente. Casi todos los pacientes que sobreviven al tratamiento inicial eventualmente recaerán y requerirán más terapia. (15).

Pacientes elegibles para trasplante: edad <77 años, bilirrubina directa < 2 mg/dl, ECOG 1-2 , estado funcional NYHA I y II.	<ul style="list-style-type: none"> Alta dosis de quimioterapia seguida de uno o dos TCH autólogos (estrategia de trasplante temprano) Terapia continua, generalmente con el mismo régimen de inducción, que reserva HCT autólogo hasta la primera recaída (estrategia de trasplante tardío) Alta dosis de quimioterapia seguida de alotrasplante de HCT <p>Régimen preferido: Bortezomib/lenalidomida/dexametasona (categoría 1) Bortezomib/ciclofosfamida/dexametasona</p>
Pacientes no elegibles para trasplante:	<p>INDUCCIÓN:</p> <p>DOSIS BAJAS: lenalidomida + dexametasona tratamiento hasta la progresión a menos de que exista toxicidad.</p> <p>DOSIS ALTAS: bortezomib, lenalidomida, dexametasona (VRd), bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona (VCd) y bortezomib, melfalán, prednisona (VMP) 12-18 meses hasta que el paciente alcanza una fase de meseta, que se define como un nivel</p>

	estable de proteína M en el suero y la orina y no hay evidencia de progresión del mieloma.
Terapia de mantenimiento	lenalidomida + bortezomib; pacientes no candidatos a trasplante. Sin embargo, sabemos que todos los pacientes eventualmente presentaran una recaída.(15) .

RESPUESTA AL TRATAMIENTO

RESPUESTA COMPLETA RIGUROSA:	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de células clónales en la biopsia de médula ósea por inmunohistoquímica • Relación k / l <4: 1
RESPUESTA COMPLETA:	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunofijación negativa en suero y orina; • Desaparición de cualquier plasmacitoma de tejido blando y <5% de células plasmáticas en aspirados de médula ósea
MUY BUENA RESPUESTA PARCIAL:	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína M en suero y orina detectable por inmunofijación, pero no en electroforesis • Reducción > 90% de la proteína M sérica y/o • Proteína M en orina <100 mg por 24 h.
RESPUESTA PARCIAL;	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción mayor al 50% de la proteína M sérica, más reducción mayor al 90% de proteína M urinaria en orina de 24 hora, • Desaparición del 50% en la diferencia entre la relación de los niveles de cadenas ligeras libres. • Reducción > 50% en las células plasmáticas (siempre que el porcentaje de células plasmáticas de médula ósea sea > 30%) Reducción > 50% en el tamaño de los plasmacitomas de los tejidos blandos.
RESPUESTA MINIMA	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción > 25% pero <49% de la proteína M sérica. • Reducción de 50-89% de proteína M en orina de 24 . • Reducción de 25% - 49% en dimensiones de plasmacitoma de tejido blando.
ENFERMEDAD ESTABLE	No cumple los criterios para ninguna de las anteriores

ENFERMEDAD PROGRESIVA	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento del 25% de proteína M, del valor de respuesta más bajo confirmado. • Proteína M sérica (aumento absoluto debe ser > 0,5 g / dl) • Relación de niveles de cadenas ligeras libres (> 10 mg / dl). • Aumento absoluto de células plasmáticas > 10%) • Aumento en el diámetro más largo de una lesión anterior >1 cm.
--------------------------	--

1.7.1 INMUNOMODULADORES EN MIELOMA MULTIPLE.

La talidomida es un derivado del ácido glutámico se caracteriza por propiedades antiangiogénicas e inmunomoduladoras; regula la expresión de moléculas de adhesión, la actividad de NK-kB e inhibe la producción de TNF- α , estimula la proliferación de células T citotóxicas, favorece el bloqueo del ciclo celular en fase G1 e induce apoptosis (9). El hecho de que la talidomida no sea una fármaco citotóxico, y su potencial sinergismo “in vitro” con otros agentes (especialmente dexametasona) ha motivado el diseño de múltiples combinaciones. Se ha propuesto que la remodelación de la cromatina está involucrada en el control de la expresión del gen *ABCB1*. En un estudio se observó que la talidomida podría modular dichos cambios en células resistentes a esteroides, induciendo la aparición de una cromatina homogénea y descondensada.(9,10,11,12)

1.7.2 DEXAMETASONA EN MIELOMA MULTIPLE

La Dexametasona ha sido tradicionalmente el fármaco más utilizado en el tratamiento del MM (13), pero a menudo las células plasmáticas tumorales adquieren resistencia a esta terapia (14). La Dexametasona induce la activación de la Caspasa-9 a través de la liberación de Smac/Diablo, pero no provoca la liberación de Citocromo-C (15). El tratamiento con dexametasona induce un aumento temprano y transitorio de los receptores de IL-6 (IL-6R)(16) de la célula plasmática, estimulando el crecimiento de éstas y confiriendo resistencia . La dexametasona es un inductor eficaz del transportador de eflujo de fármaco, al ser sustrato de genes ABC B1 a través de la glucoproteína P. se convierte en un sustrato importante, para generación de multidrogoresistencia.(16).

1.7.3. BORTEZOMIB

Hace una década, bortezomib se convirtió en el primer miembro de la nueva clase de quimioterapia de inhibidores del proteasoma. Demostrando actividad antineoplásica significativa por lo que se ha convertido en una parte casi indispensable del régimen terapéutico estándar de oro, mejorando significativamente los resultados del tratamiento de los pacientes afectados. Sin embargo, su aplicabilidad clínica se ve considerablemente obstaculizada por la toxicidad limitante de la dosis y por

la resistencia primaria o secundaria. Siendo esta resistencia mediada por la expresión mejorada del transportador de eflujo. Demostrándose que el bortezomib es un sustrato de la bien conocida glicoproteína P (P-gp) transportadora de casete de unión a ATP (ABC); que induce la expresión de genes transportadores similares en los respectivos tejidos diana o células conduciendo finalmente a la resistencia a fármacos.(2)

2. MECANISMOS GENERALES DE RESISTENCIA A DROGAS

El objetivo de todo tratamiento contra el cáncer es la erradicación de las células tumorales. La resistencia a drogas continúa siendo uno de los mayores problemas en el tratamiento de las neoplasias, ya que al final, la mayoría de los pacientes morirán por progresión de su enfermedad, al ser ésta refractaria a los tratamientos administrados. En la actualidad, en la resistencia a fármacos (MDR) se han identificado diferentes mecanismos (21). Destacando:

- Mecanismos celulares de transporte y eliminación de fármacos
- Mecanismos de inactivación de drogas a través de vías metabólicas.
- Señalización intracelular de receptores de tirosina kinasa (RTK).
- Resistencia farmacológica mediada por el citoesqueleto
- Resistencia farmacológica mediada por el bloqueo de las señales apoptóticas.
- Resistencia farmacológica mediada por mecanismo de reparación del ADN.

La familia MDR pertenece a una superfamilia de 49 genes humanos ABC (adenosine triphosphate (ATP) – Binding Cassette) que están clasificados en 8 subfamilias que van de ABC-A hasta ABC-G y ANSA (arsenite and antimonite transporter) en base al grado de homología entre sus secuencias. Estos genes están especializados en el transporte celular dependiente de energía y participan en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas, movilización de iones y péptidos y señalización celular. Los genes ABC se localizan en el brazo largo del cromosoma 7, banda 21.1 (7q21.1) y se encuentran separados uno del otro por 330 pares de bases. El gen ABCB-1 codifica o expresa una proteína de 170 kd conocida como glicoproteína P (gp-170 [P de permeabilidad]) la cual es una molécula enlazadora de ATP con características de una proteína de membrana formadora de poro, que funciona como bomba dependiente de energía, la cual exporta o expulsa la droga fuera de las células. En los últimos años, se han descrito más de 15 polimorfismos del gen ABCB1, el más relevante de ellos, por su progresión clínica, es el polimorfismo C3435T del exón 26 del gen, el único que se correlaciona con un fenotipo de menor expresión de la proteína en la membrana de la P-gp. La P-gp constituye un sistema de desintoxicación natural que se expresa en varios tejidos normales, como hígado, intestino delgado, riñón, placenta, células endoteliales del sistema nervioso central y testículo. Se han reportado como sustratos antitumorales de la gp-P170 a

los alcaloides de la Vinca, Vincristina y Vinblasina; Atraciclina como Daunorrubicina y Doxorrubicina; Epipodófilotoxinas como Etopósido y Tenopósido; Inhibidores de tirocincinasa como Imatinib. (21)

Estudios en Mieloma Múltiple han demostrado que la cantidad de P-gp expresada en la recaída se correlaciona con la cantidad de quimioterapia administrada, lo que indica que puede ser parte de una vía intrínseca activada en respuesta al tratamiento. Se cree que la regulación positiva de las proteínas ABC en la recaída puede depender de que los niveles basales estén presentes en células tumorales en el momento del diagnóstico. (17)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mieloma múltiple es una de las principales neoplasias hemato-oncológicas que se atienden en los centros de referencia. Su importancia radica en que la supervivencia de los pacientes con MM es muy variable, desde unos pocos meses hasta más de 10 años, con una mediana de 3 años (18). Esta variabilidad está asociada a una serie de factores relacionados con el paciente y con las características específicas del clon tumoral. Siendo el fenotipo de respuesta a los diversos fármacos directamente asociado con la falla terapéutica. Son diversos los mecanismos que se encuentran implicados en la resistencia a las diferentes quimioterapias; pero tal vez la más conocida es la expresión de los genes de resistencia a drogas (ABCB1), cuya finalidad es la expresión de bombas de flujo en las membranas celulares detoxificando a las células e impidiendo la activación de los mecanismos de apoptosis. En particular se ha demostrado que confieren resistencia a través de la expulsión del fármaco, altamente importantes en cáncer. Tanto la sobreexpresión de los genes ABC B1 y ABCG2 se han asociado a una pobre respuesta terapéutica en diversos tipos de tumores (principalmente leucemias y linfomas). (19) Esta sobreexpresión no es exclusiva de las células leucémicas, en modelos in vitro se ha identificado que la expresión de estos genes puede condicionar resistencia a diversos fármacos entre los que se encuentran los inhibidores de proteosoma y esteroides los cuales son considerados actualmente la principal línea de tratamiento. Jannick Clemens y colaboradores investigaron la expresión de genes en pacientes con mieloma múltiple e inhibidores del proteosoma; considerando que estos no inducen la sobre-expresión de RNAm (RNA mensajero) en genes ABCB1 (20). Sin embargo en mieloma múltiple no contamos con perfiles de expresión génica y tratamiento con esteroides e inmunomoduladores; siendo estos fármacos de primera línea en el tratamiento. Debido a esto y a que se dispone de una diversidad de fármacos para el tratamiento del Mieloma Múltiple (MM), la identificación de la expresión de estos genes puede contribuir con la individualización de los diferentes esquemas terapéuticos.

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances conseguidos desde hace más de una década con la combinación de fármacos inmunomoduladores o inhibidores de proteosoma, aproximadamente 25% de los pacientes con diagnóstico de MM fallecen dentro de los primeros 3 años de diagnóstico, pero solo un 10% sucede durante el primer año. (1) La resistencia a los diferentes fármacos utilizados como quimioterapia (vincristina, antraciclinas, esteroides) son una de las principales causas de la falla a los esquemas terapéuticos. La detección del gen ABCB1 en el paciente con mieloma múltiple permitirá individualizar el tratamiento. Además de poder determinar si cuentan con un riesgo elevado de recaída o falla terapéutica primaria.

5. HIPÓTESIS

Si la sobre expresión del gen ABCB1 se ha asociado a una pobre respuesta al tratamiento en diversas neoplasias tanto solidas como liquidas, entonces al ser el Mieloma Múltiple una enfermedad clonal que comparte dichos mecanismos de resistencia, la sobre expresión del gen comprometerá la respuesta terapéutica independientemente del tipo o línea de tratamiento en los que se encuentren.

6. OBJETIVOS

General. Detectar la expresión del gen de Resistencia a drogas (ABCB1) sobre la respuesta al tratamiento en los pacientes con Mieloma múltiple

Particular:

Determinar la frecuencia de expresión del gen ABCB1 en Mieloma Múltiple.

Determinar si existe diferencia entre los pacientes que tienen tratamiento sin inhibidores del proteasoma o no ; con la presencia del gen ABCB1

Determinar si existe asociación entre la respuesta al tratamiento y la presencia del gen ABCB1

7. METODOLOGÍA

Tipo y diseño de estudio, prospectivo, observacional, analítico. Se revisaran expedientes clínicos de pacientes con MM, de la unidad de Hematología del Hospital General de México, del periodo JUNIO DEL 2018 A SEPTIEMBRE DEL 2018.

Tamaño de la muestra

Se realiza el cálculo de la muestra en base a tamaño del efecto, considerándose el punto de corte a un tamaño del efecto del 90%. El cálculo de la muestra se utilizó, en base de encontrar un 50% de eventos como hallazgo del fenómeno, que desencadene el evento. Debido a que no hay una

evidencia de la frecuencia de la expresión del gen de ABCB1 en mieloma múltiple, se realiza una estimación del tamaño, en base de la identificación del poder del efecto.

Sólo se analizara el gen ABC B1 se trata de muestreo por conveniencia y al ser observacional no habrá intervención.

Tamaño de la muestra total =102

Grupo1: sin tratamiento con inhibidores del proteosoma: 51,

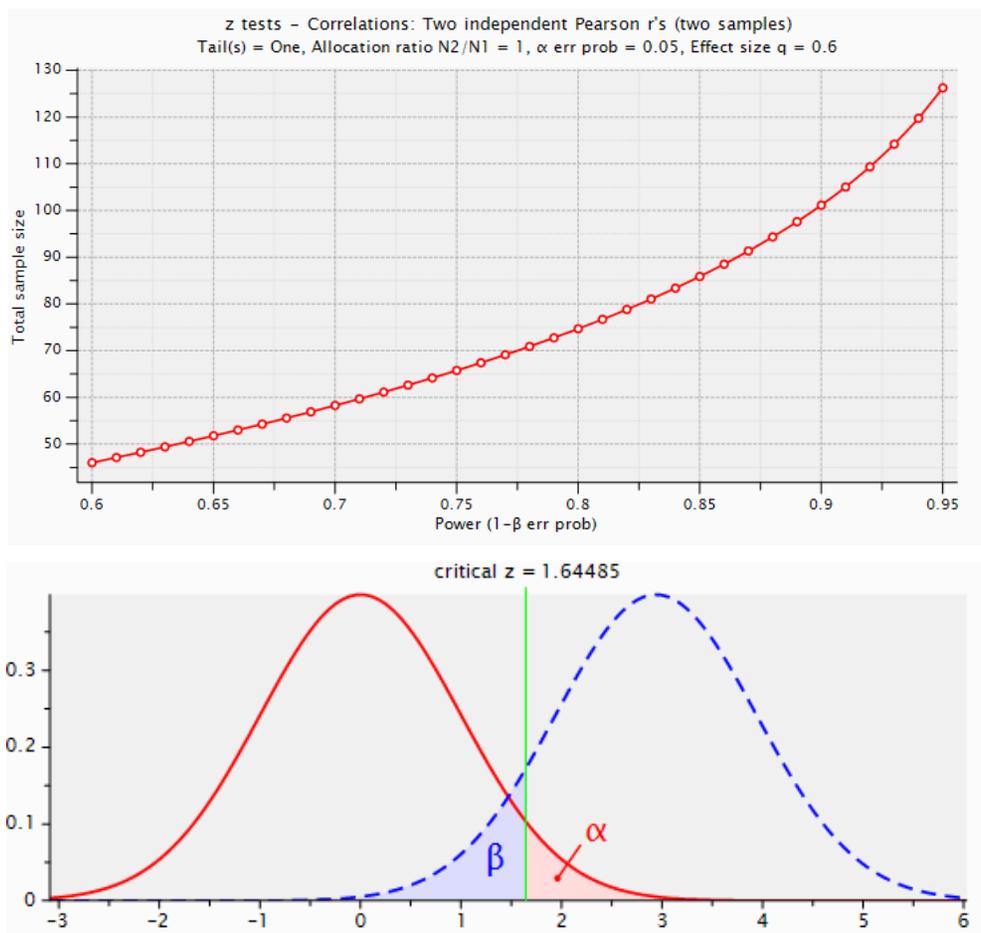
Grupo 2: con tratamiento inhibidores del proteosoma : 51

Tamaño del efecto $q = 0.6$, probabilidad de error tipo alfa 0.05, probabilidad de error tipo beta 0.89,

Razón de asignación $N2/N1:1$

BRAZO A: 51 pacientes BRAZO B: 51 pacientes

El brazo A: tratamiento sin inhibidores del proteasoma Brazo B: con inhibidores del proteasoma.



BRAZO A: 51 pacientes BRAZO B: 51 pacientes

8. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Registro de expediente clínico de Pacientes mayores de 18 años portadores de Mieloma Múltiple

Tx cualquier tipo

Ambos géneros

Que cuenten con consentimiento informado para el uso de sus muestras para el análisis de material genético

Criterios de exclusión.

Esperanza de vida de menos de 48 horas

Criterios de eliminación.

Ausencia de registros médicos que evalúen la respuesta a tratamiento quimioterápico.

Deceso del paciente durante el periodo de pretratamiento por cualquier complicación asociada o no asociada al tratamiento

9. VARIABLES

Tabla de operación de variables

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Valores
Tipo de respuesta	Respuesta a los 3,6 y 12 meses	Cualitativa	Ordinal	RESPUESTA COMPLETA RIGUROSA RESPUESTA COMPLETA MUY BUENA RESPUESTA PARCIAL RESPUESTA PARCIAL RESPUESTA MINIMA ENFERMEDAD ESTABLE ENFERMEDAD PROGRESIVA
Medición de los genes ABC B1 (MDR1)	Número de copias del gen MDR-1 medida mediante RT-PCR , con cualquier tratamiento,	Cuantitativa	Continúa	BAJA B) AUSENTE C) ALTA
Supervivencia	Vivo o muerto a los 3,6 y 12 meses	Cualitativa	Dicotómica	Si b) no
Tratamiento	Tipo de tratamiento	Cualitativa	Dicotómica	Con inhibidor del proteosoma sin inhibidor del proteosoma

	que recibe			
Riesgo	Riesgo de muerte	Cualitativa	Ordinal	Riesgo desfavorable: aneuploidía, t(14:16),t(14:20) por fish, deleción 17p13 por fish, Riesgo favorable: hiperdiploidía, t (11:14),t(6:14) por fish Riesgo intermedio: t (4:14), ganancia (1q), deleción del 13, hipodiploidía
Edad	Edad cumplida en años	Cualitativa	Continua	Años cumplidos
Falla renal	Datos de daño renal	Cualitativa	Dicotómica	Si daño renal (tfg <40, cr > 2 mg/dl) b) no daño renal (tfg >40, cr < 2 mg/dl)
ISS	Al diagnóstico, escala pronostica de mortalidad	Cualitativa	Ordinal	estadio: i: b2 microglobulina < 3.5 mg/dl y albumina 3.5g/dl, estadio ii: b2 microglobulina < 3.5 mg/dl y albumina < 3.5g/dl, estadio iii : b2 microglobulina > 5.5 mg/dl
ECOG	Escala de funcionalidad al diagnostico	Cualitativa	Dicotómica	Fit (ECOG 0-1) 0-1 asintomático o sintomático, pero capaz de desarrollar actividades del diario 1) no fit (ECOG 2-4) postrado en menos del 50% al 100% del día, con necesidad de cuidados por familia y enfermería

10. PROCEDIMIENTO

Se aleatorizara 1:1 mediante un software de aleatorización incluyendo en el brazo A pacientes los cuales se les administrara el tratamiento SIN INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA y a aquellos en el brazo B a los cuales se les administrara CON INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA.

11.1 TOMA DE MUESTRAS.

Para la extracción de RNA, se realizó la toma de muestra de sangre periférica 2 tubos de EDTA. La firma del consentimiento informado el cual autoriza el uso del material genético del paciente con la finalidad de analizar genes de resistencia a drogas, se realizara previo al inicio del tratamiento con cualquiera de los esquemas.

11.2 ENSAYO CELULAR

11.3 LÍNEA CELULAR (CONTROL POSITIVO)

Se llevó a cabo el cultivo de la línea celular K562 en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), L- glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratorios, Logan, UT), penicilina/estreptomicina 1% y 2mercaptoetanol 50uM (Gibco BRL, Grand Island, NY). Estas células se utilizaron como controles durante los análisis de expresión de los genes ABC-B1 y ABC-G2.

11.4 SEPARACIÓN DE MONONUCLEARES POR FICOLL-HYPAQUE

Se analizaron muestras de sangre periférica de pacientes quienes morfológicamente y con protocolo completo resultaron con diagnóstico de Mieloma Multiple, usando una jeringa previamente heparinizada para evitar la coagulación de la sangre. Las muestras se mezclaron en una proporción 1:1 suavemente con solución de fosfatos PBS 1X o bien con solución salina 0.14 M de NaCl (0.9%). Una vez homogenizadas las muestras se empleó Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, densidad 1.077 g/l) utilizando aproximadamente 1/3 del volumen total de sangre. Los gradientes se centrifugaron a 1500 rpm por 30 minutos a una temperatura de 18 a 20°C. Al término del tiempo se separaron la interfase de mononucleares con pipeta pasteur y se transfirió a tubos limpios. Los mononucleares se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 2500rpm durante 10 minutos. Al término del tiempo se decantó el sobrenadante y los mononucleares se re suspendieron en PBS 1X y posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su uso.

11.5 AISLAMIENTO DEL RNAM Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT).

Se realizó de las muestras crio preservadas a partir de 2 µg de RNA total. El volumen final de cDNA de 20 µl. El RNA se mezcló con 1 µl oligo dT 12-18 (INVITROGEN, Carlsbad, CA) y 1 µl de dNTPs 10mM (Applied Biosystems, Roche) la mezcla se incubo a 65°C por 5 minutos y posteriormente se coloco en hielo. Se adiciono 4 µl de Buffer 5X (Tris- HCl 250mM, KCl 375 mM MgCl₂ 15mM), 2 µl de DTT (0.1M) y el volumen correspondiente de H₂O y la mezcla se incubo a 37°C por 2 minutos, posteriormente se adiciono 1 µl de M-MLV RT (200u) (INVITROGEN, Carlsbad, CA) y se incubo a

37°C por 50 minutos, la enzima se inactivará incubando a 70°C por 15 minutos. El cDNA se almacena a menos veinte grados hasta su uso.

11.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación del gen ABC se realizó con el primer previamente reportado (90) con un volumen final de 10 µL en una mezcla que debe tener 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 0.2U Taq DNA polimerasa, (INVITROGEN, Carlsbad, CA) 0.5 µM primer sentido, 0.5 µM primer antisentido, y 1 µL de cDNA.

En la siguiente tabla se detalla el gen, la secuencia del primer (oligonucleótidos), los exones y las condiciones T_m:

Gen detectados por PCR

Tabla IV. Gen detectados por PCR

GEN	SECUENCIA	AMPLICON	UNION	TM
ABC-B1	5'-GCTCCTGACTCTGCCAAAGC-3' 3'-TCTTCACCTCCAGGCTCAGT-5'	202pb	Exón 24 Exón 25	60°C

Los perfiles térmicos que se llevaron a cabo son: la desnaturalización en un ciclo de 94°C durante 5 minutos, posteriormente 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, la elongación en 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. Los productos obtenidos por la técnica de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se colocó 10 µl del producto y 2 µl de colorante (Loading Buffer al 1%) utilizando una cámara de electroforesis (Electroforetic gel system, VWR) a voltaje constante de 60 volts durante 35 minutos. El gel se observó en transiluminador UV (High Performance, UV Transilluminator UVP).

11.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Para la cuantificación del gen ABC, se utilizó el cDNA a una concentración de 2 µg/µl, 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix, (Applied Biosystems, Life Technologies) 0.2 µl de primer forward (10 pM/µL) y 0.2 µl primer reverse (10 pM/µL) en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación son las utilizadas en PCR en punto final. Las muestras se realizaron por triplicado. Se realizó la cuantificación relativa por medio de $\Delta\Delta C_t$ en el equipo StepOne™, (Applied Biosystems® Life Technologie

12. METODOLOGÍA

Se utilizó el software estadístico SPSS versión 20.0. Para la prueba de contraste de hipótesis entre las variables clínicas (tratamiento con inhibidores del proteosoma versus no tratamiento con inhibidores del proteosoma) se utilizó el test ji-cuadrado, considerándose un valor de $p < 0.05$ a un

95% Intervalo de Confianza. A prueba T de student se realizara para establecer la diferencia de medias entre los niveles de expresión de los genes de resistencia a multidrogas (ABC-B1, ABC-G2) tanto previo como posterior al tratamiento de pre-inducción con esteroides

Análisis estadístico.	
Ji-cuadrado	Contraste de hipótesis entre el tipo de tratamiento y el tipo de respuesta. Contraste de expresión de genes ABC B1 y remisión en tratamiento con inhibidores del proteosoma y la tasa de remisiones en no tratados con inhibidores del proteosoma.
Kaplan-Meier	Análisis de supervivencia entre los grupos con tratamiento con inhibidores del proteosoma y sin inhibidores del proteosoma. Considerándose significativa la diferencia entre los grupos de expresión un valor ≤ 0.05 .
Regresión de Cox	Para evaluar la asociación de las diferentes variables sobre la supervivencia.

13. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

De acuerdo con la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en su título segundo “De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos”, capítulo I, artículo 17, el estudio se engloba dentro de la categoría sin riesgo para el paciente. Los autores damos testimonio que, al manejar información retrospectiva, se cumple con los aspectos éticos de la privacidad, confidencialidad y además la información se utilizará para fines académicos y de investigación. Los investigadores además no contamos con algún tipo de interés económico, farmacéutico, político o social de dicha investigación.

14. RELEVANCIAS Y EXPECTATIVAS

Servirá de base para identificar expresión del gen ABCB1 y su correlación en la respuesta global y enfermedad libre de progresión en pacientes con Mieloma Múltiple, con el fin de individualizar el tratamiento.

15. RECURSOS DISPONIBLES (HUMANOS, MATERIALES Y FINANCIEROS): todos disponibles

a) Recursos humanos: Médicos hematólogos de la unidad 111 D (Dr. Christian Ramos Peñafiel, Dr. Gilberto Barranco; Dr. Francisco Zazueta, Dr. Juan Julio Kassack y Doctores en ciencias del laboratorio de biología molecular, pabellón 204 (Dra. Irma Olarte, Dr Adolfo Martínez. Preparación del protocolo, presentación al comité, coordinación, análisis y revisión de resultados, preparación del manuscrito para publicación.

Dr. Christian Ramos Peñafiel; Análisis y revisión de resultados, preparación del manuscrito para publicación. Dra. Irma Olarte: Análisis y revisión de resultados, preparación del manuscrito para publicación.

Dr. Juan Collazo : Análisis y revisión de laminillas de aspirado de médula ósea en el servicio de hematología.

b) Recursos materiales: Computadora personal. Programa Microsoft® Office Word 2010, Microsoft® Office Excel 2010. Expedientes clínicos. Programa SPSS para análisis estadístico. Estación de trabajo con acceso a expediente clínico en unidad de Hematología del Hospital General de México. El laboratorio de biología molecular cuenta con los recursos necesarios para realizar este proyecto.

16. ANALISIS DE RESULTADOS

Resultados

Se estudiaron un total de 26 casos de pacientes portadores de Mieloma Múltiple atendidos en el departamento de Hematología del Hospital General de México. El diagnóstico se realizó mediante la presencia de un componente monoclonal en suero en conjunto con el incremento de células plasmáticas en la médula ósea. Todos los pacientes contaron con algún tipo de tratamiento basado principalmente en la combinación de un agente Inmunomodulador y esteroide, un inhibidor del proteosoma o la combinación de quimioterapia. De los 26 casos la mayoría correspondieron al género masculino (n=19, 73.1%). La media de edad fue de 58 años (rango de 43 a 73 años), siendo esta semejante entre los dos géneros (57 versus 58 años, p=0.889, 95% IC). La mayor parte de los pacientes fueron referidos de un área de ortopedia (n=8, 30.8%) principalmente por dolor lumbar crónico y fractura en territorio patológico en dos casos, seguido de la referencia tanto por el médico de primer contacto (38.5%) como el médico Internista (15.4%). Solo dos casos fueron referidos por fracaso renal (7.7%) y finalmente dos pacientes fueron referidos tanto por neuropatía (3.8%) como por lesiones líticas identificadas por el servicio de oncología (3.8%).

Tipo de Mieloma y características al diagnóstico.

La mayoría de los casos correspondieron a un Mieloma Múltiple tipo IgG de predominio de cadena ligera Kappa (n=22, 84.6%), seguido del tipo IgA (n=3, 11.5%) e IgD (n=1, 3.8%). Un total de tres casos (n=3, 11.5%) mostraron falla renal al diagnóstico (>2mg/dl de creatinina sérica) correspondiendo a los tres casos a subtipos no IgA. La media de células plasmáticas en médula ósea al diagnóstico fue de 42%, mostrando una infiltración significativa (>20%) en un 84.6% (n=22). La media de hemoglobina al diagnóstico fue de 10.8 g/dl (rango 3.6-16.7g/dl), con una media de creatinina sérica de 1.2mg/dl (0.6mg/dl- 3.2mg/dl). Dentro de los estudios complementarios para el

riesgo, la media de albumina fue de 3.06g/dl (1.7- 4.4g/dl) con una B2-microglobulina promedio de 6.2 mg/L (rango de 1.62- 27.8mg/L). Al combinar los valores para la realización del puntaje de riesgo ISS (International Staging System) la mayoría de los pacientes contaban con un puntaje de III (n=20, 76.9%), el restante se encontraba en un puntaje de II (n=6, 23.1%). Al analizar el estudio citogenético solo 3 pacientes contaban con un cariotipo normal y uno de los casos con Hiperdiploidia al momento del diagnóstico. Los casos restantes no contaron con cariotipo valorable.

Tipo de tratamiento y respuesta

Todos los casos iniciaron tratamiento mediante un agente inmunomodulador en conjunto con esteroides con la combinación ya sea de quimioterapia o de un inhibidor de proteosoma de primera generación. Todos los pacientes iniciaron tratamiento con Talidomida a dosis de 100mg-200mg al día en combinación con Dexametasona, un 19.5% (n=5) se le adicionó al tratamiento algún tipo de quimioterapia principalmente Ciclofosfamida, solo un caso recibió Melfalan en conjunto con Prednisona por considerarse con criterio de pacientes no funcional. En cuanto al inhibidor de proteosoma, dos de los casos (7.7%) iniciaron su esquema de inducción en base del protocolo CyBordD o el esquema VTD. Del total de los casos el 73.1% se mantuvo con una respuesta al tratamiento con Inmunomodulador y se mantuvo con tratamiento con Talidomida, 6 casos (23.1%) se adiciono al tratamiento un inhibidor de proteosoma (Bortezomib) como esquema VTD y uno de los casos se le adiciono como tratamiento de segunda línea quimioterapia con Ciclofosfamida (3.8%). Uno de los casos recibió como esquema de tercera línea Daratumumab completando 4 ciclos de tratamiento. De los 26 casos se documentó Respuesta Completa en un 26.9% (n=7), en 11.5% (n=3) una muy buena respuesta parcial, en 46.2% (n=12) se mantuvieron con una respuesta parcial, un 7.7% (n=2) mostro una respuesta mínima y dos casos progresaron durante el tratamiento de segunda línea (7.7%). Al combinar los tipos de respuesta un 38.5% de los casos (n=10) se consideraron con una buena respuesta al tratamiento ya que redujeron en más del 90% el componente M del diagnóstico a diferencia de un 61.5% (n=16) los cuales mostraron una respuesta menor o progresión de la enfermedad. El tiempo promedio para la obtención de una muy buena respuesta fue de 240 días (rango de 170 a 450 días). Al analizar el impacto del tipo de riesgo ISS sobre el tiempo para alcanzar una respuesta, los pacientes con un ISS II mostraron un mejor tiempo de respuesta en comparación con los casos con ISS III (p=0003, 95%IC). Dentro del análisis multivariado solo el fracaso renal al diagnóstico mostro un impacto significativo sobre la buena respuesta al tratamiento (p=0.012, 95% IC), tanto el tipo de Mieloma, como la plasmocitosis medular significativa y el tratamiento de primera línea no mostraron un impacto significativo sobre el tiempo de respuesta. De los tres casos que mostraron elevación de la creatinina al momento de diagnóstico ninguno requirió tratamiento sustitutivo de la función renal, por lo no impacto con la supervivencia al final del

seguimiento ($p=0.070$, 95% IC). La asociación de las diferentes variables clínicas sobre la obtención de una muy buena respuesta se describe en la Tabla 1.0

Figura 1.0 Tiempo para la obtención de una muy buena Respuesta al tratamiento (reducción de más del 90% del componente M)

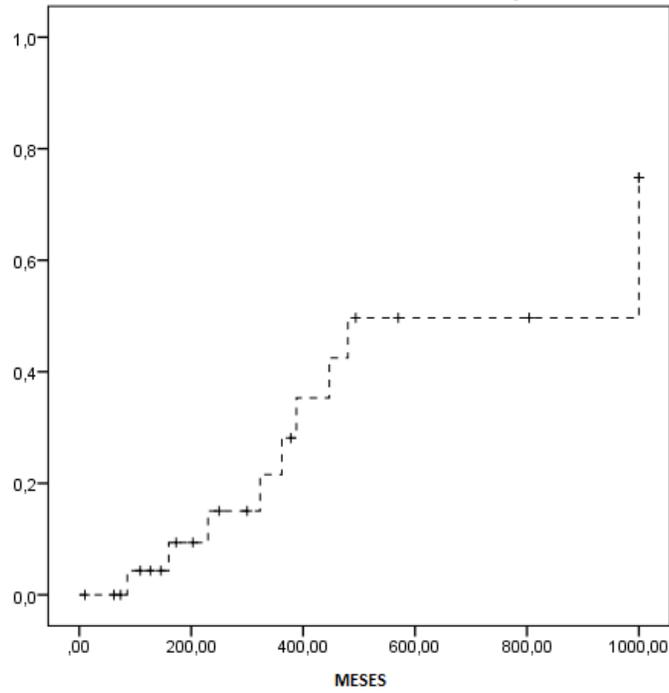
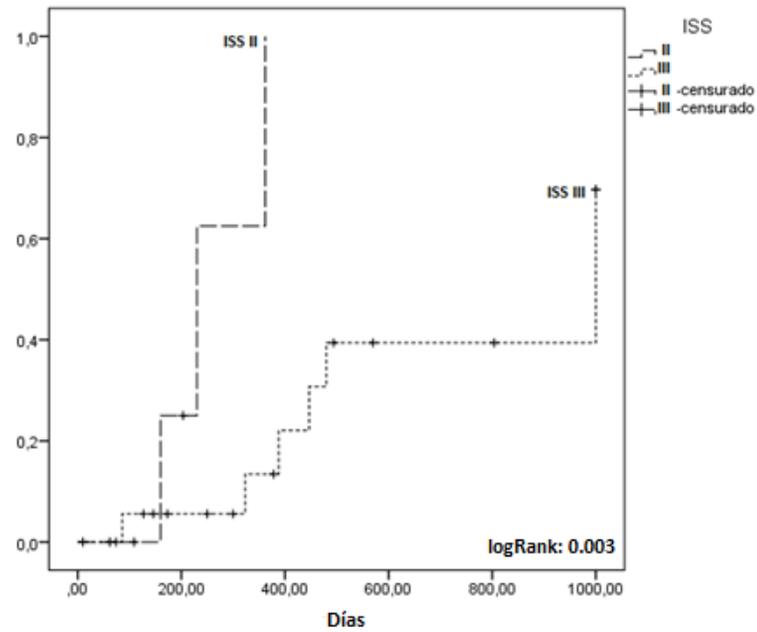


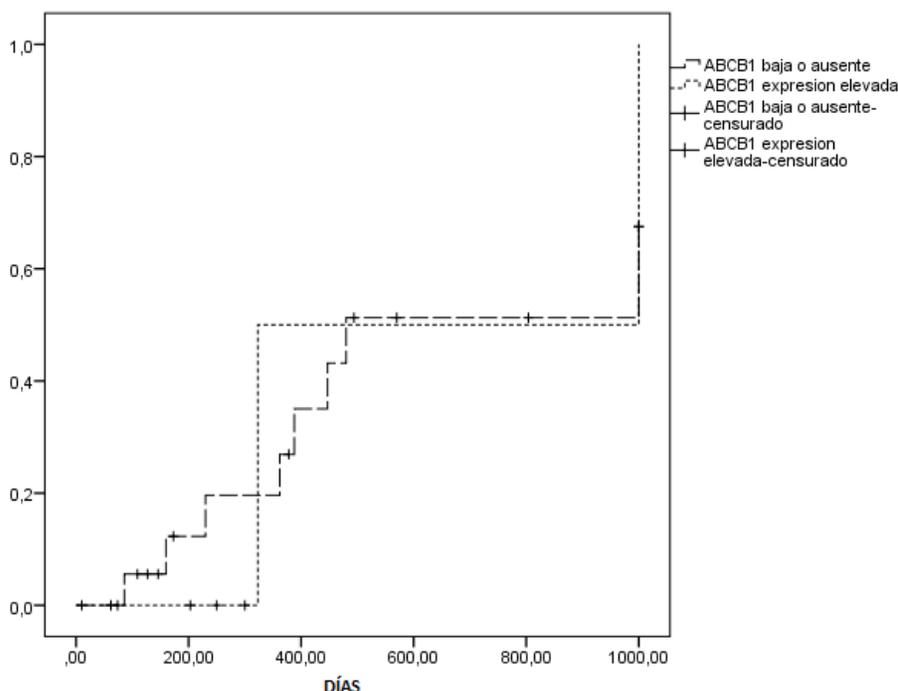
Figura 2.0 Tiempo para la obtención de una muy buena respuesta (>90% de reducción del componente M) acorde al tipo de riesgo ISS



Asociación de la Expresión del Gen de Resistencia ABCB1 sobre la respuesta al tratamiento

De los 26 pacientes, 23.1% (n=6) mostraron una sobre expresión del gen de resistencia ABCB1, 50% (n=13) mostraron una expresión baja y en 26.9% (n=7) mostró una expresión ausente. En conjunto un 23.1% (n=6) mostraron un riesgo elevado de resistencia al tratamiento y 76.9% (n=20) se les considero como un riesgo habitual de resistencia (niveles bajos o ausentes. La sobreexpresión del RNA no mostró una asociación con el tipo de Mieloma ($p=0.438,95\%IC$), el tipo de riesgo ISS ($p=0.428,95\% IC$), fracaso renal al diagnóstico ($p=0.438, 95\% IC$) o la presencia de plasmocitosis significativa en médula ósea ($p=0.676, 95\% IC$). Al analizar la asociación de la obtención de una buena respuesta acorde a la sobreexpresión del gen no se evidenció un impacto significativo ($p=0.864, 95\% IC$), a pesar de que el tiempo promedio de respuesta fue mayor en el grupo de sobreexpresión del gen ABCB1 en comparación con el grupo con expresión baja o ausente (310 días vs 220 días). La respuesta acorde al nivel de expresión se describe en la Figura 3.

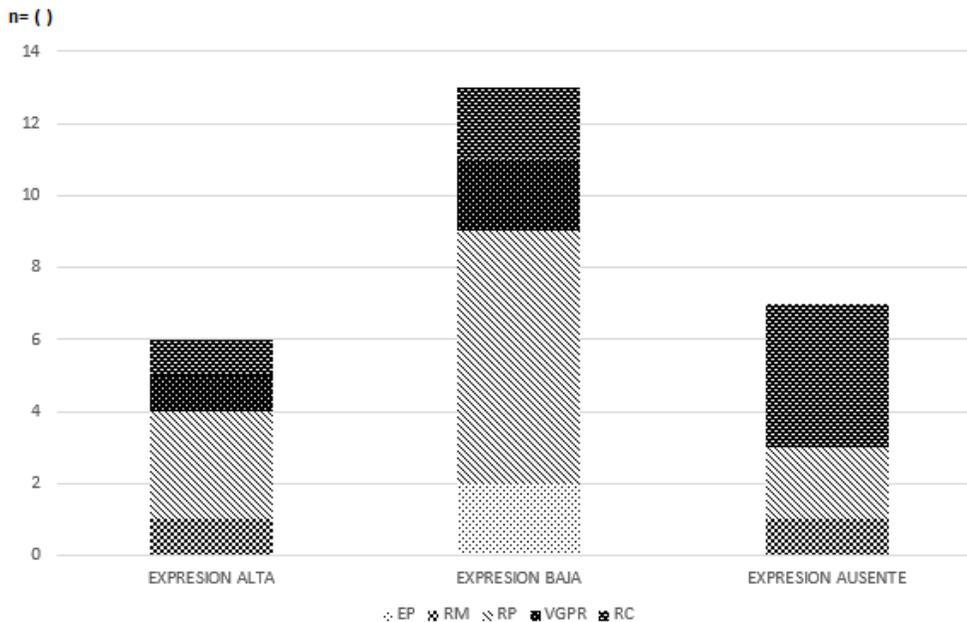
Figura 3.0. Tiempo para la obtención de muy buena respuesta (reducción de más del 90% del componente M) acorde a la expresión el RNAm ABCB1



Al analizar de manera individual el tipo de respuesta acorde al nivel de expresión del RNAm del gen ABCB1, de los 6 pacientes que sobre expresaron el gen ABCB1, solo uno (16.7%) integro una Respuesta Completa, a diferencia del 30% (n=6) de los casos que integraron Respuesta completa en los casos con expresión baja o ausente. Semejante a los casos que mostraron una Respuesta

Completa, un 66% de los casos (n=2) con expresión baja o ausente mostraron una Muy Buena Respuesta Parcial en comparación con un 33 % (n=1) de los casos con sobreexpresión del gen. El tipo de respuesta acorde al nivel de expresión del gen ABCB1 se describe en la Figura 4.0

Figura 4. Tipo de Respesta acorde al nivel de expresión del RNAm del gen ABCB1



17. CONCLUSIONES

Durante la última década el tratamiento del Mieloma Múltiple ha evolucionado drásticamente. En la actualidad alrededor del mundo la mayor parte de las recomendaciones incluyen el uso de un inhibidor del proteosoma de primera generación (Bortezomib) asociado a diferentes inmunomoduladores (Talidomida o Lenalidomida) y en aquellos con un adecuado estado funcional someterlos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Desafortunadamente en una gran parte de los países alrededor del mundo no se cuenta con un acceso a la mayor parte de las drogas obligando a la mayor parte de los clínicos al uso de terapias basadas principalmente en Talidomida. Son diversos los mecanismos implicados en la respuesta, siendo principalmente el tipo de Riesgo, así como las características biológicas de la enfermedad las principales que pueden generar una falla al tratamiento. Semejante a otros tumores las células plasmáticas expresan una diversidad de mecanismos para la resistencia al tratamiento y al igual que los tumores sólidos el microambiente que rodea al tumor influye sobre la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad. Otro de los mecanismos implicados son la sobre expresión de genes de Resistencia a Drogas. Estos genes codifican bombas de flujo dependientes de ATP cuya función principal es mantener una homeostasis celular y expulsar elementos tóxicos del citoplasma entre los que se encuentran las diferentes

quimioterapias. Diversos fármacos son sustratos de esas bombas de flujo entre los que se encuentran principalmente las antraciclinas y los alcaloides de la vinca. Dentro de la historia del tratamiento del Mieloma Múltiple tanto los esteroides (principalmente Dexametasona) como los alcaloides de la Vinca y las antraciclinas fueron parte fundamental por más de 20 años, pero desafortunadamente sin mostrar una respuesta significativa al tratamiento siendo sustituidos por los ensayos con Talidomida. Finalmente debido a su mecanismo de acción, la respuesta al tratamiento no es influenciada por la presencia de estos genes de Resistencia. Otro de los nuevos fármacos es el Bortezomib, cuyo mecanismo al inhibidor al proteosoma muestra un efecto independiente de las bombas de flujo celulares, lo que finalmente no disminuye su umbral de eficacia, no así la Dexametasona la cual incluso puede contribuir a la sobre expresión de estos. El objetivo principal de este estudio fue identificar la influencia de la expresión del mRNA del gen ABCB1 sobre el tipo de respuesta al tratamiento tanto inicial como de segunda línea en pacientes con Mieloma Múltiple. Al identificar los diferentes factores asociados a la respuesta al tratamiento, semejante a otras series internacionales el puntaje ISS demostró un efecto significativo sobre la respuesta, no así el subtipo de Mieloma Múltiple o la asociación de fracaso renal al diagnóstico. Este último debido muy probablemente a que los casos que debutaron con fracaso renal al diagnóstico mostraron un comportamiento reversible. Semejante a otras series alrededor del mundo el porcentaje de Respuestas Completas con un tratamiento mediante TD no excedió al 30% encontrándose en su mayoría bajo una Respuesta Parcial. Debido a que pocos casos contaron con uso de inhibidor de proteosoma de primera línea, su adición (VTD o CyBorD) no mostró una influencia significativa sobre la respuesta inicial al tratamiento y reservándose principalmente como tratamiento de segunda línea. Al asociar el tipo de tratamiento con la expresión del gen ABCB1, la mayor parte de los casos mostraron una expresión baja o ausente del gen y al asociar su expresión sobre la respuesta al tratamiento no se mostró una asociación significativa, presentándose un porcentaje de buenas respuestas semejantes entre los grupos de sobre expresión como los de expresión baja. Entre los datos útiles de esta asociación, los pacientes que mostraron una expresión baja al momento del tratamiento mostraron un tiempo de respuesta más corto en comparación con los casos con sobreexpresión del gen ABCB1. Finalmente, y a diferencia de lo esperado los casos que mostraron una expresión ausente del gen mostraron un mayor porcentaje de Respuestas Completas pero semejante a los casos de sobreexpresión sin una asociación significativa. En conclusión, debido a la sustitución del tratamiento quimioterápico por otros fármacos cuyo mecanismo principal es la recuperación de la integridad de la respuesta inmunológica o la inhibición directa del proteosoma no se identificó una influencia del fenotipo de expresión sobre una muy buena respuesta al tratamiento por lo que se sugiere que la resistencia inicial al tratamiento es debido a otros mecanismos no asociados al gen de resistencia a drogas ABCB1.

18. REFERENCIAS

- 1) Vicent R, Meletios A, Antonio P, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15: e538–48.
- 2) Heinz L, Pieter S, Faith D, et al. European Perspective on Multiple Myeloma Treatment Strategies in 2014; *The Oncologist* 2014;19:829–844.
- 3) Maria V, Enrique M, Bruno P, et al. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Reviews* 29 (2015) 387-403.
- 4) Boccadoro M, Pileri A. Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997;11(1):111-131.
- 5) San Miguel JF, Blade J. Multiple Myeloma. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, eds. *Postgraduate Haematology*. Sixth ed. London: Wiley-Blackwell; 2010:578-598.
- 6) Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. Aug 1 2004;104(3):607-618.
- 7) Gupta D, Hideshima T, Anderson KC. Novel biologically based therapeutic strategies in myeloma. *Rev Clin Exp Hematol.* 2002;6(3):301-324.
- 8) Vicent R, Myeloma Today: Disease Definitions and Treatment Advances. *Am J Hematol*, 2016; 91 (1):90-100
- 9) Raje N, Anderson K. Thalidomide--a revival story. *N Engl J Med.* 1999;341(21):1606-1609.
- 10) D'Amato RJ, Lentzsch S, Anderson KC, Rogers MS. Mechanism of action of thalidomide and 3-aminothalidomide in multiple myeloma. *Semin Oncol.* Dec 2001;28(6):597-601.
- 11) Peuckmann V, Fisch M, Bruera E. Potential novel uses of thalidomide: focus on palliative care. *Drugs.* 2000;60(2):273-292.
- 12) Raje N, Anderson K. Thalidomide--a revival story. *N Engl J Med.* 1999;341(21):1606-1609.
- 13) Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood.* 1992;80(4):887-890.
- 14) Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Ann Intern Med.* 1986;105(1):8-11.
- 15) Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, et al. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene.* 2002;21(9):1346-1358.
- 16) Jannick C, Lukas W, Julia S, et al. Bortezomib, carfilzomib and ixazomib do not mediate relevant transporter-based drug-drug interactions. *Oncology* 2017;14:3185-3192.
- 17) Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1999;94:1086-1099.
- 18) Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 28 2004;351(18):1860-1873.

- 19) Liang GW, Lu W L, Wu J W, et al. Enhanced Therapeutic Effects on the Multi-Drug Resistant Human Leukemia Cells in Vitro and Xenograft in Mice Using the Stealthy Liposomal Vincristine Plus Quinacrine. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22:429-437.
- 20) Jannick C, Lukas W, Julia S, et al. Bortezomib, carfilzomib and ixazomib do not mediate relevant transporter-based drug-drug interactions. *Oncology* 2017;14:3185-3192.